



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Karine Gomes Leite

**Caracterização morfológica e molecular de *Eurytrema coelomaticum*
(Digenea: Dicrocoeliidae) recuperados de bovinos do estado de Minas
Gerais, Brasil**

Rio de Janeiro

2020

Karine Gomes Leite

Caracterização morfológica e molecular de *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae) recuperados de bovinos do estado de Minas Gerais, Brasil

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

L533 Leite, Karine Gomes.
Caracterização morfológica e molecular de *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae) recuperados de bovinos do estado de Minas Gerais, Brasil / Karine Gomes Leite. – 2020.
103 f.

Orientador: José Roberto Machado e Silva
Coorientador: Eduardo José Lopes Torres

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Eurytrema coelomaticum* – Teses. 2. Microscopia confocal – Teses. 3. Microscopia eletrônica – Teses. 4. Dicrocoeliidae. 5. Helminologia veterinária– Teses. 6. Bovino – Parasito – Teses. I. Silva, José Roberto Machado e. II. Torres, Eduardo José Lopes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.995.1:619

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Karine Gomes Leite

Caracterização morfológica e molecular de *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae) recuperados de bovinos do estado de Minas Gerais, Brasil

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 26 de novembro de 2020.

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva (Orientador)

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Fabiano Matos Vieira

Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Hudson Alves Pinto

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.^a Dra. Jeannie Nascimento dos Santos

Universidade Federal do Pará

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Edine Gomes Leite, por sempre ter sido meu exemplo e inspiração nos estudos e na vida, pelo apoio e incentivo fundamentais na minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido firme durante a execução desta pesquisa, com saúde e forças para chegar até o final.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva pelo estímulo, exemplo profissional e confiança em mim depositado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres pela disponibilidade, paciência e boa vontade em me ensinar o melhor caminho a ser trilhado.

À Dra. Rosângela Rodrigues e Silva chefe do Laboratório de Referência Nacional em Hidatidose, pesquisadora do Laboratório de Helminhos Parasitos de Vertebrados (LHPV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz); à Dra. Alena Mayo Iñiguez pesquisadora titular do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos/ Laboratório de Paleogenética (LABTRIP – IOC/Fiocruz) e ao Dr. Arnaldo Maldonado Júnior chefe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios - Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, ao me acolherem em seus laboratórios, tornando possível à realização de alguns experimentos e procedimentos desta pesquisa.

Ao Dr. Fidelis Antônio da Silva Júnior da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) Minas Gerais, por ceder os espécimes provenientes de Minas Gerais coletados por ele.

À Prof^a Dra. Renata Heisler Neves pelo ensino, carinho, apoio e acompanhamento em etapas do desenvolvimento desta tese.

Ao Dr. Victor Hugo Borba Nunes, colaborador do Laboratório de Paleogenética (LABTRIP - IOC) da Fundação Oswaldo Cruz e a Msc. Beatriz Elise de Andrade Silva, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz por disponibilizarem seu tempo, auxiliando-me na biologia molecular.

Aos meus colegas alunos da Pós-graduação da UERJ que me aconselharam e incentivaram durante toda a elaboração desta pesquisa e me ajudaram na execução de algumas técnicas e demais funcionários do Departamento de Parasitologia e Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) pelo convívio e colaboração.

Também quero agradecer à Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica Humana pela contribuição na minha formação e conhecimento.

Aos técnicos dos Laboratórios de Microscopia Confocal/Fluorescência do Departamento de Anatomia da UERJ, de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Química (LABMEV) da UERJ, de Microscopia Eletrônica (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth da Fiocruz pelo acompanhamento e ajuda na obtenção de imagens por microscopia confocal, de fluorescência e varredura.

Agradeço ainda à minha família que ao longo desta etapa me encorajaram e me apoiaram, fazendo com que esta fosse uma das melhores fases da minha vida.

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

A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.

Marie Curie

RESUMO

LEITE, Karine Gomes. **Caracterização morfológica e molecular de *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae) recuperados de bovinos do estado de Minas Gerais, Brasil.** 2020. 103 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A euritrematose é uma helmintíase bovina de impacto veterinário, causada por espécies do gênero *Eurytrema* que se alojam no pâncreas e ductos pancreáticos. A infecção pode desencadear um quadro de pancreatite, caquexia e, conseqüente, redução da produtividade. Dados morfológicos e moleculares do parasito mostram que a espécie *Eurytrema coelomaticum* é prevalente no Brasil, porém existem poucas informações adicionais e atualizadas sobre a taxonomia destes helmintos recuperados de gados da região sudeste do país. No presente trabalho diversos caracteres taxonômicos, de espécimes provenientes do estado de Minas Gerais, foram revistos. Para isso, utilizamos a histologia, as microscopias de luz (campo claro e confocal) e eletrônica de varredura, incluindo criofratura, e análise molecular, visando agregar informações referentes à sequência parcial do gene 18S rRNA e pela primeira vez foi utilizado o Citocromo oxidase (*cox1*) como marcador molecular. Nos resultados morfométricos, sugerimos que os parâmetros taxonômicos que devem ser utilizados na identificação da espécie *E. coelomaticum*, são: a relação da largura da ventosa oral/largura da ventosa ventral (0,66-1,4), a relação do comprimento/largura dos ovos (1,38-1,83), o comprimento (0,041-0,050 mm) e largura dos ovos (0,025-0,030 mm). Como resultado da análise morfológica, foi possível detalhar a superfície do corpo do helminto, além de caracterizar a complexa organização das fibras musculares, subtegumentares, das ventosas e faringe; a disposição dos órgãos do sistema reprodutor; e, por microscopia eletrônica de varredura, evidenciamos a presença de papilas na face dorsal da região anterior do parasito. Em análise filogenética, revelamos que os isolados deste estudo formam um *cluster* com as sequências de *E. coelomaticum* depositadas no GenBank. Também foi possível destacar que *E. coelomaticum* tem maior similaridade genética com *E. pancreaticum* em comparação a *E. cladorchis*. Nossos resultados reforçam que a taxonomia integrativa, baseada na combinação de diversas técnicas de microscopia e biologia molecular, fornece para a sistemática helmintológica, dados mais sólidos para diferenciar, dentre outros grupos, trematódeos digenéticos, gerando uma complementariedade de dados que não podem ser fornecidos por uma técnica isolada. Concluímos que, a aplicação da taxonomia integrativa em *E. coelomaticum* contribuiu para inserção de novos critérios morfométricos, morfológicos e moleculares, ampliando a compreensão desta espécie no Brasil.

Palavras-chave: *Eurytrema coelomaticum*. Microscopia. Morfologia. Morfometria. Biologia molecular.

ABSTRACT

LEITE, Karine Gomes. **Morphological and molecular characterization of *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae) recovered from cattle in the state of Minas Gerais, Brazil.** 2020. 103 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Eurytrematosis is a bovine helminthiasis with veterinary impact, caused by species of the genus *Eurytrema* that lodge in the pancreas and pancreatic ducts. The infection can trigger pancreatitis, cachexia and, consequently, reduced productivity. Morphological and molecular data of the parasite show that the species *Eurytrema coelomaticum* is prevalent in Brazil, but there is little additional and updated information about the taxonomy of these helminths recovered from cattle in the southeastern region of the country. In the present work, several taxonomic characters of specimens obtained from the Minas Gerais state were reviewed. For this, we used histology, light (brightfield and confocal) and scanning electron microscopy, including cryofracture, and molecular analysis, in order to aggregate information regarding the partial sequence of the 18S rRNA genes and for the first time Cytochrome oxidase (cox1) was used as a molecular marker. In the morphometric results, we suggest that the taxonomic parameters that should be used in the identification of the species *E. coelomaticum*, are: the ratio of the width of the oral sucker/width of the ventral sucker (0.66-1.4), the relation of the length/width of eggs (1.38-1.83), length (0.041-0.050 mm) and width of eggs (0.025-0.030 mm). Because of the result of the morphological analysis, it was possible to detail the helminth's body surface, in addition to characterizing the complex organization of the sub tegument muscle fibers, the suckers and pharynx; the organization of the reproductive systems organs; and, by scanning electron microscopy, we showed the presence of papillae on the dorsal surface of the parasite anterior region. In phylogenetic analysis, we reveal that the isolates of this study form a cluster with the *E. coelomaticum* sequences deposited in the GenBank. It was also possible to highlight that *E. coelomaticum* has greater genetic similarity to *E. pancreaticum* compared to *E. cladorchis*. Our results reinforce that the integrative taxonomy, based on the combination of several techniques of microscopy and molecular biology, provides to the helminthological systematics more solid data to differentiate, among other groups, digenetic trematodes, generating a complementarity of data that cannot be provided by an isolated technique. We conclude that the application of integrative taxonomy in *E. coelomaticum* contributed to inserting new morphometric, morphological and molecular criteria, expanding the understanding of this species in Brazil.

Keywords: *Eurytrema coelomaticum*. Microscopy. Morphology. Morphometry. Molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desenho taxonômico mostrando o aspecto ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i> com base na microscopia de luz	23
Figura 2 –	Ciclo biológico de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	25
Figura 3 –	Distribuição global de <i>Eurytrema spp</i>	27
Figura 4 –	Distribuição geográfica de <i>Eurytrema coelomaticum</i> no Brasil	27
Figura 5 –	Mapa do Brasil evidenciando o estado de Minas Gerais e os municípios de Lavras e Campo Belo	34
Figura 6 –	Variáveis morfométricas analisadas em <i>Eurytrema coelomaticum</i>	37
Figura 7 –	Morfologia geral de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	59
Figura 8 –	Microscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície do tegumento de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	60
Figura 9 –	Microscopia de luz (confocal) destacando a organização do tegumento, camada muscular e parênquima de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	61
Figura 10 –	Criofratura seguida de microscopia eletrônica de varredura e corte histológico por microscopia de luz de <i>Eurytrema coelomaticum</i> mostrando o tegumento, musculatura e parênquima em corte sagital	62
Figura 11 –	Ventosa oral de <i>Eurytrema coelomaticum</i> analisada por microscopia de luz (campo claro e confocal) e eletrônica de varredura	63
Figura 12 –	Ventosa ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i> analisada por microscopia de luz (campo claro e confocal) e eletrônica de varredura	64
Figura 13 –	Microscopia de luz (corte histológico, confocal e campo claro) da faringe muscular e esôfago de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	65
Figura 14 –	Microscopia eletrônica de varredura do órgão copulador de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	66
Figura 15 –	Microscopia de luz (confocal e corte histológico) da bolsa do cirro de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	67
Figura 16 –	Desenho esquemático da bolsa do cirro e cirro de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	68
Figura 17 –	Criofratura, microscopia eletrônica de varredura e de luz (campo claro, corte histológico e confocal) dos testículos de <i>Eurytrema</i>	

	<i>coelomaticum</i>	69
Figura 18 –	Microscopia de luz (campo claro, corte histológico e confocal), eletrônica de varredura e criofratura do sistema reprodutor feminino de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	71
Figura 19 –	Desenho esquemático do sistema reprodutor feminino de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	72
Figura 20 –	Microscopia de luz (campo claro e corte histológico), eletrônica de varredura e criofratura do útero e ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	73
Figura 21 –	Microscopia de luz (campo claro, corte histológico e confocal) e eletrônica de varredura do sistema excretor de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	74
Figura 22 –	Filograma de <i>Eurytrema coelomaticum</i> inferido a partir de sequências de 18S rRNA utilizando os <i>primers</i> E-18S-F e E-18S-R (ZHENG et al., 2007)	76
Figura 23 –	Filograma de <i>Eurytrema coelomaticum</i> inferido a partir de sequências de 18S rRNA utilizando os <i>primers</i> A, B, C e D (CAI et al., 2012)	78
Figura 24 –	Filograma de <i>Eurytrema coelomaticum</i> inferido a partir de sequências de <i>cox1</i> mtDNA utilizando os <i>primers</i> JB3 e JB4.5 (BOWLES et al., 1992)	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Comparação morfométrica das médias de comprimento do corpo, largura do corpo, relação do comprimento pela largura do corpo, distância entre ventosas, distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral, distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo e distância entre ceco e região posterior do corpo de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes de Lavras e Campo Belo – MG	48
Gráfico 2 –	Comparação entre comprimento e largura das ventosas oral e ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes de Lavras e Campo Belo – MG	49
Gráfico 3 –	Comparação entre comprimento e largura da faringe de <i>Eurytrema coelomaticum</i> proveniente de Lavras e Campo Belo – MG	49
Gráfico 4 –	Comparação entre comprimento e largura dos órgãos do sistema reprodutor masculino de <i>Eurytrema coelomaticum</i> proveniente de Lavras e Campo Belo – MG	50
Gráfico 5 –	Comparação entre comprimento e largura dos órgãos do sistema reprodutor feminino de <i>Eurytrema coelomaticum</i> proveniente de Lavras e Campo Belo – MG	50
Gráfico 6 –	Comparação entre comprimento e largura dos ovos intrauterinos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> proveniente de Lavras e Campo Belo – MG	51
Gráfico 7 –	Comparação do comprimento do corpo, largura e da relação comprimento/largura do corpo de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais	53
Gráfico 8 –	Comparação das distâncias ente: região anterior e ventosa ventral; ventosa oral e ventosa ventral; ventosa ventral e região posterior do corpo; porção final do ceco e região posterior do corpo de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais	54
Gráfico 9 –	Comparação do comprimento e da largura das ventosas oral e	

	ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais	54
Gráfico 10 –	Comparação do comprimento e largura da faringe de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais	55
Gráfico 11 –	Comparação do comprimento da bolsa do cirro de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais	55
Gráfico 12 –	Comparação do comprimento e largura dos testículos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais	56
Gráfico 13 –	Comparação do comprimento e largura do ovário de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais	56
Gráfico 14 –	Comparação do comprimento e largura das glândulas vitelínicas de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais publicações de relatos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> em bovinos no Brasil contemplando autores e Estados de procedência	25
Tabela 2 –	Sequência para coloração de <i>Eurytrema coelomaticum</i> pelo carmim clorídrico	35
Tabela 3 –	Sequência para processamento histológico de <i>Eurytrema coelomaticum</i> ...	39
Tabela 4 –	Sequência para coloração de cortes histológicos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> pela hematoxilina e eosina	40
Tabela 5 –	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação por PCR	43
Tabela 6 –	Dados morfométricos (mm) de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes de bovinos naturalmente infectados de Lavras e Campo Belo, MG	46
Tabela 7 –	Comparação dos dados morfométricos (mm) de <i>Eurytrema coelomaticum</i> descritos na literatura com o presente estudo.....	47
Tabela 8 –	Análise estatística (ANOVA) dos caracteres morfológicos estudados através de morfometria de <i>Eurytrema coelomaticum</i> do presente estudo (MG - Lavras e Campo Belo) em comparação a espécimes do RJ (Santa Cruz e Barra Mansa) e da Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) (LEITE, 2015)	52
Tabela 9 –	Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências 18S rRNA	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFA	Ácido acético, formalina e álcool
ANOVA	Análise estatística de variância
A-VV	Distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral
B	Blastômeros
BC	Bolsa do cirro
C	Cirro
CC	Comprimento do corpo
CC/LC	Relação entre o comprimento do corpo pela largura do corpo
Ce	Ceco
CENABIO	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
Ce-P	Distância entre porção final do ceco e região posterior do corpo
CHIOC	Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz
CCP	Cristais cúbicos de proteínas
CPa	Células do parênquima
CS	Camada sincicial
<i>cox1</i>	Citocromo oxidase
DE	Ducto ejaculatório
dNTP	<i>Deoxynucleoside triphosphate</i>
DV	Ducto vitelínico
E	Esôfago
Em	Embrião
Es	Espermatozoides
F	Faringe
FM	Fibras musculares
FC	Fibras circulares
FD	Fibras diagonais
FL	Fibras longitudinais
FR	Fibras radiais
FT	Fibras transversais
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz

GM	Glândula de Mehlis
Gp	Gonoporo
GP	Glândula prostática
GV	Glândulas vitelínicas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IT	Invaginações do tegumento
LABMEV	Laboratório de microscopia eletrônica de varredura – Instituto de Química - UERJ
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission Radiation</i>
LC	Largura do corpo
mtDNA	DNA mitocondrial
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MC	Microscopia confocal
ML	Microscopia de luz
O	Ovo
Od	Oviduto
Oo	Oócito
Ot	Oótipo
Ov	Ovário
P	Papilas
Pa	Parênquima
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Poros excretor
RLCE	Ramos laterais do canal excretor
rRNA	RNA ribossomal
RS	Receptáculo seminal
RV	Reservatório vitelínico
T	Testículos
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
U	Útero
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VE	Vesícula excretora
VO	Ventosa oral

VO/VV	Relação entre a largura da ventosa oral pela largura da ventosa ventral
VO- VV	Distância entre ventosa oral e ventosa ventral
VS	Vesícula seminal
VV	Ventosa ventral
VV-P	Distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	OBJETIVOS	32
1.1	Geral	32
1.2	Específicos	32
2	MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1	Obtenção dos parasitos	33
2.2	Aspectos éticos	34
2.3	Fixação e coloração dos helmintos para microscopia de luz e confocal	35
2.4	Análise morfométrica	36
2.5	Análise estatística	38
2.6	Análise morfológica	38
2.6.1	<u>Microscopia de luz</u>	38
2.6.2	<u>Estereomicroscopia</u>	39
2.6.3	<u>Histologia</u>	39
2.6.4	<u>Microscopia confocal</u>	40
2.6.5	<u>Microscopia eletrônica de varredura e criofratura</u>	41
2.7	Análise molecular	42
3	RESULTADOS	45
3.1	Morfometria	45
3.2	Morfologia geral	58
3.2.1	<u>O tegumento</u>	60
3.2.2	<u>As ventosas</u>	63
3.2.3	<u>O sistema digestório</u>	65
3.2.4	<u>O sistema reprodutor masculino</u>	66
3.2.5	<u>O sistema reprodutor feminino</u>	70
3.2.6	<u>A Vesícula excretora e o poro excretor</u>	73
3.3	Caracterização molecular	75
4	DISCUSSÃO	81
	CONCLUSÕES	91

REFERÊNCIAS	92
ANEXO - Formato final do 1º artigo científico publicado	103

INTRODUÇÃO

Trematódeos do gênero *Eurytrema* Looss & Cuffey 1907, pertencem à família Dicrocoeliidae e apresentam alta relevância na medicina veterinária, principalmente, em relação aos impactos econômicos promovidos pela infecção de rebanhos, desencadeando alterações clínicas no gado. Vermes adultos deste gênero encontram-se nos ductos pancreáticos, vias biliares e raramente no intestino delgado de ruminantes, tais como, bovinos; caprinos; ovinos; bubalinos; leporinos e camelídeos (MATTOS JR & VIANNA, 1987, BASSANI et al., 2007, BARBOSA et al., 2014), podendo causar um quadro de pancreatite intersticial crônica com subsequente obstrução intestinal, queda na produtividade e condenação do pâncreas do animal parasitado realizada pelo Serviço de Inspeção Federal (BASSANI et al., 2006).

Atualmente, existem doze espécies descritas parasitando ruminantes presentes em todos os continentes do mundo. A doença provocada por estes helmintos é denominada euritrematose ou euritremíase e resulta em perda financeira por decorrência da diminuição de produtividade na pecuária (MOHANTA et al., 2015). Apenas três espécies: *Eurytrema coelomaticum* Giard & Billet, 1892, *E. pancreaticum* Janson, 1889, e *E. cladorchis* Chin, Li & Wei, 1965, foram melhor descritas com base na caracterização morfológica e molecular (JONES, 1985; ZHENG et al., 2007; FIGUEIRA et al., 2014; MOHANTA et al., 2015; CHANG et al., 2016; SU et al., 2018).

Estudos baseados em dados morfológicos e moleculares sustentam que o *Eurytrema coelomaticum* é uma única espécie do gênero *Eurytrema* que infecta o gado brasileiro (TRAVASSOS, 1944; TRAVASSOS et al., 1969; FIGUEIRA et al., 2014), portanto sendo considerado de alta relevância para a pecuária nacional (ILHA et al., 2005; QUEVEDO et al., 2013; SCHWERTZ et al., 2016b). A euritrematose é encontrada, principalmente, em rebanhos das regiões Sul e Sudeste do Brasil (ILHA et al., 2005; FIGUEIRA et al., 2014; PINHEIRO et al., 2015; SCHWERTZ et al., 2015).

A identificação de espécies do gênero *Eurytrema*, a partir, unicamente, de dados morfológicos e morfométricos pode ser controversa, por isso, diversos trabalhos têm investido na taxonomia integrativa, adicionando a análise molecular (MALDONADO JR. et al., 2011; HENEBERG et al., 2015, HENEBERG et al., 2016). Na literatura encontramos uma variação morfológica importante na espécie *Eurytrema coelomaticum*, o que dificulta a sua

identificação e descrição precisa (TRAVASSOS, 1918 apud MATTOS JR, 1987; HORTA, 1918; DOLLFUS, 1922; FIGUEIREDO, 1928; PRUVIS, 1931; BHALERAO, 1936; NEVEU-LEMAIRE, 1936; CHATTERJI, 1938; CAMPOS et al., 1974; CORREA et al., 1984).

A partir dos anos 1940, com base na microscopia de luz convencional, foi publicada a afirmação de que a espécie *E. coelomaticum* seria a única presente no território brasileiro (TRAVASSOS, 1944). Desde então, diversas técnicas, principalmente de microscopia, foram sendo aprimoradas, ampliando o detalhamento dos espécimes brasileiros (TANG & TANG, 1977; MORIYAMA et al., 1980; MATTOS JR & VIANNA, 1987; BASSANI et al., 2007). Mais recentemente, ensaios moleculares, que avaliam a sequência parcial do gene nuclear 18S rRNA (FIGUEIRA et al., 2014), corroboram com a informação publicada por Travassos na década de 1940. Assim, estas novas ferramentas nos trazem contribuições ímpares e abrem novos campos para investigar a variabilidade morfológica e genética intraespecífica, principalmente para estudar amostras provenientes de distintas partes do Brasil e do mundo (ZENG et al., 2007; CAI et al., 2012; FIGUEIRA et al., 2014).

Classificação taxonômica

Filo Platyhelminthes

Subclasse Trematoda Rudolphi, 1808

Infraclasse Digenea Van Beneden, 1858

Ordem Plagiorchida La Rue, 1957

Família Dicrocoeliidae Looss, 1899

Gênero *Eurytrema* Looss, 1907

Espécie *Eurytrema coelomaticum* Giard & Billet, 1892

Gênero *Eurytrema*

O gênero *Eurytrema* foi descrito por Looss & Cuffey em 1907 e incluía as espécies *E. coelomaticum* Giard & Billet, 1892 e *E. pancreaticum* Jason, 1889. Entretanto, alguns autores

as consideravam sinônimas (TRAVASSOS, 1918; DOLLFUS, 1922; WARE, 1923; PURVIS, 1931; BHALERAO, 1936; NEVEU LEMAIRE, 1936; CHATTIRJI, 1938).

Bhalerao (1936) revisou o gênero *Eurytrema* e incluiu dezessete espécies, agrupando-as em cinco subgêneros, sendo *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum* consideradas sinônimas.

Travassos (1944), na revisão da família Dicrocoeliidae, reduziu o número de espécies para nove, os subgêneros para quatro e reconheceu *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* como espécies distintas. Segundo Travassos (1944), os helmintos adultos destas espécies se distinguem morfológicamente pela relação e tamanho das ventosas, a distância entre ventosas e o tamanho dos ovos. De acordo com este estudo, *E. coelomaticum* é a espécie prevalente na América do Sul.

Atualmente, cerca de doze espécies do gênero *Eurytrema* são descritas em todo o globo terrestre, sendo: *E. pancreaticum* Jason, 1889, *E. coelomaticum* Giard & Billet, 1892, *E. dajji* Bhalerao, 1924, *E. media* Chertkova, 1957, *E. ovis* Tubangui, 1925, *E. parvum* Senoo, 1907, *E. tonkinense* Gillard & Ngu, 1941, *E. escudeiroi* Eduardo, Manuel & Tongson, 1976, *E. cladorchis* Chin, Li & Wei, 1965, *E. hydropotes* Tang & Tang, 1975, *E. fukienensi* Tang & Tang, 1978 e *E. sphaeriorchis* Tang, Lin & Lin, 1978.

Todavia, há muita controvérsia acerca da “validade” taxonômica da maioria das espécies, sendo *E. pancreaticum*, *E. coelomaticum*, *E. cladorchis* e *E. fukienensi* as únicas espécies avaliadas também com o uso de técnicas moleculares (ZHENG et al., 2007, CAI et al., 2012; FIGUEIRA et al., 2014; MOHANTA et al., 2015; CHANG et al., 2016, SU et al., 2018). As demais espécies seguem sendo identificadas somente com base em características morfométricas e morfológicas (YAMAMURA, 1989; BASSANI et al., 2007).

Morfologia de *Eurytrema coelomaticum*

Looss & Cuffey (1907) descreveram os vermes adultos de *Eurytrema coelomaticum* apresentando o corpo alongado e achatado de formato ovoide à filiforme, comprimento do corpo com variação de 7,5 a 10 mm, ventosas oral e ventral de tamanho subigual, ventosa oral subterminal, poro genital localizado ligeiramente após a bifurcação do esôfago e glândulas vitelínicas situadas na região mediana do corpo.

Posteriormente, Travassos e colaboradores (1969) fizeram uma descrição mais detalhada da espécie, apresentando dados de largura do corpo de 6 a 7 mm e tamanho subigual das ventosas, medindo de 0,9 a 1 mm em diâmetro.

Algumas características clássicas são apresentadas na literatura, como: ventosa oral subterminal; ventosa ventral localizada a um terço da parte anterior do corpo; faringe pequena e esôfago curto; cecos intestinais sinuosos e delgados; poro genital ligeiramente pós bifurcal mediano; bolsa do cirro claviforme e grande; testículos pós acetabulares em zonas paralelas, arredondados e maiores que o ovário; ovário pós-testicular arredondado, submediano; glândula de Mehlis, espermateca e canal de Laurer presentes; ovos com tamanho variando entre 0,042 - 0,050 mm de comprimento por 0,023 - 0,030 mm de largura; vesícula excretora simples e poro excretor terminal (LOOSS & CUFFEY, 1907; TRAVASSOS, 1944; EDUARDO et al., 1976; BRAY et al., 2008; LEITE et al., 2020).

Autores acrescentaram informações morfométricas e morfológicas, deixando nítida a variação na dimensão deste helminto, sendo citadas variações de comprimento de 3 a 13 mm, largura de 2 a 7 mm e formato do corpo de oval a fusiforme (WIRORENO et al., 1987; YAMAMURA, 1989; EDUARDO et al., 1976, ILHA et al., 2005; SAKAMOTO & OKAIWA, 2007; BRAY et al., 2008; LEITE et al., 2020).

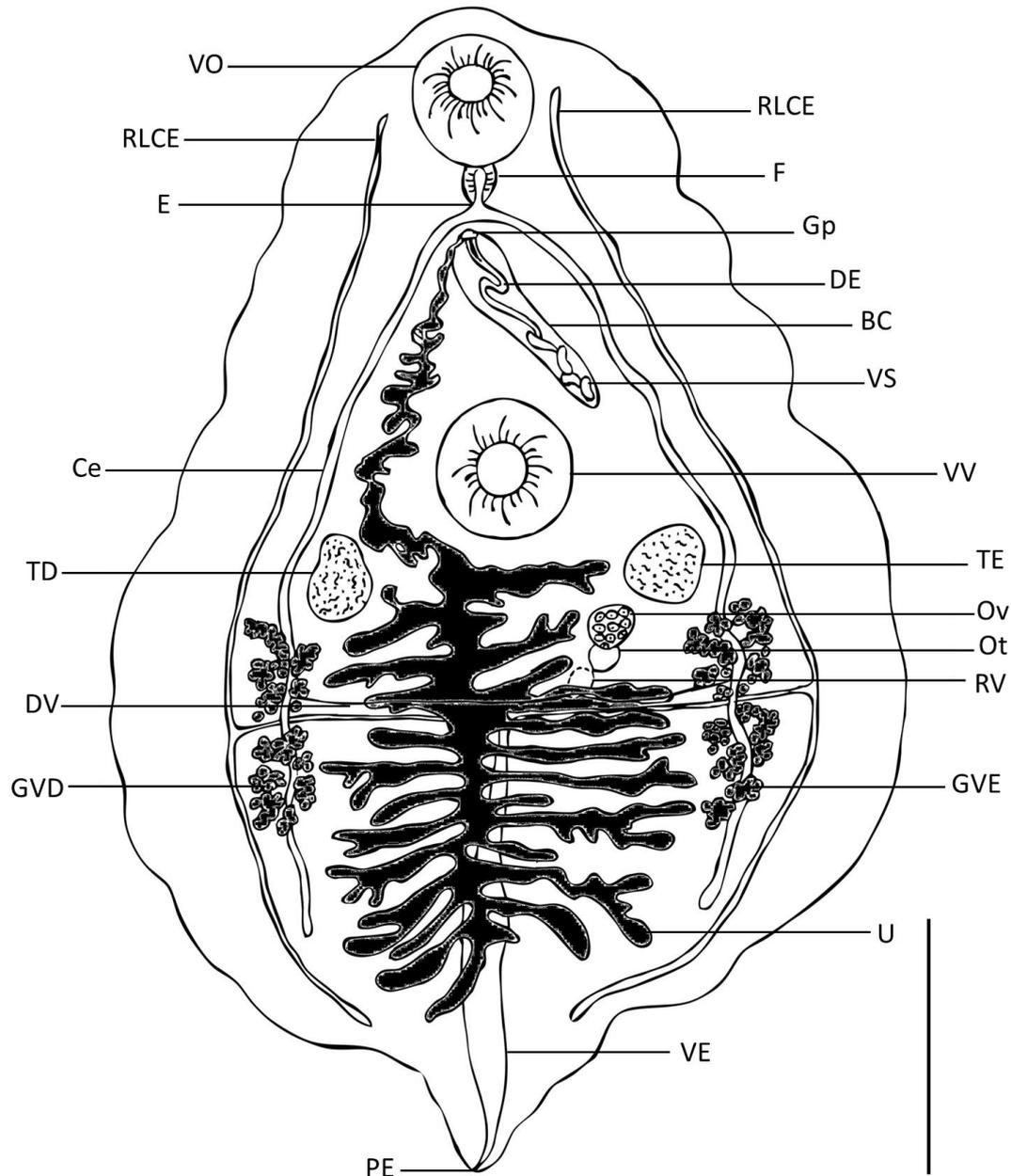
Outras características morfológicas foram descritas e são discutidas no presente trabalho, como: extremidades cônicas e sem apêndices caudais; escamas cuticulares nas margens do corpo; glândulas vitelinas longas, dispostas em grupos extra-cecais (BHALERAO, 1936, TRAVASSOS, 1944;).

A complexidade biológica, que também se apresenta na morfologia destes helmintos, tem sido melhor explorada nos últimos 40 anos, principalmente devido a conjugação de técnicas moleculares a diferentes metodologias avançadas de caracterização morfológica, onde podemos citar a microscopia de luz (fluorescência e confocal), eletrônica e a mais recente implementação da modelagem 3D (FAULWETTER et al., 2013; LOPES-TORRES et al., 2015; LOPES-TORRES et al., 2019; LEITE et al., 2020). Em *E. coelomaticum*, algumas dessas técnicas foram utilizadas para detalhar características morfológicas de miracídios, esporocistos, cercárias e ovos (FRANCO-ACUÑA et al., 2011, PINHEIRO et al., 2011, 2012 e 2015). No entanto, há certa carência no emprego dessas técnicas nos vermes adultos, e quando há, estes não apresentam uma aplicação na caracterização taxonômica (SAKAMOTO & OIKAWA, 2007).

Recentemente, nosso grupo realizou uma revisão morfológica e morfométrica de diversos caracteres taxonômicos de vermes adultos de *E. coelomaticum*, recuperados de

bovinos do estado do Rio de Janeiro. Neste estudo exploramos a microscopia de luz (campo claro, fluorescência e confocal) e eletrônica de varredura, que possibilitou acrescentar novas informações na descrição taxonômica clássica da espécie, porém sem a realização de experimentos de biologia molecular (LEITE et al., 2020) (Figura 1).

Figura 1 – Desenho taxonômico mostrando o aspecto ventral de *Eurytrema coelomaticum* com base na microscopia de luz (campo claro)



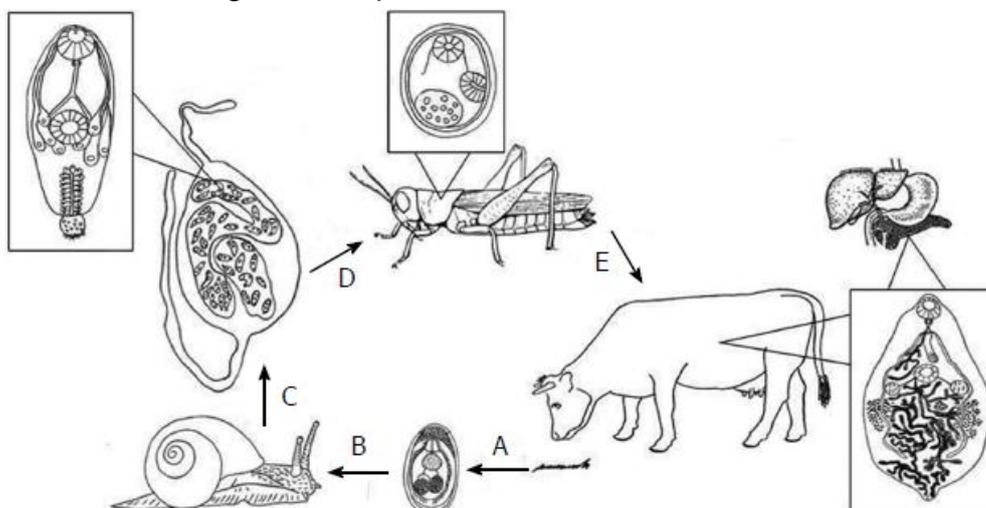
Legenda: VO - ventosa oral, RLCE - ramos laterais do canal excretor, F - faringe, E - esôfago, Gp - gonoporo, DE - ducto ejaculatório, BC - bolsa do cirro, VS - vesícula seminal, VV - ventosa ventral, TD - testículo direito; TE - testículo esquerdo, Ov - ovário, Ot - oótipo, RV - reservatório vitelínico, DV - ductos vitelínicos, GVD - glândula vitelínica direita; GVE - glândula vitelínica esquerda, Ce - ceco, U - útero, VE - vesícula excretora e PE - poro excretor - escala 1mm.

Fonte: Dissertação de mestrado Leite, K.G., 2015.

Ciclo biológico

O ciclo biológico do *E. coelomaticum* é complexo do tipo heteroxeno, apresentando três hospedeiros: um molusco e um artrópode, como hospedeiros intermediários e, o vertebrado como definitivo. Os ruminantes, principalmente bovinos, são os hospedeiros definitivos que albergam os vermes adultos e eliminam os ovos junto às fezes. No ambiente, estes são ingeridos pelo primeiro hospedeiro intermediário, moluscos gastrópodes terrestres do gênero *Bradybaena*, principalmente da espécie *B. similares* Férussac, 1821 (Gastropoda, Xanthonychidae). Dentro do intestino dos caramujos ocorre a eclosão da larva, denominada miracídio, que se desenvolve em esporocistos de primeira geração (mãe), tendo como sítio de localização o tubo digestório do gastrópode. Em seu desenvolvimento, os esporocistos de primeira geração dão origem a vários esporocistos de segunda geração (filhos), que em condições ideais de temperatura (média de 26°C), podem completar o seu ciclo mais rapidamente (BASSANI et al., 2007). Posteriormente, os esporocistos migram da superfície externa do tubo digestório dos moluscos, alcançando o trato respiratório por onde são liberados através da abertura respiratória. Estes, por sua vez, dão origem a centenas de cercárias a partir da reprodução assexuada (proliferativa clonal). O desenvolvimento do helminto no gastrópode dura em torno de 90 dias (GOMES et al., 2000; ILHA et al., 2005). Liberadas no ambiente, as cercárias são ingeridas pelo segundo hospedeiro intermediário, gafanhotos do gênero *Conocephalus* Thunberg, 1815 (Brasil) ou *Oecanthus* Serville, 1831 (Ásia) (ILHA et al., 2005), conhecidos vulgarmente como “esperança”. Nestes insetos, as cercárias livres atravessam a parede intestinal e se encistam no hemoceloma formando as metacercárias (MATTOS JR, 1987; BRANDOLINI & AMATO, 2001). O processo de desenvolvimento das cercárias para a forma de metacercárias tem duração de 15 dias, considerando uma temperatura constante de 30°C (ITAGAKI & CHIONE, 1982, apud BASSANI et al., 2007). De acordo com Tang & Tang 1977 (apud BASSANI et al., 2007) o número de metacercárias pode variar entre 1 e 461 formas infectantes. Fechando o ciclo de transmissão, hospedeiros definitivos, principalmente bovinos, se infectam ao ingerir os artrópodes contaminados com as metacercárias durante a pastagem. No intestino dos hospedeiros definitivos, os vermes juvenis recém-ingeridos migram ativamente para o pâncreas, aonde tornam-se sexualmente ativos e produzem ovos maduros, que são eliminados junto às fezes, alcançando o ambiente e assim, reiniciando o ciclo (HEADLEY, 2000; QUEVEDO et al., 2013; PINTO & MELO, 2016) (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo biológico de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: A. Ovos, contendo miracídeos formados, são eliminados pelas fezes de hospedeiros definitivos/vertebrados (ruminantes) para o meio externo e são ingeridos pelo primeiro hospedeiro intermediário, o caramujo terrestre *Bradybaena similaris*; B. O miracídio eclode no trato digestivo do molusco e desenvolve sucessivas gerações de esporocístos (mães e filhotes), que produzem cercárias; C. Os esporocístos filhotes, contendo cercárias, são expelidos do caramujo no ambiente terrestre e ingeridos pelo segundo hospedeiro intermediário, insetos da ordem *Orthoptera* (gafanhotos e grilos); D. As metacercárias são formadas dentro da cavidade do corpo dos insetos; E. Insetos contendo metacercárias são ingeridos acidentalmente por ruminantes durante a pastagem. As metacercárias são excitadas no intestino do hospedeiro vertebrado e migram ativamente para o pâncreas, onde crescem, amadurecem sexualmente e produzem ovos, que são eliminados pelas fezes reiniciando o ciclo.

Fonte: Adaptado de Pinto & Melo, 2016.

Epidemiologia

As espécies do gênero *Eurytrema* apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Europa, Rússia Oriental, Ásia e América do Sul (Figura 3) (LAPAGE, 1956; NIEBERLE & COHRS, 1970; MANNINGER & MOCSY, 1973; YAMAGUTI, 1975). A espécie *E. coelomaticum* já foi relatada em bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos na China, Japão, Filipinas e Brasil (BASSANI et al., 2007; BARBOSA, et al., 2014; GROSSKOPF et al., 2017).

Um fator que pode ser atribuído a essa disseminação seria a movimentação de animais provenientes de regiões endêmicas para regiões indenes (KEISER & UTZINGER, 2009; FERNÁNDEZ et al., 2012; FARJALLAH et al., 2013). No Brasil, a euritrematose afeta animais presentes nas regiões: Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Figura 4). Apesar do primeiro caso de infecção ter sido diagnosticado em ruminantes em 1918 (HORTA, 1918), somente a partir dos anos 70, com o trabalho “Trematódeos do Brasil, Travassos, 1969” foi confirmada a espécie em questão, e tomou-se conhecimento de estudos biológicos de *E. coelomaticum*.

Um dos aspectos que mais chamam a atenção na epidemiologia de *E. coelomaticum* são os altos índices de animais infectados em abatedouros de diferentes estados brasileiros (Tabela 1) (ILHA et al., 2005; BASSANI et al., 2007).

Casos de euritrematose humana foram relatados apenas para a espécie *E. pancreaticum* no Oriente (ISHII et al., 1983; OGAWA et al., 2019), podendo representar uma possível preocupação para área médica, inclusive no Brasil (SCHWERTZ et al., 2015, SCHWERTZ et al., 2017). Todavia, autores descartam a possibilidade de infecção humana por *Eurytrema coelomaticum* no Brasil, devido à necessidade de ingestão dos hospedeiros intermediários (grilos e gafanhotos) para que ocorra a contaminação, algo incomum no território brasileiro (PINTO & MELO, 2016).

Tabela 1 – Principais publicações de relatos de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos no Brasil contemplando autores e Estados de procedência

Autores	Estado de procedência
Horta, 1918	Minas Gerais Santa Catarina
Figueiredo, 1928	Rio de Janeiro
Travassos, 1944	Rio de Janeiro
Brant, 1962	Minas Gerais
Campos et al., 1974	São Paulo
Costa et al., 1986	Mato Grosso do Sul Minas Gerais Paraná Rio Grande do Sul Rio de Janeiro Santa Catarina São Paulo
Mattos & Vianna, 1987	São Paulo
Yamamura, 1995	Mato Grosso do Sul Paraná
Belém, 1994	São Paulo
Belém, 1996	Minas Gerais
Santos & Prata, 1998	Goiás Mato Grosso Minas Gerais São Paulo
Azevedo et al., 2000	Paraná
Bassani, 2006	Paraná
Rachid, 2011	Minas Gerais
Pinheiro et al., 2015	Rio de Janeiro
Grosskopf et al., 2017	Santa Catarina
Da Silva Jr et al., 2018	Minas Gerais
Leite et al., 2020	Rio de Janeiro

Fonte: Bassani et al., 2007, Grosskopf et al., 2017, Da Silva Jr et al., 2018; Leite et al., 2020.

Figura 3 - Distribuição global de *Eurytrema spp.*



Fonte: Tese de doutorado de Fidelis Antônio da Silva Júnior. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/26665/2/fidelis_junior_ioc_dout_2017.pdf. Acessado em: 06/05/2019

Figura 4 - Distribuição geográfica de *Eurytrema coelomaticum* no Brasil

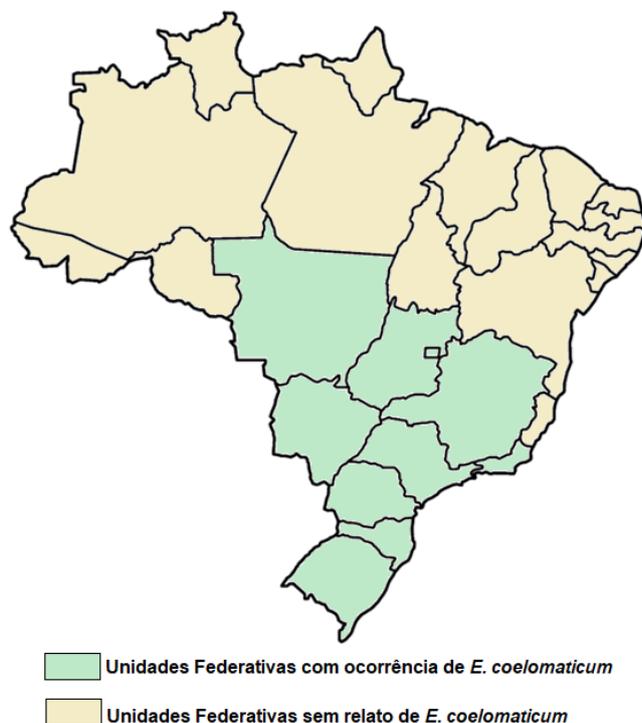


Ilustração: A autora, 2020.

Fonte: Bassani et al. (2007) e Grosskopf et al. (2017)

Euritrematose

As espécies de *Eurytrema* alojam-se nos ductos pancreáticos dos hospedeiros definitivos, podendo infectar o trato biliar simultaneamente e produzir pancreatite intersticial e, subsequente, obstrução ductal (BASSANI et al., 2007).

Em geral, os animais parasitados, principalmente, os bovinos, apresentam infecção subclínica, sendo comuns os casos assintomáticos, que apenas são diagnosticados em casos de abate e necropsia. Quando sintomáticos, os ductos pancreáticos podem inflamar e distender. Nas infecções graves com hiperparasitismo, os ductos podem ser ocluídos e o tecido pancreático podem ser gravemente danificados, gerando distúrbios gastrointestinais, que provocam: anemia, vômito, flatulência, diarreia, constipação, letargia, perda de peso, fraqueza, anorexia, alterações cardiorrespiratórias e pancreatite intersticial crônica difusa (ILHA et al., 2005; BASSANI et al., 2007; HEADLEY et al., 2009; SCHWERTZ et al., 2016a; GROSSKOPF et al., 2017).

Animais infectados com boas condições de saúde, normalmente, não apresentam sinais clínicos graves, entretanto, podem exibir altas concentrações plasmáticas de amilase, glicose e cetonúria (ILHA et al., 2005, RACHID et al., 2011; QUEVEDO et al., 2013)

Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico laboratorial da euritrematose baseia-se em exames coproparasitológicos a partir da pesquisa e identificação de ovos do helminto, entretanto, é uma técnica pouco usual na prática clínica. A parasitose muitas vezes só é diagnosticada no exame post-mortem, principalmente devido à dificuldade de identificar a parasitose em animais pouco parasitados ou assintomáticos, que acabam eliminando poucos ovos nas fezes (ILHA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2013).

Outro método de diagnóstico que vem sendo utilizado, porém em menor escala, é o da reação intradérmica, que usa antígenos imunogênicos em suspensão com a titulação de 1:500. Porém, tem apresentado alto índice de resultados falso-negativos (CORREA et al., 1984; BASSANI et al., 2007, FIGUEIRA et al., 2014).

Nos anos 80, Sakamoto e colaboradores descreveram os fármacos nitroxinil e praziquantel como uma forma de controle efetivo da parasitose. Observaram redução no número de ovos eliminados nas fezes, bem como, alteração morfológica nas formas adultas do parasito.

No entanto, trabalhos mostram baixa eficiência dos produtos anti-helmínticos para combater a infecção, existindo discordância sobre a efetividade dos medicamentos utilizados no tratamento da doença e havendo um consenso de que as drogas utilizadas não possuem efeitos deletérios para os parasitos (BASSANI et al., 2007).

Levando em conta a saúde, bem-estar dos animais infectados, e as questões financeiras, como o gasto frequente em medicamentos e suplementação nutricional, é importante salientar que mesmo se os medicamentos fossem 100% eficazes, o risco de reinfeção é constante, fato relacionado à exposição dos animais num ambiente que apresenta características intrínsecas que contribuem para a manutenção dos parasitos no solo, conseqüentemente, o tratamento pode não ser a alternativa mais viável ou satisfatória (KEISER & UTZINGER, 2009).

Uma maneira de minimizar a ocorrência da infecção está associada à prevenção, isto pode ser feito através do controle da população de hospedeiros intermediários moluscos. Logo, mantendo os níveis baixos destes gastrópodes no ambiente, contribui para não propagação da doença (JIMÉNEZ & MAYA-RENDON, 2007; BASSANI et al., 2007).

Diversidade genética de *Eurytrema coelomaticum*

Desde a descoberta da estrutura molecular do DNA, por James Watson e Francis Crick em 1953, o campo da biologia molecular tem progredido consideravelmente e contribuído para a compreensão da evolução das espécies, possibilitado o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (FREELAND, 2005; GUIMARÃES et al., 2009; TENNEVA, 2009).

O modo de herança genética difere entre marcadores moleculares de DNA nuclear (nDNA) e de DNA mitocondrial (mtDNA). Marcadores de nDNA (ex.: ITS, 18S, 28S) possuem herança biparental, são genes bastante conservados e muito utilizados em reconstrução filogenética de diversos táxons e podem, eventualmente, ser usados para detectar

hibridização de espécies (GROSS et al, 1996; FREELAND, 2005;). Já os marcadores de mtDNA (ex.: *coxI*, *Cytb*, *ND4*) possuem, na vasta maioria dos casos, herança uniparental e são amplamente utilizados em estudos populacionais, pois muitos apresentam amplo polimorfismo intraespecífico e evoluem mais rapidamente que marcadores em nDNA (AVISE, 2000).

Genes de DNA mitocondrial e nuclear (principalmente os genes que codificam RNA ribossomal) têm sido utilizados como marcadores em genética de populações e para a classificação da filogenia de *Eurytrema*.

Em 2007, Zheng e colaboradores, realizaram a primeira análise molecular do gênero *Eurytrema*, a partir do sequenciamento do gene RNA ribossomal 18S. Os autores montaram uma árvore filogenética demonstrando que as espécies *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* estão situadas em posições diferentes, confirmando em nível molecular a distinção destas espécies na China.

Em 2012, Cai e colaboradores realizaram um novo estudo sequenciando o gene 18S ribossomal das espécies *E. coelomaticum*, *E. pancreaticum*, *E. cladorchis* e *E. fukienensis* recuperadas de animais silvestres (cervos) e domésticos (bovinos) em diferentes províncias da China. Os resultados mostraram que as espécies *E. coelomaticum*, *E. pancreaticum* e *E. cladorchis* quando recuperadas de hospedeiros diferentes ou do mesmo hospedeiro, em regiões distintas, apresentam um grau significativo de diferenciação genética. Um ramo incluiu *E. cladorchis*, mais relacionado aos animais silvestres (cervos), outro ramo apresentou *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum*, associados aos animais domesticados (bovinos e ovinos) e um terceiro ramo, a parte, apresentou *E. fukienensis* representando uma interface entre as espécies de *Eurytrema*, já que parasita tanto animais domésticos quanto selvagens.

Em 2014, Figueira e colaboradores estudaram a ocorrência de *Eurytrema* spp. em bovinos no estado do Paraná, Brasil e realizaram o sequenciamento parcial do gene 18S rRNA para identificação. A análise das sequências dos produtos amplificados confirmou que os trematódeos se tratavam da espécie *E. coelomaticum* e foram filogeneticamente distinguidos de *E. pancreaticum* de acordo com os dados depositados no banco de dados de genoma (GenBank).

Mohanta e colaboradores em 2015 realizaram a caracterização morfológica e molecular de *E. cladorchis* parasitos de bovinos de Bangladesh. A árvore filogenética a partir do rRNA 18S mostrou que todos os haplótipos de *E. cladorchis* de Bangladesh formam um clado monofilético, onde outros membros do gênero *Eurytrema* (*E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*) são irmãos de *E. cladorchis*. Por outro lado, o aglomerado formado por *E.*

cladorchis de seu estudo é bem distinto daquele formado por *E. cladorchis* e *E. fukienensis* relatado da China (Cai et al., 2012). As estimativas de divergência evolutiva sugerem que a distância genética entre *E. cladorchis* desses dois países é bastante distinta. Os autores levantam a hipótese de que poderia haver uma compreensão errada sobre a identificação morfológica de *E. cladorchis* e *E. fukienensis* no trabalho de Cai e colaboradores, 2012, destacando a importância da padronização e detalhamento na identificação morfológica destes helmintos.

As informações sobre as variações genéticas ou polimorfismos poderiam aumentar o conhecimento relativo da espécie *E. coelomaticum*, como a diferenciação e diversidade de espécies estritamente relacionadas e suas relações intraespecíficas (TEOFANOVA et al., 2012).

Diante do exposto, destacamos que há diferenças intraespecíficas importantes tanto em caracteres taxonômicos morfológicos quanto moleculares em *E. coelomaticum*. Para ampliar o conhecimento sobre essa heterogeneidade é importante comparar espécimes de *E. coelomaticum* coletados em outras regiões. Vale destacar a importância da região Sudeste na produção de gado, principalmente o estado de Minas Gerais, que possui um dos maiores rebanhos do país (IBGE, 2017).

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Confirmar a espécie causadora da euritrematose no estado de Minas Gerais, a partir da taxonômica integrativa (morfológica e molecular) de helmintos adultos recuperados de bovinos provenientes de duas fazendas localizadas nos municípios de Campo Belo e Lavras.

1.2 Específicos

- a) Explorar diferentes técnicas de microscopia para complementar a caracterização morfológica, incluindo o estudo anatômico e fisiológico do helminto adulto, para enriquecer a diagnose da espécie *Eurytrema coelomaticum*;
- b) Aprofundar a compreensão do mecanismo reprodutivo da espécie e formular representações esquemáticas;
- c) Caracterizar a organização do tegumento do helminto, associando suas estruturas ao papel de fixação no tecido hospedeiro;
- d) Elaborar árvores filogenéticas a partir do sequenciamento dos genes RNA18S nuclear e *cox1* mitocondrial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos parasitos

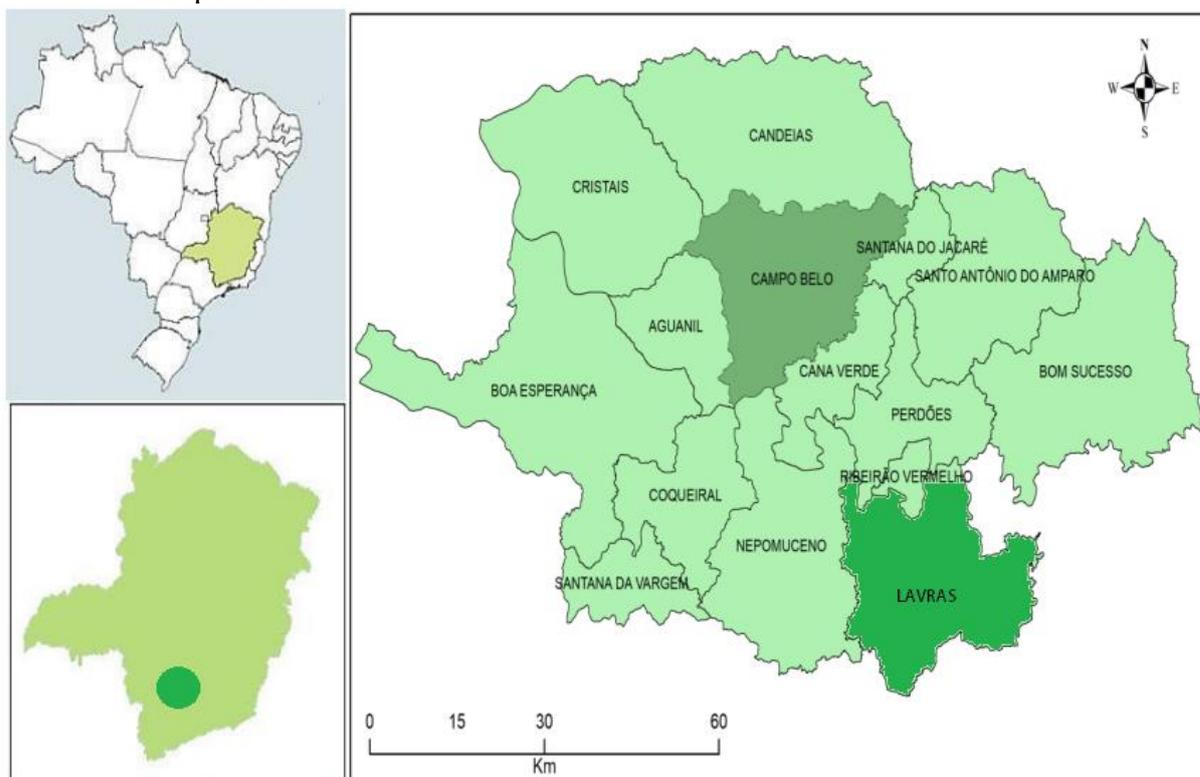
Os vermes adultos de *E. coelomaticum* foram coletados e cedidos pelo Dr. Fidélis Antônio da Silva Júnior da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) em 2016, durante a realização da sua pesquisa de doutorado com a espécie em questão. Os espécimes foram obtidos a partir do pâncreas de bovinos naturalmente infectados, abatidos em um matadouro industrial (Matadouro Frigorífico de Campo Belo) de acordo com as normas de vigilância sanitária. O abatedouro regional de Campo Belo é responsável pelo sacrifício e inspeção de bovinos provenientes de diferentes municípios da região sul de Minas Gerais, dentre eles, a própria cidade de Campo Belo (20° 51' 57" Sul, 45° 16' 24" Oeste) e Lavras (21° 14' 45" Sul, 44° 59' 59" Oeste) (Figura 5). Os pâncreas foram lavados individualmente dentro de uma bacia com solução salina a 0,9%, para que os exemplares de *E. coelomaticum* soltos pudessem ser recuperados por peneiras de nylon com malha de 150 µm após a passagem da solução. Os parasitos foram lavados em solução fisiológica (0,9%) e foram identificados de acordo com a procedência.

Os parasitos recuperados foram separados em dois grupos (A e B). O grupo A, de ambas as procedências foram colocados entre duas lâminas e levemente pressionados para a manutenção de sua forma original e fixados por imersão em AFA (etanol 70%, formaldeído 37% e ácido acético glacial) à temperatura ambiente, e foram conservados, posteriormente, em álcool 70%, de acordo com da Silva Júnior (2015). O grupo B foi lavado com solução tampão e congelado. Todos os espécimes foram identificados como *E. coelomaticum* a partir das características morfológicas via microscopia de luz (ML), tendo sido levado em consideração como caracteres determinantes o formato do corpo, o tamanho relativo das ventosas e o tamanho dos ovos intrauterinos do parasito (TRAVASSOS, 1944).

Foram avaliados também, para comparação e análise estatística das características morfométricas, os espécimes de Santa Cruz (n=25) (22° 55' 13" S e 43° 41' 6" O), Barra Mansa (n=25) (22°32'25,19"S e 44°10'35,33"O) - RJ (LEITE, 2015) e os identificados como *E. coelomaticum* (n=5) depositados no acervo da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC-RJ), recuperados de pâncreas de bovinos (*Bos tauros*), corados com

carmin clorídrico e montados em lâminas definitivas com bálsamo (Vouchers: N° 730a - Santa Catarina; N° 1.159a. - Minas Gerais; N° 17.423 - Minas Gerais; N° 25.087 - Brasil; N° 34.174 - Museu Nacional).

Figura 5 - Mapa do Brasil evidenciando o estado de Minas Gerais e os municípios de Lavras e Campo Belo



Legenda: O frigorífico Matadouro está situado no município de Campo Belo e atende a cidade de Lavras.

Fonte: Tese de doutorado de Fidelis Antônio da Silva Júnior. Disponível em https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/26665/2/fidelis_junior_ioc_dout_2017.pdf. Acessado em: 06/05/2019. Adaptado.

2.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi pautado pela ética na pesquisa e as atividades foram realizadas de acordo com as legislações vigentes (Decreto n° 30.691/1952, Instrução Normativa n° 154/2007 e Lei 11.794/2008). Para *E. coelomaticum*, não há necessidade de aprovação pelo Comitê de Ética Animal. Considerando-se que os helmintos são coletados de animais em abatedouro, não havendo nenhuma possibilidade de que os animais fossem abatidos para a consecução do presente estudo. Também não consta no projeto, nenhum objetivo que

necessite a utilização do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) fornecido por trabalhadores/ proprietários de abatedouros.

2.3 Fixação e coloração dos helmintos para microscopia de luz e confocal

Os helmintos do grupo A recuperados de bovinos de Campo Belo e Lavras foram fixados em AFA (álcool 70%, formol 37% e ácido acético glacial), e posteriormente, preservados em álcool 70%.

Cinquenta vermes fixados, vinte e cinco de cada procedência, foram corados e preparados para imagens de microscopia de luz (ML e DIC) e confocal. Os vermes foram corados com carmim clorídrico, desidratados em uma série graduada de etanol, clarificados com salicilato de metila e montados em bálsamo do Canadá, seguindo um processo regressivo segundo Amato et al. (1991) adaptado conforme tabela 2 (NEVES et al., 1998; DE SOUZA et al., 2011).

Após a coloração, as lâminas permanentes foram montadas da seguinte forma: uma gota de bálsamo do Canadá sobre a lâmina; depositou-se o helminto apoiando sua face dorsal sobre o bálsamo, cobrindo-os com a lamínula na face ventral e expondo esta superfície para a objetiva do microscópio. Todas as lâminas foram numeradas e identificadas.

Tabela 2- Sequência para coloração de *Eurytrema coelomaticum* pelo carmim clorídrico

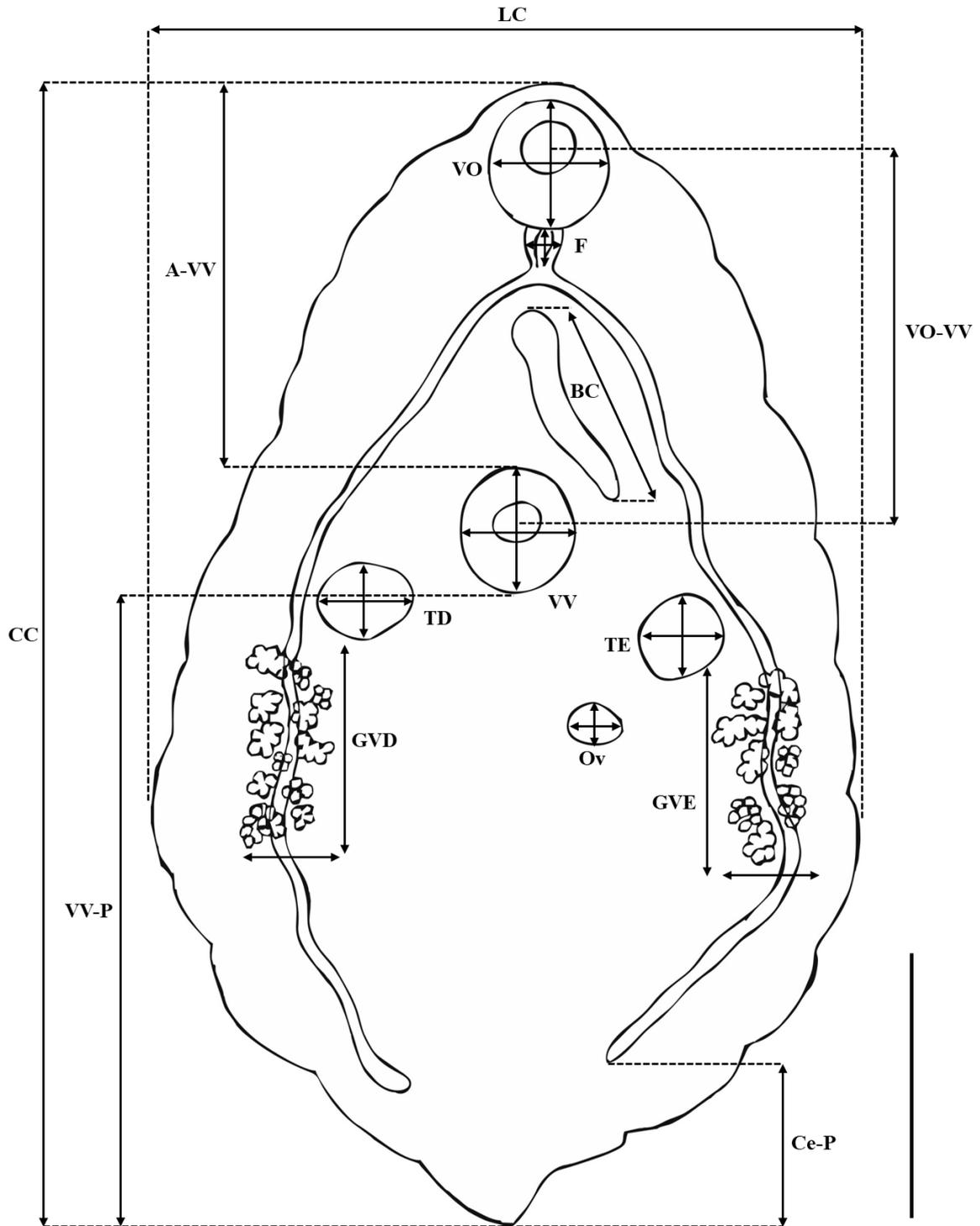
Reagentes	Tempo
Álcool 70%	15 min
Carmim clorídrico	8-10 min
Álcool 70%	15 min
Álcool 80%	15 min
Álcool 90%	15 min
Álcool 100%	15 min
Álcool 100%	15 min
Salicilato de metila	1-2 h

Fonte: AMATO et al. (1991). Adaptado.

2.4 Análise morfométrica

Para realizar a morfometria, os cinquenta espécimes corados foram visualizados e desenhados utilizando o microscópio de luz acoplado a uma câmara clara (Olympus BX40, Japão) na objetiva de 4x. As estruturas morfológicas foram mensuradas nos desenhos produzidos com auxílio de régua e paquímetro. Os dados morfométricos analisados estão apresentados na figura 6. As seguintes medidas lineares foram tomadas: comprimento do corpo (CC); largura do corpo (LC); relação entre o comprimento e a largura do corpo (CC/LC); distância entre a região anterior do corpo e ventosa ventral (A-VV); comprimento e largura da ventosa oral (VO); comprimento e largura da faringe (F); distância entre ventosa oral e ventosa ventral (VO-VV); relação da largura da ventosa oral pela largura da ventosa ventral (VO/VV); comprimento da bolsa do cirro (BC); comprimento e largura da ventosa ventral (VV); comprimento e largura dos testículos (T); comprimento e largura do ovário (Ov); comprimento e largura das glândulas vitelínicas (GV); distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo (VV-P); distância entre porção final do ceco e região posterior do corpo (Ce-P). Os ovos foram visualizados utilizando a objetiva de 40x, e foram tiradas suas medidas de comprimento, largura e relação do comprimento pela largura. Nos resultados todas as medidas foram apresentadas em milímetros (mm), exceto as indicadas de acordo com as unidades de medida específicas.

Figura 6 - Variáveis morfométricas analisadas em *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Comprimento do corpo (CC); largura do corpo (LC); distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral (A-VV); comprimento e largura da ventosa oral (VO); comprimento e largura da faringe (F); comprimento e largura da ventosa ventral (VV); distância entre ventosa oral e ventosa ventral (VO-VV); comprimento da bolsa do cirro (BC); comprimento e largura dos testículos direito e esquerdo (TD e TE); comprimento e largura do ovário (Ov); comprimento e largura das glândulas vitelínicas direita e esquerda (GVD e GVE); distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo (VV-P); distância entre porção final do ceco e região posterior do corpo (Ce-P) – escala: 1mm.

Ilustração: LEITE, KG, 2015.

2.5 Análise estatística

Foi realizada a análise estatística no programa *GraphPad InStat* (versão 3.01), utilizando o método *Unpaired T-Test*, para verificar a existência de diferença significativa entre as médias morfométricas dos vinte e cinco espécimes provenientes de cada localidade (Lavras e Campo Belo - MG), e o método de variância (ANOVA) por comparação múltipla (pós-teste de *Tukey*) para verificar a existência de diferença significativa entre as médias morfométricas das amostras do presente estudo com as de estudo anterior, provenientes do Rio de Janeiro (Barra Mansa e Santa Cruz) e da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) (LEITE, 2015). Foram consideradas diferenças significativas $P \leq 0,05$. A partir destes dados foram elaboradas tabelas e gráficos.

2.6 Análise morfológica

2.6.1 Microscopia de luz (ML)

A ML foi realizada utilizando um microscópio de luz (Nikon Eclipse 80i, Japão) acoplado a uma câmera digital (Nikon DS-Ri1, Japão), onde foram observados o formato e a posição dos órgãos do helminto.

Exemplares voucher de *E. coelomaticum* provenientes de Lavras e Campo Belo foram depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) sob os números 39412 a-b e 39413 a-b, respectivamente.

2.6.2 Estereomicroscopia

A análise por microscopia de fluorescência (MF), as lâminas coradas com carmin foram analisadas utilizando o estereomicroscópio de fluorescência (Zeiss Axio Zoom V16, Alemanha) do Centro de Microscopia do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Biológica (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Brasil). As mesmas lâminas também foram visualizadas utilizando a estereomicroscopia em modo campo claro (Zeiss, Discoverry. V8) no Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ, Brasil).

2.6.3 Histologia

Os espécimes foram processados de acordo com a tabela 3. No processamento incluímos as amostras em parafina, em seguida foram cortadas no micrótomo (Leica Biosystemd RM2125 RTS, China) no eixo longitudinal, nos planos coronal e sagital, com espessura de 5 µm. Posteriormente, foram desparafinizados e corados por hematoxilina e eosina (Tabela 4).

Tabela 3 - Sequência para processamento histológico de *Eurytrema coelomaticum*

Estágios	Reagentes	Tempo
Lavagem	Água corrente	5 min
Desidratação	Álcool absoluto 4x	15 min
Diafanização	Xilol 3x	15 min
Impregnação	Parafina 2x	30 min

Fonte: Caputo et al. (2009). Adaptado.

Tabela 4 - Sequência para coloração dos cortes histológicos de *Eurytrema coelomaticum* pela hematoxilina e eosina

Estágios	Reagentes	Tempo
Desparafinização	Xilol	20 s
Desparafinização	Xilol	20 s
Hidratação	Álcool 100%	30 s
Hidratação	Álcool 90%	30 s
Hidratação	Álcool 70%	30 s
Hidratação	Água destilada	10 s
Coloração	Hematoxilina	20 min
Lavagem	Água corrente	4 min
Lavagem	Água destilada	10 s
Desidratação	Álcool 80%	1 min
Coloração	Eosina	2 min
Lavagem	Água corrente	2 min
Lavagem	Água destilada	10 s
Desidratação	Álcool 70%	1 min
Desidratação	Álcool 90%	1 min
Desidratação	Álcool 100%	1 min
Diafanização	Xilol	2 min
Diafanização	Xilol	2 min

Fonte: CAPUTO et al., 2009. Adaptado.

Após a coloração, as lâminas permanentes foram montadas em bálsamo do Canadá diluído em salicilato de metila 3:1. Todas as lâminas foram numeradas e identificadas.

Em seguida, o material foi analisado com o uso do microscópio de campo claro (Olympus – BX53, Japão) acoplado à câmera fotográfica (Olympus SC100, Japão). As imagens geradas foram editadas no programa *CellSens Entry* para análise das estruturas internas do helminto.

2.6.4 Microscopia confocal

As mesmas lâminas montadas e coradas pelo carmim clorídrico foram observadas utilizando um microscópio confocal (Nikon C2, EUA), operando a 556 nm de excitação, 573 nm de emissão e *pinhole* a 1,4 (DE SOUZA, 2011), permitindo a visualização detalhada da musculatura do tegumento, das ventosas e da faringe; a forma dos órgãos reprodutores e a

presença de células reprodutivas nestes. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Confocal/Fluorescência do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

2.6.5 Microscopia eletrônica de varredura e criofratura

Espécimes de ambas as localidades fixados em AFA e conservados em álcool 70% foram processados para MEV com base em protocolo anterior (LOPES-TORRES et al., 2013), montadas em uma cesta de ponto crítico, desidratadas em soluções de etanol de concentração crescente, 70%, 80%, 90%, absoluto (2x) por 20 min de imersão em cada etapa à temperatura ambiente. Alternativamente, alguns espécimes, já em etanol absoluto, antes de serem secos pelo método de ponto crítico, foram submetidos à criofratura, seguindo protocolo descrito (ADNET et al., 2013). Resumidamente, as amostras foram acondicionadas em envelopes de filme de parafina (*parafilm*) imergidos em álcool absoluto e congelados em nitrogênio líquido (-196°C). O conjunto amostra e *parafilm* congelado foram colocados sobre uma superfície metálica também congelada em nitrogênio líquido e, manualmente, fraturados com uma lâmina congelada. Os cortes foram realizados transversalmente e longitudinalmente. Os fragmentos fraturados foram, imediatamente, transferidos para o etanol absoluto e todas as amostras levadas para a secagem em ponto crítico com CO₂ líquido. Posteriormente, as amostras foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) revestidos com fita adesiva de carbono, os espécimes secos, foram posicionados, aderidos e montados com o auxílio de estilete, pincel e estereomicroscópio. Alguns foram posicionados com a face ventral voltada para cima e outros com a face dorsal. Seguindo a literatura (DE SOUZA, 2011), todas as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro (20-25nm). Finalmente, as amostras foram examinadas nos Instituto de Química da UERJ (JSM-6510LV, Jeol, Japão) e na Plataforma de microscopia eletrônica Rudolf Barth no Instituto Oswaldo Cruz (JSM-6390-LV, Jeol, Japão), ambos microscópios operando em modo de alto vácuo e a aceleração de voltagem à 20-25 kV.

2.7 Análise molecular

Os espécimes do grupo B, de cada localidade geográfica foram lavados com solução PBS e congelados para análise molecular realizada nos Laboratórios de Biologia de Tripanossomatídeos e Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios - Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

a) Extração do DNA

Inicialmente, foram realizadas as extrações do DNA, seguindo o protocolo do QIAamp® DNeasy Plant Mini kit – Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemanha), utilizando um *poll* de cinco espécimes de cada localidade, que foram identificados e congelados em nitrogênio líquido (-196°C) por duas vezes e macerados juntamente a 200 µl de tampão PBS em microtubo de 2 ml. Em seguida, foram adicionados 400 µl de AP1 Buffer e 30 µl de proteinase K e homogeneizados em *termoshaker*. As amostras com as soluções foram mantidas a 56°C overnight para digestão. Posteriormente, foi dada continuidade na extração do DNA, centrifugando o lisado por cinco minutos a 14.000 rpm. O lisado foi pipetado para uma coluna de rotação QIAshredder, colocado em um tubo de coleta de 2 ml e centrifugado por dois minutos. O fluxo foi transferido para um novo tubo sem perturbar o sedimento. Foi adicionado 1,5 volume de tampão AW1, misturado por pipetagem e transferido 650 µl da mistura para uma coluna de centrifugação DNeasy Mini ecolocado em 2 ml de tubo de coleta. Posteriormente, foi centrifugado por 1 min a 8000 rpm. O fluxo foi descartado, e esta etapa foi repetida com a amostra restante. A coluna de centrifugação foi colocada em um novo tubo de coleta de 2 ml, sendo adicionado 500 µl de tampão AW2 e centrifugado por 1 min a 6000 rpm. O fluxo foi descartado e 500 µl de tampão AW2 foi adicionado e centrifugado por 2 minutos a 14000 rpm. A coluna de rotação do tubo de coleta foi removida com cuidado para que não entrasse em contato com o fluxo. A coluna de rotação foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Foram adicionados 100 µl de tampão AE para eluição e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente (15–25°C). Finalmente, centrifugado por 1 min a 8000 rpm e eluidos em microtubos com 50 µl.

Após a extração, o DNA foi avaliado quanto à quantidade (ng/µl) e à qualidade em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000), no Pavilhão de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz.

b) Amplificação por PCR

Para estudo e análise da diversidade genética de *E. coelomaticum* de Minas Gerais, um ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi aplicado para amplificar o gene 18S rDNA usando os *primers* E-18S-F e E-18S-R (ZHENG et al., 2007) e os *primers* A, B, C e D (CAI et al., 2012). Também foi amplificado um fragmento de DNA mitocondrial de aproximadamente 400pb da subunidade 2 do gene Citocromo oxidase (mtDNA *cox1*) com os iniciadores JB3 e JB4.5 (BOWLES et al., 1992) apresentados na tabela 5.

Os ensaios de PCR foram realizados em uma concentração final de 3 µl de DNA.

Para amplificação utilizando os *primers* E-18S-F, E-18S-R e JB 3, JB 4,5 utilizou-se 40 pmol/µl de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, tampão 1X, 2,5 unidades de GoTaq HotStart Polymerase (Promega, Southampton, Reino Unido), em um volume final de 25 µl.

Já na amplificação utilizando os *primers* A, B, C e D utilizou-se 1.0 pmol/µl de cada *primer*, 12,5 µl de PCR Master Mix e 7,5 µl H₂O DNA-free (Promega Corporation, Madison, USA) em um volume final de 25 µl.

A sequência rRNA válida se encontra depositada no GenBank, sob o número DQ401035.

Tabela 5 - *Primers* utilizados para a amplificação por PCR

Alvo	Tamanho do fragmento	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')	Referência
18S	1800 pb	E-18S-F E-18S-R	GGCTCATTAATCAGCTATGGTT ACGACTTTTACTTCCTCTAAAT	Zheng et al., 2007
18S	1800 pb	A B C D	CATTAAATCAGCTATGGTTCCTTAG CGGTATCTGATCGTCTTCGAACCTC TGGATCGCCGCCAGACAAACTACAG AATGATCAAGTTTGGTCGTCTTCTC	Cai et al., 2012
<i>cox1</i>	400 pb	JB3 JB4.5	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG	Bowles et al., 1992

As reações de PCR foram realizadas num termociclador (Mastercycler® nexus-Eppendorf), com as seguintes condições de ciclagem: 94°C por 3 min (desnaturação inicial); 40 ciclos de 94°C por 40 s (desnaturação), 55°C por 40 s (anelamento) e 72°C por 2 min (extensão); e extensão final 72°C por 7 min. Também foram utilizadas as condições de ciclagem descritas por Cai et al. (2012).

Os produtos da PCR (8 µl) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (100 ml de TAE + 1 g de agarose) à corrente elétrica de 70 V. Em seguida, foram aplicados 1 µl de gel Red e 1 µl de marcador de peso molecular (Ludwig 1000 pb) em comparação ao controle negativo com 8 µl de água ultrapura mais 1 µl de gel Red e 1 µl de marcador de peso molecular.

Após a corrida, as bandas no gel foram visualizadas com auxílio de luz ultravioleta no transiluminador UV (Bio-Rad).

c) Sequenciamento do DNA

Os produtos da PCR foram, então, purificados, seguindo protocolo do Kit MinElute Gel Extraction (250) – (Qiagen, Hilden, Alemanha). Após a purificação, foram montadas duas reações para cada sequenciamento. Cada uma contendo 6,5 µl de DNA genômico, sendo adicionado 1 µl de *primer R* em um microtubo, e 1 µl do *primer F* no outro, para serem analisadas 2 fitas de DNA. Posteriormente, foram sequenciados na plataforma RPT01A/IOC-Fiocruz (sequenciador Applied Biosystems ABI 3730).

d) Análise das sequências

As sequências obtidas foram verificadas utilizando a ferramenta online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), onde foi feita a comparação de cada sequência com as disponíveis no banco de dados GenBank do NCBI. As sequências obtidas foram editadas para gerar uma sequência consenso nos programas Geneious 9.1.8 (KEARSE et al, 2012) e BioEdit v7.0.4.1 (Department of Biological Science, North Carolina State University, EUA). Adicionalmente as sequências disponíveis no GenBank foram incluídas no alinhamento com a sequência consenso usando o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994).

A análise filogenética foi realizada pelo programa MEGAX v.10.1.7, utilizando o método Máxima Verossimilhança - *Maximum Likelihood* (ML) mais o modelo de parâmetros Kimura-2 (K2P) com distribuição gama (G) e 500 repetições de *bootstrap* seguindo o protocolo de identificação de espécies (protocolo CBOL com código de barras de DNA) (<http://www.barcodeoflife.org/content/resources/Standards-and-guidelines>).

A partir das sequências analisadas, foram montadas 3 árvores filogenéticas, de acordo com os alvos analisados e tamanho dos pares de bases de cada em consonância com os dados da literatura.

3 RESULTADOS

3.1 Morfometria

Foram mensurados um total de 50 espécimes, sendo 25 provenientes de Lavras e a outra metade de Campo Belo, utilizando microscopia de luz com auxílio de câmara clara. Tomamos como base vinte e oito características estruturais: 1) Comprimento do corpo; 2) Largura do corpo; 3) Relação do comprimento pela largura do corpo; 4) Comprimento da ventosa oral; 5) Largura da ventosa oral; 6) Comprimento da ventosa ventral; 7) Largura da ventosa ventral; 8) Relação da largura da ventosa oral pela largura da ventosa ventral; 9) Distância entre ventosas; 10) Comprimento da faringe; 11) Largura da faringe; 12) Comprimento da bolsa do cirro; 13) Comprimento do testículo direito; 14) Largura do testículo direito; 15) Comprimento do testículo esquerdo; 16) Largura do testículo esquerdo; 17) Comprimento do ovário; 18) Largura do ovário; 19) Comprimento da glândula vitelínica direita; 20) Largura da glândula vitelínica direita; 21) Comprimento da glândula vitelínica esquerda; 22) Largura da glândula vitelínica esquerda; 23) Distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral; 24) Distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo; 25) Distância entre porção final do ceco e região posterior do corpo; 26) Comprimento dos ovos intrauterinos; 27) Largura dos ovos intrauterinos; e 28) Relação do comprimento pela largura dos ovos intrauterinos.

Observamos as seguintes variações morfométricas nos espécimes provenientes das localidades de Lavras (n=25) e Campo Belo (n=25): comprimento do corpo 3,48 a 9,78; largura do corpo 1,66 a 5,41; comprimento da ventosa oral 0,33 a 1,06 e largura 0,33 a 0,91; comprimento da ventosa ventral 0,41 a 1,0 e largura 0,4 a 1,08; comprimento do testículo direito 0,16 a 0,9 e largura 0,16 a 0,95; comprimento do testículo esquerdo 0,13 a 0,9 e largura 0,16 a 0,96; comprimento do ovário 0,08 a 0,45 e largura 0,13 a 0,48. Os dados sobre a média, desvio padrão, valores mínimo e máximo, e análise estatística (Teste t) estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Dados morfométricos (mm) de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de bovinos naturalmente infectados de Lavras e Campo Belo, MG

Características	Lavras (n=25)	Campo Belo (n=25)	P
Comprimento corpo (CC)	5,6±1,28 (3,48-8,83)	7,56±1,03 (4,45-9,78)	0,0001
Largura corpo (LC)	3,01±1,07 (1,66-5,41)	3,46±0,78 (1,68-4,71)	0,0986
Relação CC/LC	1,95±0,4 (1,26-2,87)	2,26±0,78 (1,58-3,07)	0,0156
Distância entre A-VV	1,84±0,39 (1,26-2,83)	2,66±0,36 (1,45-3,23)	0,0001
Comprimento VO	0,62±0,16 (0,38-0,91)	0,87±0,14 (0,33-1,06)	0,0001
Largura VO	0,57±0,17 (0,33-0,91)	0,76±0,1 (0,36-0,9)	0,0001
Comprimento VV	0,6±0,12 (0,41-0,86)	0,82±0,11 (0,51-1,0)	0,0001
Largura VV	0,61±0,14 (0,4-0,95)	0,8±0,12 (0,5-1,08)	0,0001
Relação VO/VV	0,91±0,12 (0,66-1,18)	0,96±0,14 (0,72-1,4)	0,1614
Distância entre VO-VV	1,75±0,36 (1,23-2,66)	2,55±0,35 (1,5-3,05)	0,0001
Comprimento faringe	0,19±0,05 (0,13-0,28)	0,25±0,04 (0,16-0,35)	0,0001
Largura faringe	0,17±0,04 (0,11-0,28)	0,22±0,03 (0,13-0,26)	0,0001
Comprimento BC	0,88±0,3 (0,48-1,53)	1,43±0,18 (0,95-1,66)	0,0001
Comprimento T direito	0,39±0,17 (0,16-0,76)	0,64±0,15 (0,25-0,9)	0,0001
Largura T direito	0,42±0,17 (0,16-0,83)	0,65±0,16 (0,26-0,95)	0,0001
Comprimento T esquerdo	0,35±0,15 (0,13-0,68)	0,63±0,12 (0,23-0,9)	0,0001
Largura T esquerdo	0,43±0,17 (0,16-0,78)	0,67±0,14 (0,23-0,96)	0,0001
Comprimento ovário	0,2±0,07 (0,08-0,35)	0,31±0,06 (0,18-0,45)	0,0001
Largura ovário	0,26±0,09 (0,13-0,43)	0,34±0,05 (0,23-0,48)	0,0003
Comprimento GV direita	0,98±0,39 (0,36-1,93)	1,37±0,29 (0,76-2,21)	0,0003
Largura GV direita	0,52±0,18 (0,26-0,88)	0,59±0,11 (0,31-0,75)	0,1295
Comprimento GV esquerda	0,94±0,35 (0,31-1,66)	1,36±0,26 (0,88-2,0)	0,0001
Largura GV esquerda	0,53±0,20 (0,23-1,0)	0,60±0,14 (0,28-1,0)	0,1374
Distância entre VV-P	3,09±0,92 (1,53-5,1)	4,06±0,81 (2,5-5,83)	0,0003
Distância entre Ce-P	1,04±0,41 (0,48-2,08)	1,3±0,34 (0,78-1,85)	0,0306
Comprimento ovo uterino	0,047±0,002 (0,042-0,050)	0,047±0,003 (0,041-0,050)	0,1532
Largura ovo uterino	0,028±0,001 (0,025-0,030)	0,028±0,002 (0,025-0,030)	0,6145
Ovo C/L	1,5±0,11 (1,41-1,83)	1,56±0,10 (1,38-1,71)	0,8896

Legenda: Dados morfométricos (mínimo-máximo e média ± desvio padrão); A-VV (região anterior do corpo e ventosa ventral), VV-P (ventosa ventral e região posterior do corpo), BC- bolsa do cirro, T – testículo, Ce-P (porção final do ceco e região posterior do corpo), C/L- relação do comprimento pela largura; Análise estatística (Teste t): $P \leq 0,05$ quando há diferença significativa.

Uma comparação dos dados do presente estudo com os descritos na literatura está apresentada na tabela 7. A partir desta tabela é possível verificar que os espécimes aqui estudados possuem medidas menores do que os obtidos na literatura, com base neste levantamento morfométrico, sugerimos que os caracteres mais precisos para identificação da espécie *Eurytrema coelomaticum*, são: a razão entre ventosa oral/ventosa ventral, o tamanho dos ovos e a relação do comprimento/largura dos ovos intrauterinos.

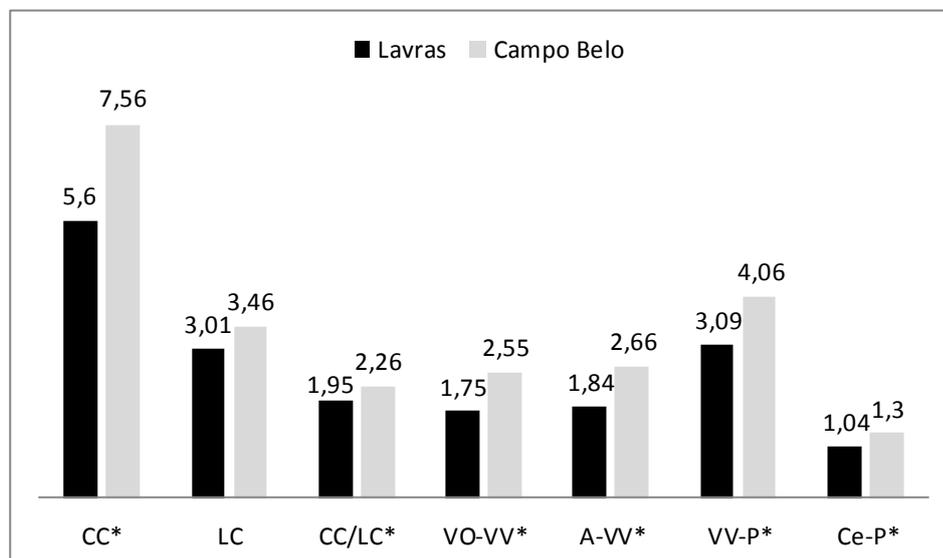
Tabela 7 - Comparação dos dados morfométricos (mm) de *Eurytrema coelomaticum* descritos na literatura com o presente estudo

Características	Ano de publicação*					
	1892	1898	1907	1944	2015	2020
Comprimento do corpo	15	7-10	7,5-10	10-13	6,51	3,4-9,7
Largura do corpo	5	4-4,5	3,5-5,5	6-7	3,26	1,6-5,4
Diâmetro da VO	-	0,7-0,9	0,83-0,95	0,9-1	0,72	0,36-1
Diâmetro da VV	-	-	0,83-0,98	0,9-1	0,71	0,4-1
Relação entre ventosas	-	-	-	1:1	1:1	1:1
Diâmetro da faringe	-	-	-	0,2-0,3	0,2	0,11-0,35
Comprimento da BC	-	0,9-1,4	-	1,4-1,7	1,08	0,4-1,6
Diâmetro dos testículos	-	-	-	1-1,3	0,49	0,13-0,9
Diâmetro do ovário	-	-	-	0,5	0,28	0,08-0,48
Comprimento do ovo	-	0,044-0,049	0,046	0,042-0,050	0,042	0,041-0,050
Largura do ovo	-	0,023-0,030	0,027	0,023-0,030	0,028	0,025-0,030
Distância entre ventosas	-	1,3-2,4	2,5-2,97	2,5-2,8	2,13	1,23-2,66

Legenda: *Publicações: Giard & Billet, 1892; Railliet & Morotel, 1898 ;Looss & Cuffey, 1907; Travassos, 1944; Dissertação de mestrado de Leite, 2015; Presente estudo, 2020. Valores de média e mínimo–máximo. O valor do diâmetro equivale a maior medida dos órgãos circulares.

Os gráficos 1 a 5 apresentam as médias das características morfológicas que sofreram maior variação dentre as amostras das duas localidades estudadas. Segundo a análise estatística (Teste t), os valores médios de: comprimento do corpo (CC), relação do comprimento pela largura do corpo (CC/LC), distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral (A-VV), distância entre ventosas (VO-VV), distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo (VV-P) e distância entre porção final do ceco e região posterior do corpo (Ce-P) mostram que o tamanho dos helmintos e de suas estruturas são maiores nos espécimes provenientes de Campo Belo (Gráfico 1).

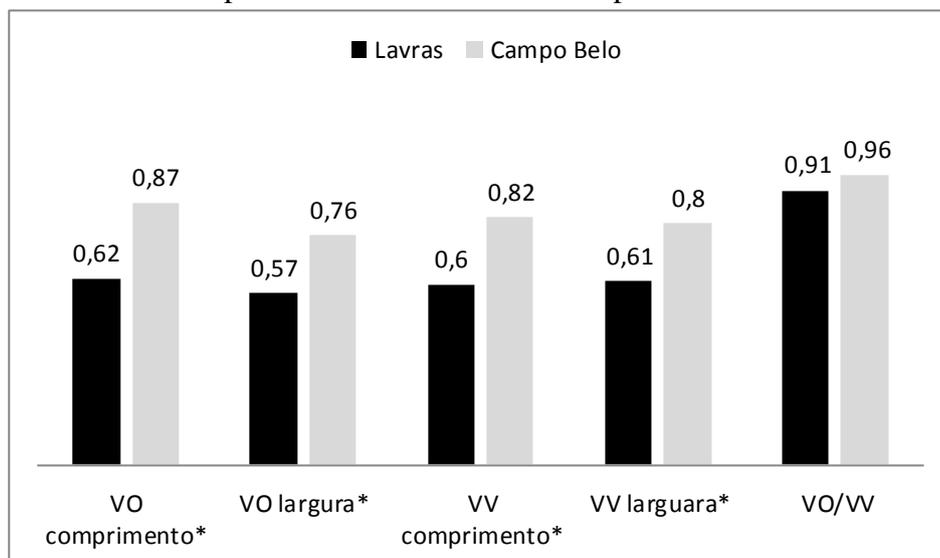
Gráfico 1- Comparação morfométrica das médias de comprimento do corpo, largura do corpo, relação do comprimento pela largura do corpo, distância entre ventosas, distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral, distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo e distância entre ceco e região posterior do corpo de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de Lavras e Campo Belo – MG



Legenda: CC- comprimento do corpo, LC- largura do corpo, CC/LC – relação do comprimento pela largura do corpo, VO-VV – distância entre ventosas, A-VV- distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral, VV-P- distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo, Ce-P- distância entre ceco e região posterior do corpo. Média das medidas expressas em milímetro. * Apresentaram diferença significativa.

Identificamos que o tamanho das ventosas é relativo ao tamanho do corpo do helminto. Nos espécimes provenientes de bovinos de Lavras o comprimento do corpo é cerca de 26% menor do que os helmintos obtidos em Campo Belo, sendo assim, suas ventosas também apresentam tamanhos reduzidos (27 a 29%). Apesar dos espécimes apresentarem diferenças significativas em relação aos caracteres citados, a razão entre a largura das ventosas oral/ventral (VO/VV) não apresentou diferença significativa, o que pode ser utilizado com dado morfométrico na identificação e caracterização da espécie (Gráfico 2).

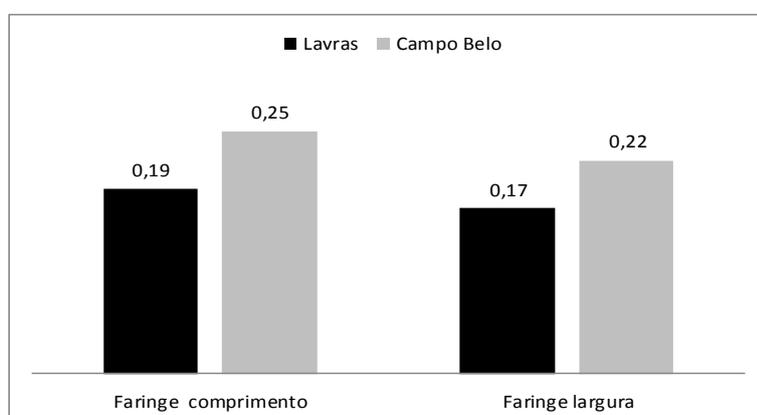
Gráfico 2- Comparação entre comprimento e largura das ventosas oral e ventral de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de Lavras e Campo Belo – MG



Legenda: VO – ventosa oral, VV – ventosa ventral, VO/VV – relação da largura da ventosa oral pela largura da ventosa ventral. Média das medidas expressas em milímetro. * Apresentaram diferença significativa.

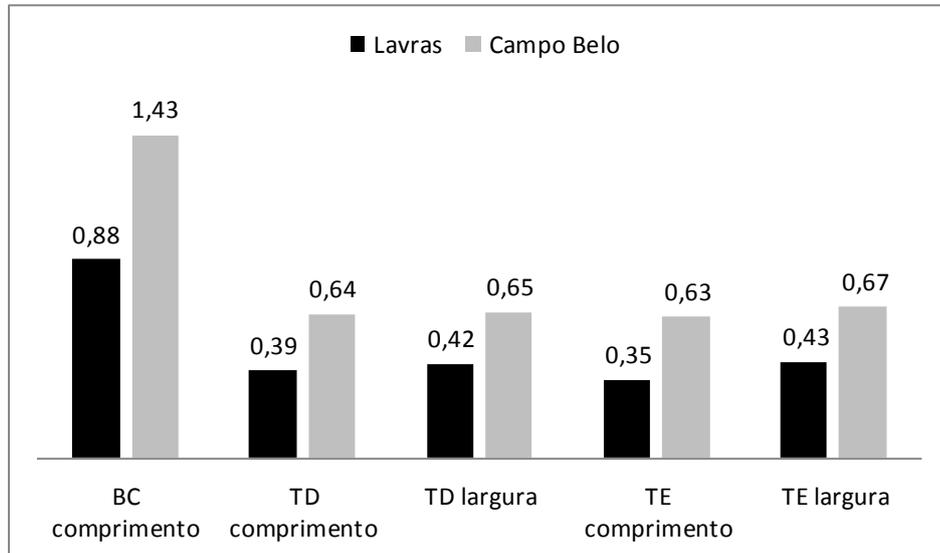
O comprimento e a largura da faringe (F), bem como a medida dos órgãos dos sistemas reprodutores masculino e feminino também são proporcionais ao tamanho do corpo dos helmintos e foram menores nos espécimes provenientes de Lavras em comparação com as amostras coletadas em bovinos de Campo Belo (Gráficos 3, 4 e 5). Assim, identificamos diferenças significativas, entre os espécimes provenientes dos dois municípios, em relação a estas medidas. Destacamos que os helmintos coletados em bovinos de Campo Belo são 24 a 40% maiores nestas estruturas do que os helmintos provenientes de Lavras.

Gráfico 3 - Comparação entre comprimento e largura da faringe de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de Lavras e Campo Belo – MG



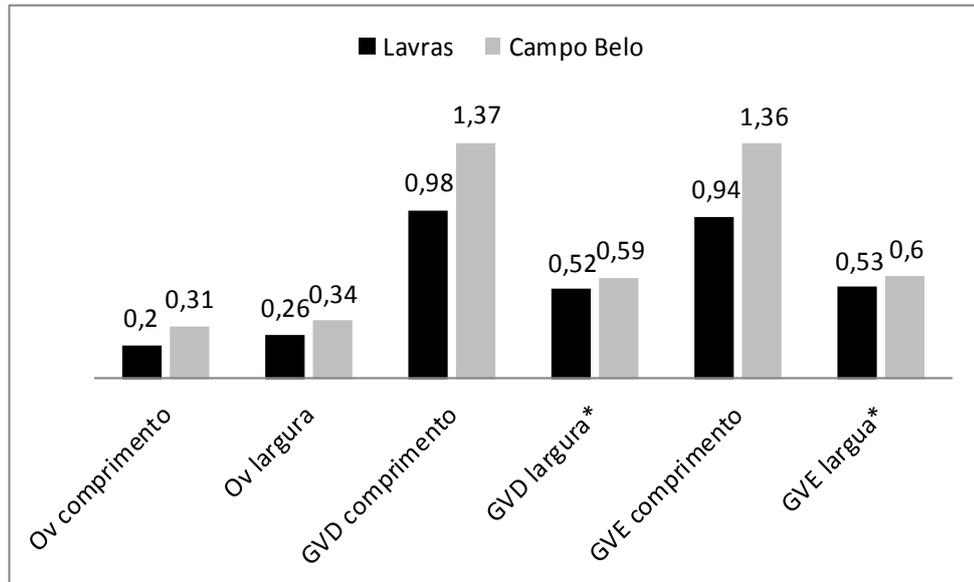
Legenda: Média das medidas expressas em milímetro.

Gráfico 4- Comparação entre comprimento e largura dos órgãos do sistema reprodutor masculino de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de Lavras e Campo Belo – MG



Legenda: BC – bolsa do cirro, TD – Testículo direito, TE – Testículo esquerdo. Média das medidas expressas em milímetro.

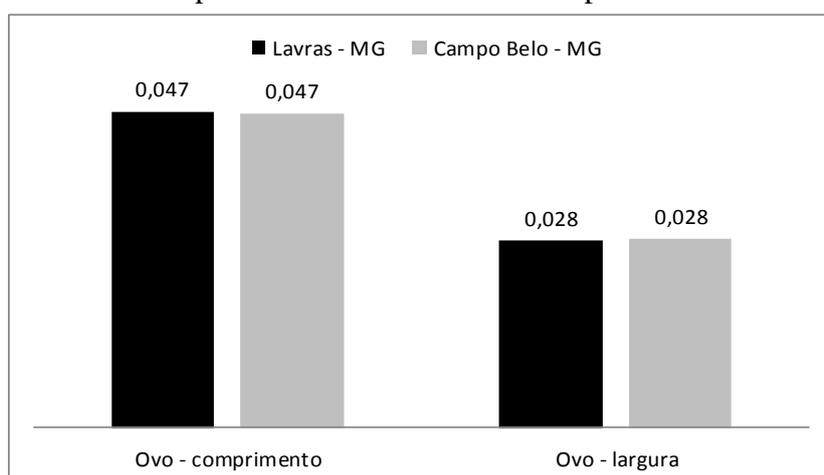
Gráfico 5- Comparação entre comprimento e largura dos órgãos do sistema reprodutor feminino de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de Lavras e Campo Belo – MG



Legenda: Ov – ovário, GVD – glândula vitelínica direita, GVE – glândula vitelínica esquerda. Média das medidas expressas em milímetro. * Não apresentou diferença significativa.

Apesar dos espécimes apresentarem diferenças significativas com relação à maioria dos caracteres citados, as estruturas taxonômicas utilizadas para o diagnóstico se mantiveram conservadas. O tamanho e a razão do comprimento/largura dos ovos intrauterinos foram as únicas medidas que se mantiveram lineares em todos os espécimes de ambas as localidades. Neste mesmo aspecto, a razão entre largura das ventosas oral/ventral (VO/VV) apresenta um resultado similar. Em relação às nossas análises estatísticas, estas estruturas não apresentaram diferença significativa, indicando serem caracteres taxonômicos adequados para auxiliar na identificação da espécie de acordo com a morfometria, e se tratando dos ovos poderia também ser aplicado em exame parasitológico de fezes de animais infectados (Gráfico 6).

Gráfico 6- Comparação entre comprimento e largura dos ovos intrauterinos de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de Lavras e Campo Belo – MG



Legenda: Média das medidas expressas em milímetro.

Ao realizarmos uma comparação dos dados morfométricos do presente estudo com dados de estudo anterior (LEITE, 2015) observamos que a relação da largura da ventosa oral pela largura da ventosa ventral e as medidas dos ovos intrauterinos são caracteres morfométricos que não apresentam diferença significativa independente do local de procedência (Tabela 8).

Tabela 8- Análise estatística (ANOVA) dos caracteres morfológicos estudados através de morfometria de *Eurytrema coelomaticum* do presente estudo (MG - Lavras e Campo Belo) em comparação a espécimes do RJ (Santa Cruz e Barra Mansa) e da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) (LEITE, 2015)

Características	LA	LA	LA	LA	CB	CB	CB	SC	SC	BM
	x CB	x SC	x BM	x CHIOC	x SC	x BM	x CHIOC	x BM	x CHIOC	x CHIOC
Comprimento corpo (CC)										
Largura corpo (LC)										
Relação CC/LC										
Distância entre A-VV										
Comprimento VO										
Largura VO										
Comprimento VV										
Largura VV										
Relação VO/VV										
Distância entre VO-VV										
Comprimento faringe										
Largura faringe										
Comprimento BC										
Comprimento T direito										
Largura T direito										
Comprimento T esquerdo										
Largura T esquerdo										
Comprimento ovário										
Largura ovário										
Comprimento GV direita										
Largura GV direita										
Comprimento GV esquerda										
Largura GV esquerda										
Distância entre VV-P										
Distância entre Ce-P										
Comprimento ovo uterino										
Largura ovo uterino										
Ovo C/L										

 Sem diferença significativa

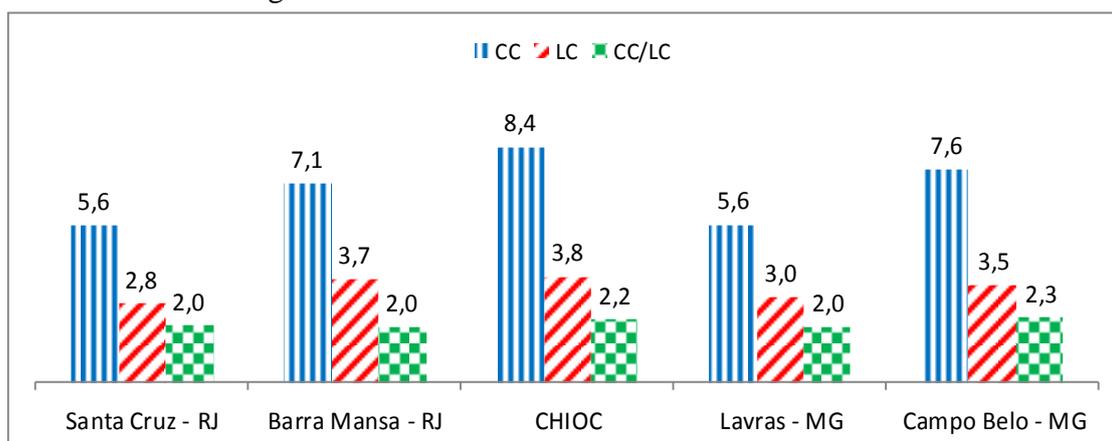
 Com diferença significativa

Legenda: Análise de variância (ANOVA) quando há diferença significativa $P \leq 0,005$. LA- Lavras (n=25); CB- Campo Belo (n=25); SC- Santa Cruz (n=25); BM- Barra Mansa (n=25), depositados na CHIOC- Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (n=5). CC/LC- comprimento do corpo pela largura do corpo; A-VV- região anterior do corpo e ventosa ventral; VO- ventosa oral, VV- ventosa ventral; GV- glândula vitelínica; VV-P- ventosa ventral e região posterior do corpo; Ce-P- porção final do ceco e região posterior do corpo; C/L- relação do comprimento pela largura.

Segundo a análise estatística de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*, os valores de vinte e quatro características apresentaram diferença significativa entre espécimes das cinco procedências analisados neste trabalho. Porém, foi observado que os espécimes das diferentes localidades, quando comparados entre si, apresentaram o tamanho de suas estruturas proporcional ao tamanho do corpo dos helmintos.

Os espécimes provenientes de Minas Gerais e Santa Catarina analisados em amostras obtidas na CHIOC apresentaram o comprimento do corpo 10 a 33% maior que os helmintos das demais localidades. Quando realizamos a relação do comprimento pela largura do corpo, apesar de haver diferença significativa entre os espécimes de Lavras x Campo Belo ($P = 0,0156$) e Campo Belo x Barra Mansa ($P = 0,0084$), a média deste parâmetro se apresentou aproximada (Gráfico 7).

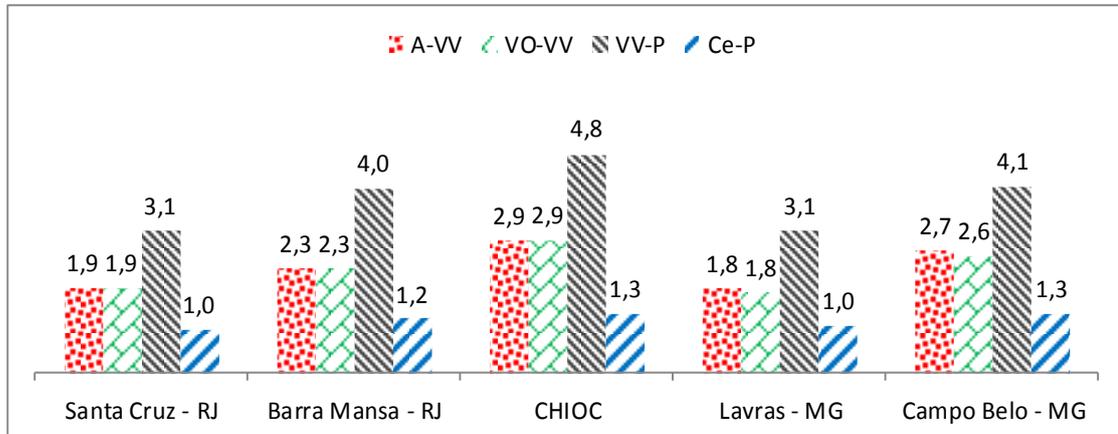
Gráfico 7 - Comparação do comprimento do corpo, largura e da relação comprimento/ largura do corpo de *Eurytrema coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais



Legenda: CC- comprimento do corpo, LC- largura do corpo, CC/LC – relação do comprimento pela largura do corpo. CHIOC – Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz. Média das medidas expressas em milímetro.

A comparação das distâncias entre: região anterior e ventosa ventral; ventosa oral e ventosa ventral; ventosa ventral e região posterior do corpo; porção final do ceco e região posterior do corpo mostrou uma aproximação morfométrica, não apresentando diferença significativa, entre os espécimes de Lavras e Santa Cruz e entre os espécimes de Campo Belo e da CHIOC. (Gráfico 8).

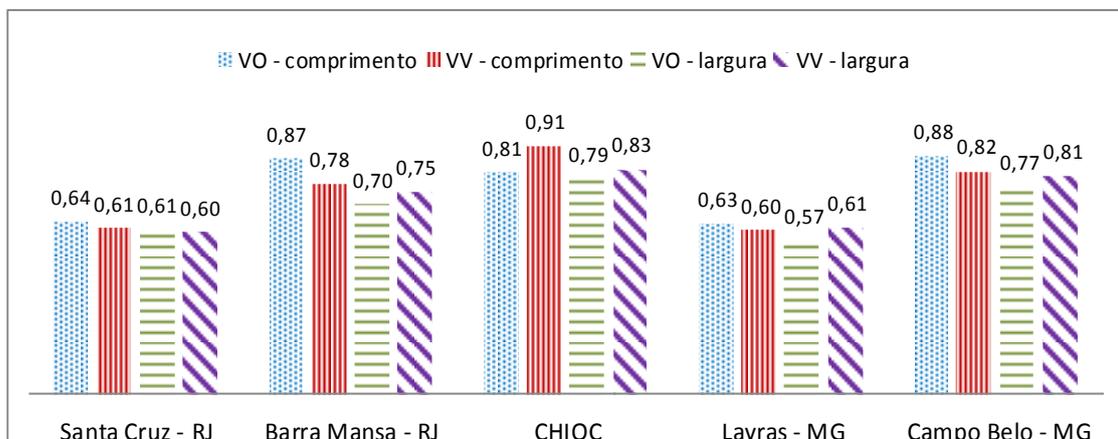
Gráfico 8- Comparação das distâncias entre: região anterior e ventosa ventral; ventosa oral e ventosa ventral; ventosa ventral e região posterior do corpo; porção final do ceco e região posterior do corpo de *Eurytrema coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais



Legenda: A-VV- distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral, VO-VV – distância entre ventosas, VV-P- distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo, Ce-P- distância entre ceco e região posterior do corpo. CHIOC – Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz. Média das medidas expressas em milímetro.

Comparando o comprimento e a largura das ventosas oral e ventral, os espécimes de Santa Cruz e Lavras mantiveram sua aproximação morfométrica, enquanto Campo Belo apresentou similaridade tanto com os espécimes de Barra Mansa quanto com os espécimes da CHIOC. Estes não apresentaram diferença estatística significativa (Gráfico 9).

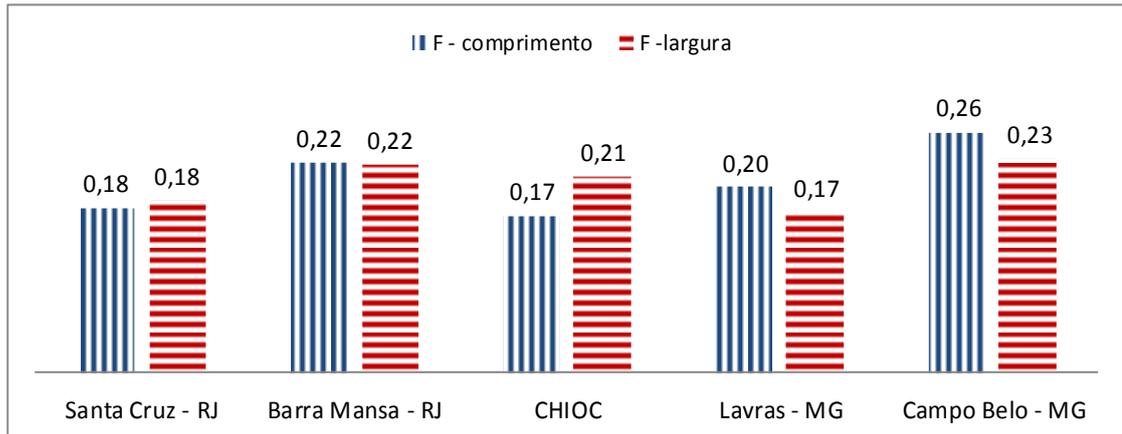
Gráfico 9- Comparação do comprimento e da largura das ventosas oral e ventral de *Eurytrema coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais



Legenda: VO- ventosa oral, VV- ventosa ventral. CHIOC – Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz. Média das medidas expressas em milímetro.

O comprimento e a largura da faringe apresentam diferença estatística entre a maioria dos grupos. Logo, não apresentaram um padrão morfométrico nos espécimes das diferentes localidades. Os valores médios do comprimento da faringe variaram de 0,18 mm nas amostras de Santa Cruz e 0,26 mm nos espécimes de Campo Belo. (Gráfico 10).

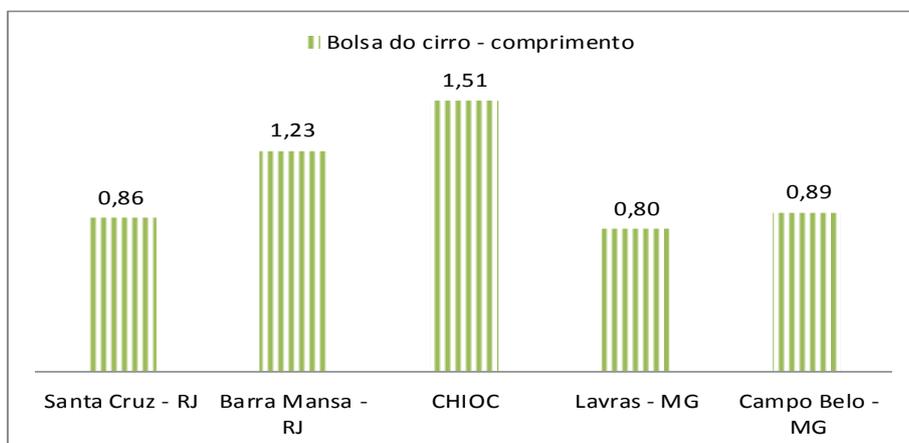
Gráfico 10- Comparação do comprimento e largura da faringe de *Eurytrema coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais



Legenda: F- faringe. CHIOC – Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz. Média das medidas expressas em milímetro.

A análise estatística do comprimento da bolsa do cirro mostrou que as localidades de Santa Cruz e Lavras não apresentaram diferença significativa, assim como Campo Belo e CHIOC. Ainda assim, as amostras depositadas na CHIOC apresentaram um tamanho médio de 18 a 47% maior do que os espécimes das demais localidades (Gráfico 11).

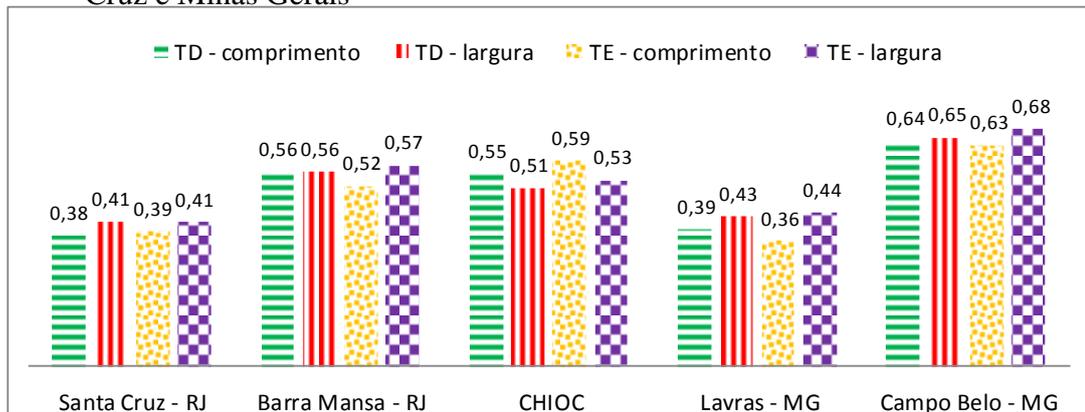
Gráfico 11- Comparação do comprimento da bolsa do cirro de *Eurytrema coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais



Legenda: Valores das médias. CHIOC- Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo. Média das medidas expressas em milímetro.

O comprimento e a largura dos testículos não apresentou diferença significativa no teste estatístico entre os espécimes de Lavras e Santa Cruz, assim como na amostragem de Campo Belo e da CHIOC. Apesar de não haver diferença significativa entre os helmintos da CHIOC e de Campo Belo, notamos que a média destas características foi 17% maior nos espécimes de Campo Belo (Gráfico 12).

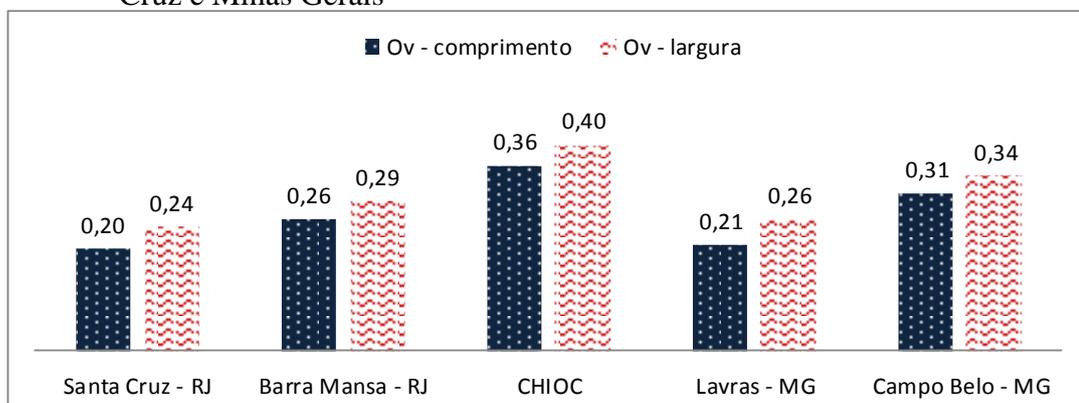
Gráfico 12- Comparação do comprimento e largura dos testículos de *Eurytrema coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais



Legenda: TD- testículo direito; TE – testículo esquerdo. CHIOC – Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz. Média das medidas expressas em milímetro.

Os valores médios do comprimento e da largura do ovário dos espécimes de Santa Cruz e Lavras não apresentaram diferença significativa. Campo Belo se aproximou tanto da CHIOC quanto de Barra Mansa. Foi possível visualizar que as amostras da CHIOC apresentam um valor médio pelo menos 15% maior que as demais localidades (Gráfico 13).

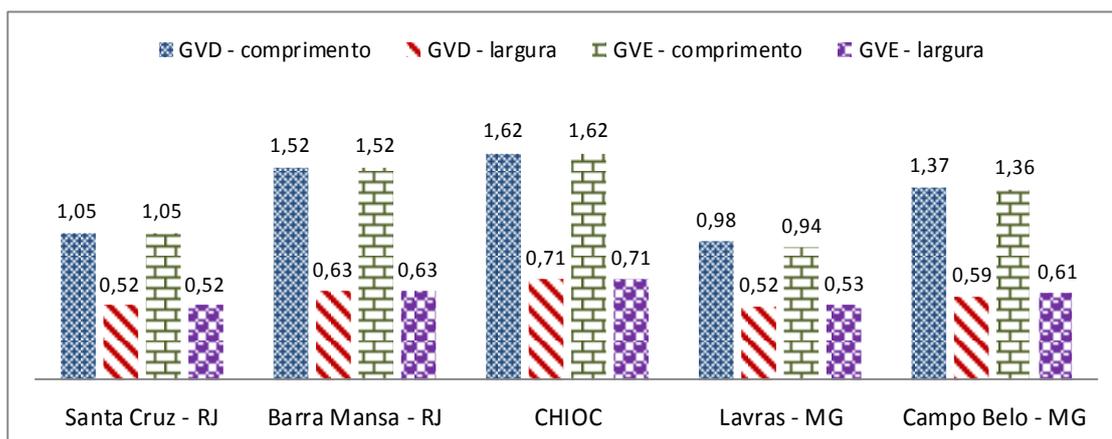
Gráfico 13- Comparação do comprimento e largura do ovário de *Eurytrema coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais



Legenda: Ov - ovário. CHIOC – Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz. Média das medidas expressas em milímetro.

Na comparação do comprimento e largura das glândulas vitelínicas os espécimes de Santa Cruz e Lavras não apresentaram diferença significativa, com medidas 33% menores que as demais localidades. Por sua vez, Barra Mansa, CHIOC e Campo Belo se aproximaram nesta característica com tamanhos similares, sem diferença significativa entre si (Gráfico 14).

Gráfico 14- Comparação do comprimento e largura das glândulas vitelínicas de *Eurytrema coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro, Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz e Minas Gerais



Legenda: GVD- glândula vitelínica direita; GVE- glândula vitelínica esquerda. CHIOC – Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz. Média das medidas expressas em milímetro.

De maneira geral, os espécimes de Lavras e Santa Cruz apresentaram similaridade morfológica em 100% dos caracteres, não apresentando diferença estatística em nenhuma característica analisada. Já os espécimes de Campo Belo, Barra Mansa e depositados na CHIOC apresentaram similaridade em 67,85% dos caracteres mensurados.

As características que se destacam por não apresentarem diferença significativa em nenhum espécime das 5 diferentes procedências são: a relação entre largura da ventosa oral pela largura da ventosa ventral que apresentou valor igual a aproximadamente 1; a largura e o comprimento dos ovos que apresentou um valor médio de 0,027-0,028 e 0,042-0,047 mm respectivamente, assim como a relação do comprimento/largura dos ovos que teve valores entre 1,5-1,56.

3.2 Morfologia geral

Os espécimes analisados (vinte e cinco provenientes de Lavras e vinte e cinco de Campo Belo) apresentaram todas as características morfológicas que confirmam a identificação da espécie como *E. coelomaticum* (Figura 7 A e B).

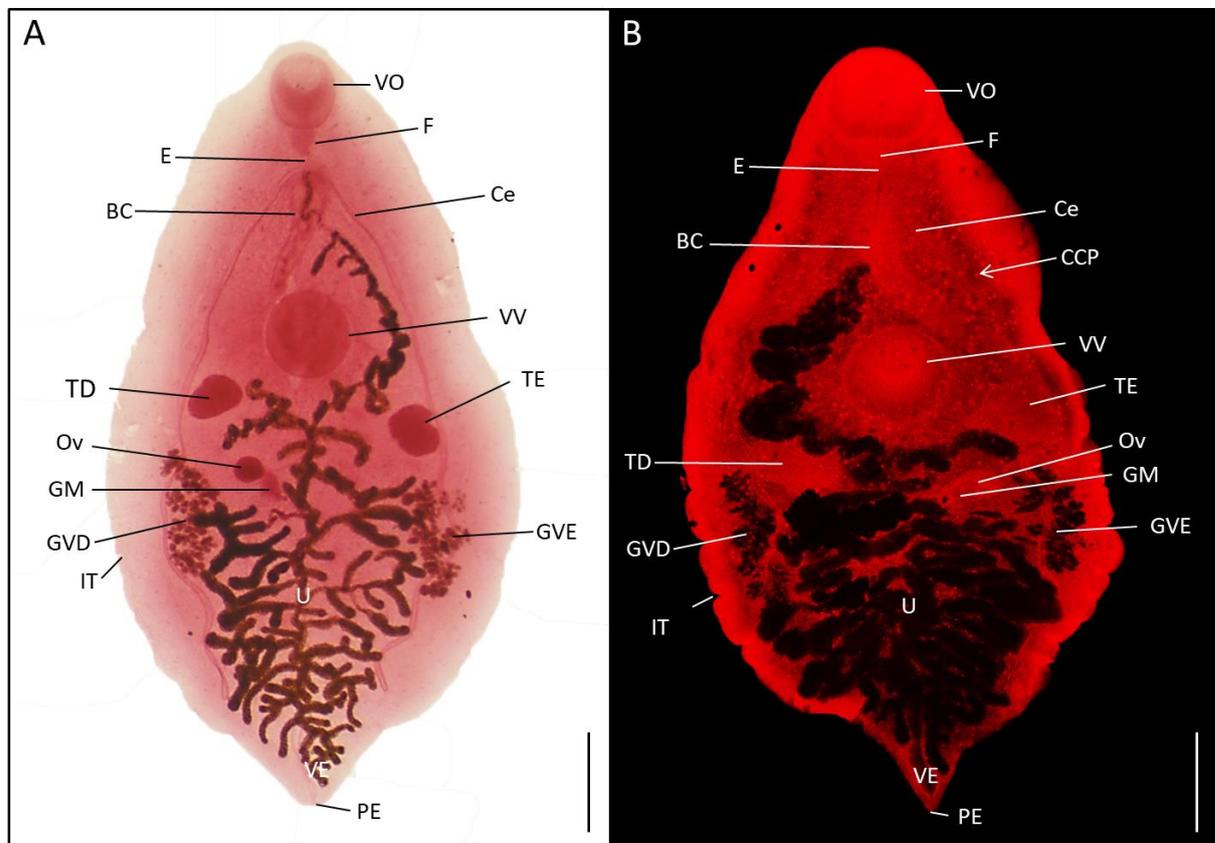
Corpo achatado dorsoventralmente com formato ovoide a piriforme; margem do corpo ondulada formando invaginações no tegumento; superfície do tegumento apresentando cristais cúbicos de proteínas; ventosa oral subterminal de tamanho subigual ao da ventosa ventral e localizada na região pré-equatorial no terço médio do corpo; ausência de pré-faringe; faringe pequena, situada logo abaixo da ventosa oral, de formato arredonda a alongado; esôfago curto e bifurcado; e cecos delgados e sinuosos que se estendem até a porção posterior do corpo do parasito, onde ocorre afileamento do corpo do helminto. O sistema reprodutor masculino apresenta dois testículos globosos e arredondados com diâmetros subiguais, localizados após a ventosa ventral na região mediana do corpo em campos afastados; a bolsa do cirro é claviforme e volumosa, localizada abaixo da bifurcação do esôfago e acima da ventosa ventral, com sua porção final voltada para o mesmo lado do ovário, podendo estar mais próxima da ventosa ventral ou sendo sobreposta por ela. O sistema reprodutor feminino é constituído por um ovário esférico e pequeno, ligeiramente posicionado abaixo de um dos testículos, sobrepondo o receptáculo seminal, seguido pelo complexo da glândula de Mehlis; oótipo submedianos, localizados entre ovário e reservatório vitelínico. Ductos vitelínicos estreitos, situados abaixo do reservatório vitelínico, ligando-se as glândulas vitelínicas laterais que são constituídas por folículos reunidos em grupos “cachos de uvas”, localizando-se abaixo dos testículos e, normalmente, sobrepõem e terminam antes do fim dos cecos. O útero é longo, ramificado e ocupa a maior parte do interior do corpo do parasito, é intracecal, se estendendo desde a região posterior à ventosa ventral até próximo à região distal. Algumas alças uterinas alcançam a região anterior a ventosa ventral para onde se conectam ao gonoporo, local onde ocorre a eliminação dos ovos. Estes que são elipsoides, operculados e com casca espessa de cor castanho-caramelo a marrom. O poro excretor é terminal e a vesícula excretora apresenta forma em T com ramificações que contornam grande parte da lateral do corpo do helminto.

Algumas anormalidades morfológicas também foram visualizadas, como: a presença de apenas um testículo, dois testículos posicionados no mesmo lado do corpo, apenas uma

glândula vitelínica e até a ausência de ovário. Essas anomalias, não são frequentes e foram identificadas em 16% das amostras de Campo Belo e 8% das amostras de Lavras.

Vale destacar que a posição do ovário não segue um padrão, pois ao orientarmos todos os helmintos na mesma posição, sempre os observando pela face ventral, identificamos o ovário localizado no lado direito (Lavras: 44% e Campo Belo 50%), bem como do lado esquerdo (Lavras: 56% e Campo Belo 50%) do corpo do helminto. A porção final da bolsa do cirro segue esta orientação, sempre voltada para o mesmo lado do ovário.

Figura 7 - Morfologia geral de *Eurytrema coelomaticum*

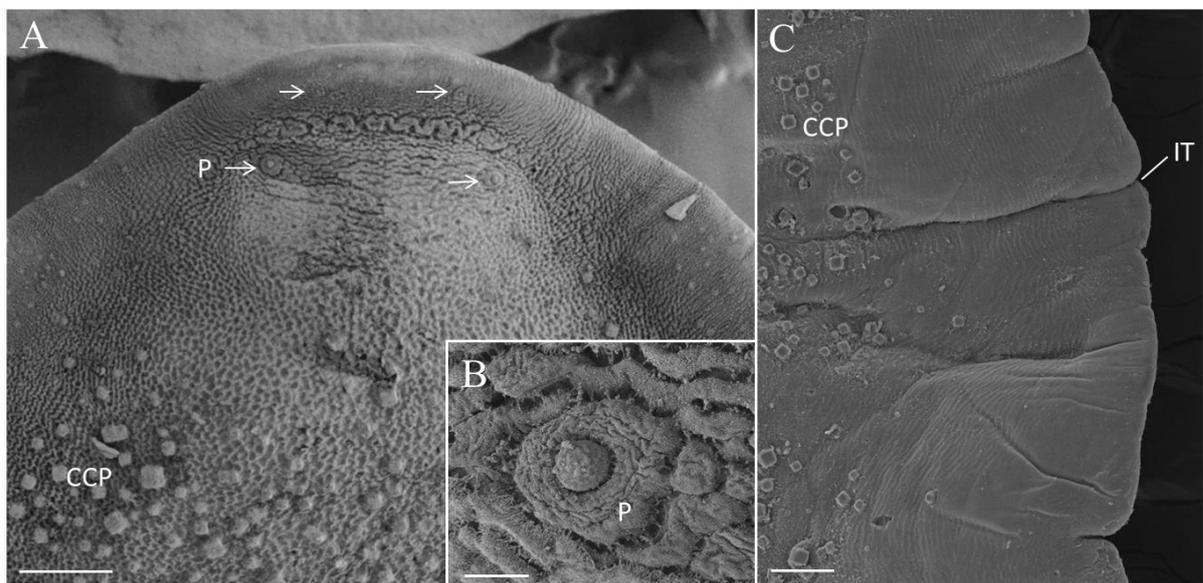


Legenda: Morfologia geral de *Eurytrema coelomaticum* adulto por estereomicroscopia (A) e fluorescência (B). VO – ventosa oral, F – faringe, E – esôfago, Ce – ceco, VV – ventosa ventral, TD – testículo direito, TE – testículo esquerdo, Ov – ovário, GM – complexo da glândula de Mehlis, GVD – glândula vitelínica direita, GVE – glândula vitelínica esquerda, U – útero, IT – invaginações do tegumento, VE – vesícula excretora, PE – poro excretor, CCP – cristais cúbicos de proteínas. Escala de 1 mm.

3.2.1. O tegumento

A superfície do tegumento destes helmintos apresenta uma topografia rugosa com inclusões de cristais cúbicos de proteínas (CCP), tanto na superfície ventral quanto dorsal, que é um padrão do gênero *Eurytrema*. Utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) conseguimos observar que a camada tegumentar sincicial apresenta um padrão de "favo de mel". Pela primeira vez identificamos a presença de papilas na face dorsal da região anterior, onde quatro papilas simétricas estão distribuídas formando um trapézio, sendo as duas anteriores com menor diâmetro, próximas entre si e dispostas mais a borda do corpo e as duas papilas posteriores, apresentam maior diâmetro e maior distância entre si (Figura 8 A e B). É comum o corpo apresentar "pregas" na região lateral com profundidade variada e intervalos irregulares. Estas invaginações tegumentares (Figura 8 C) podem estar relacionadas ao aumento da superfície do tegumento para facilitar a trocas de substâncias com o meio externo.

Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície do tegumento de *Eurytrema coelomaticum*

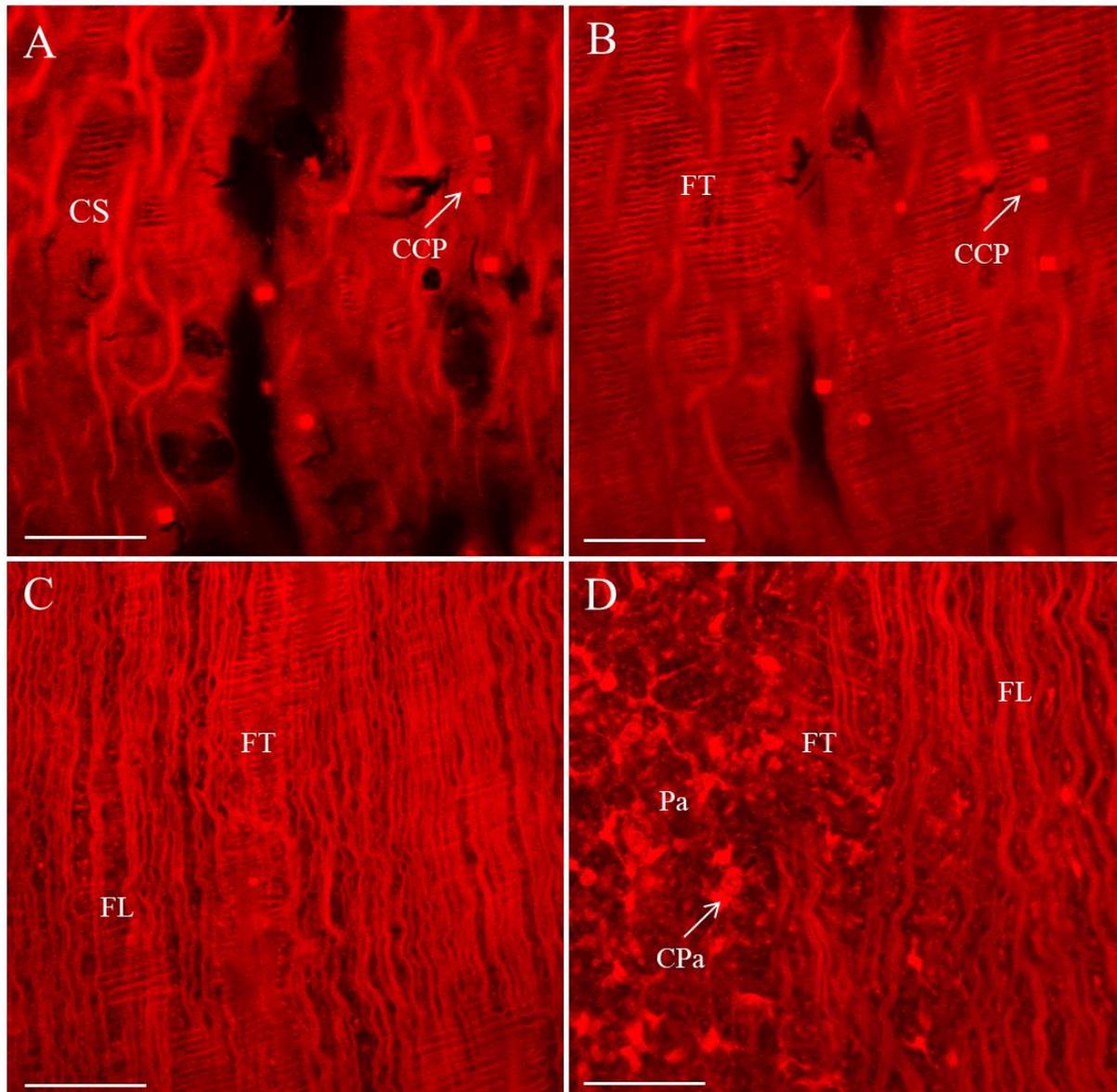


Legenda: A – Face dorsal apresentando tegumento rugoso com papilas (P) e cristais cúbicos de proteína (CCP); B- Papila em aumento; C– visão da margem do corpo com invaginações no tegumento (IT). Escalas: A e C: 100 μm e B: 10 μm .

Os cristais cúbicos de proteínas se originam na camada sincicial externa do tegumento e se projetam para superfície. A camada sincicial se organiza entre a superfície do tegumento e a membrana basal. Mais internamente, organizam-se espessas e densas fibras musculares

que se distribuem, intercalando feixes longitudinais e transversais, formando uma rede muscular que se torna menos densa na medida em que se aproxima do parênquima. Este tecido mais interno é constituído por células parenquimatosas justapostas, preenchendo e dando estrutura ao corpo do helminto (Figura 9).

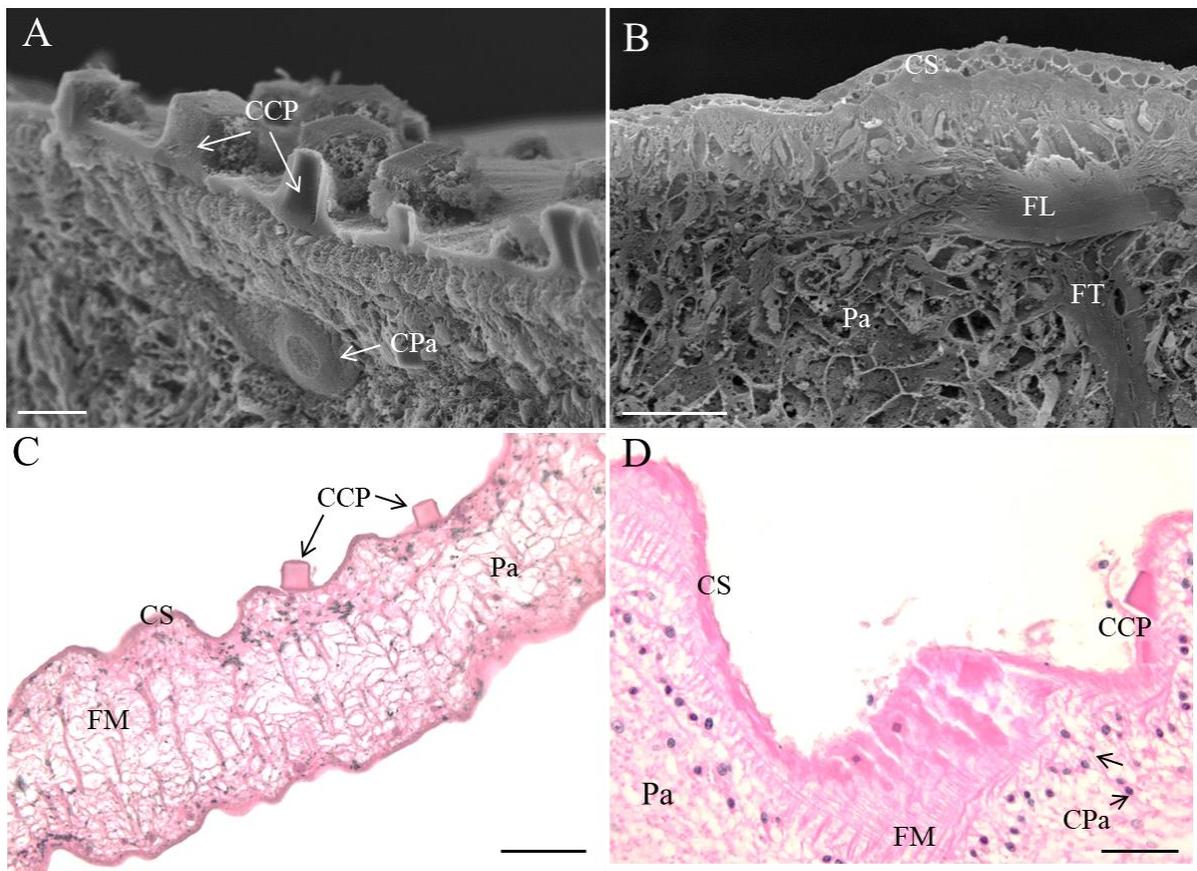
Figura 9 – Microscopia de luz (confocal) destacando a organização do tegumento, camada musculatura e parênquima de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Cortes ópticos destacando diferentes planos do tegumento de *Eurytrema coelomaticum*. A – face externa, mais próxima da superfície do tegumento, B e C – zona intermediária e D – região mais interna, mostrando a camada sincicial (CS) com cristais cúbicos de proteínas (CCP), fibras musculares transversais (FT) e longitudinais (FL) e o interior do corpo do Trematoda apresentando o parênquima (Pa) totalmente preenchido por células parenquimatosas (CPa). Escalas: 50 μ m.

Os resultados obtidos com a análise dos parasitos submetidos à Criofratura/MEV e por histologia nos permitiu detalhar as camadas da parede do corpo, desde o tegumento (mais externo) até o parênquima. As fraturas que expuseram o tegumento possibilitaram detalhar a distribuição dos cristais cúbicos de proteínas, que se projetam para o meio externo a partir da camada sincicial. A membrana basal está estruturada por densas fibras musculares e internamente células grandes estão “mergulhadas” no parênquima (Figura 10 A-D).

Figura 10 – Criofratura seguida de microscopia eletrônica de varredura e corte histológico por microscopia de luz de *Eurytrema coelomaticum* mostrando o tegumento, musculatura e parênquima em corte sagital

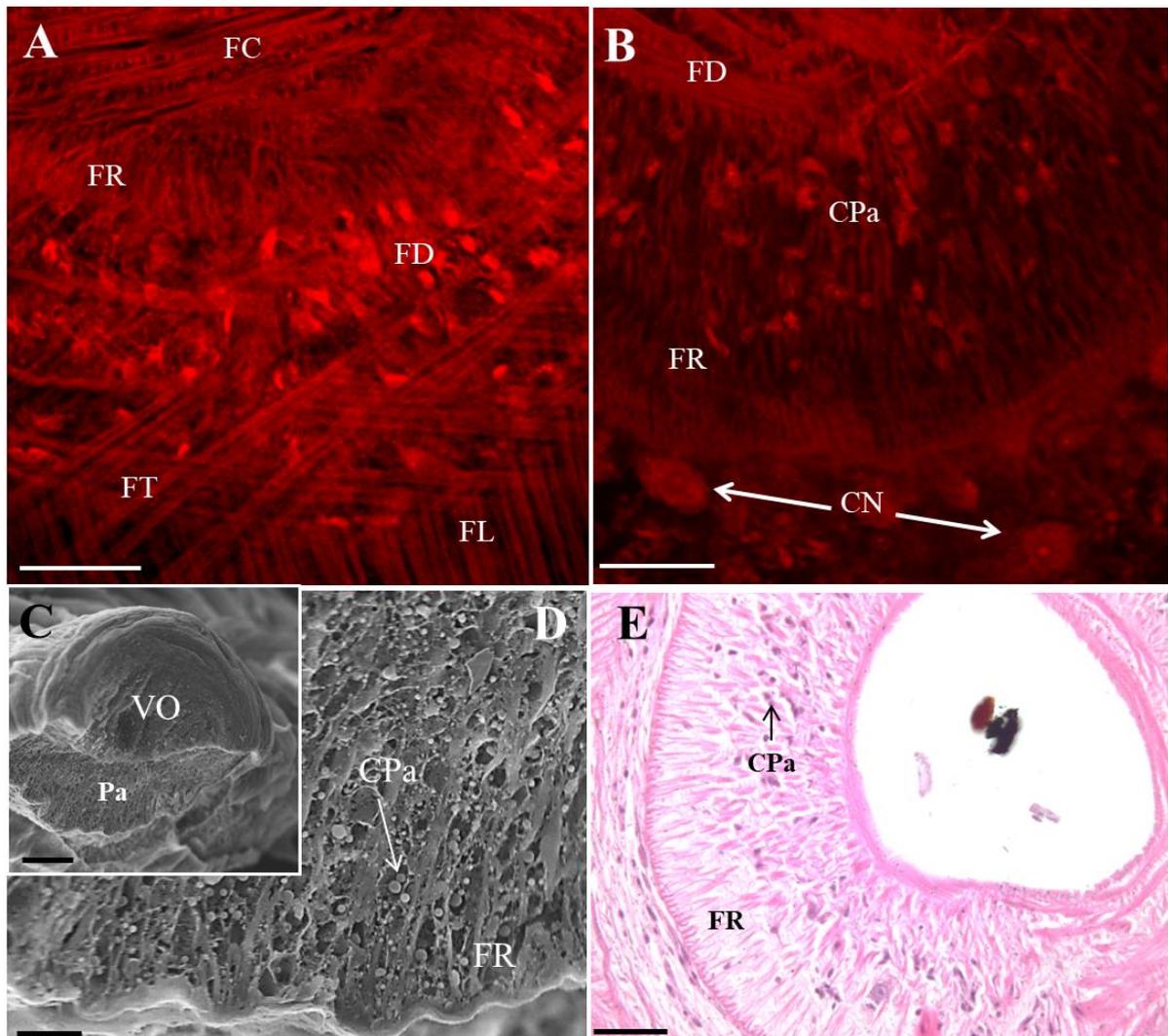


Legenda: A e B – Criofratura e MEV, C e D – Microscopia de luz. A – Cristais cúbicos de proteína (CCP) projetados pela camada sincicial do tegumento e célula do parênquima (CPa) interno; B – Camada sincicial (CS), Fibras musculares longitudinais (FL) e transversais (FT) e parênquima (Pa). C e D – Cortes sagitais mostrando a camada sincicial (CS), os cristais cúbicos de proteína (CCP), a camada muscular com fibras musculares (FM) longitudinais e transversais transpassadas e o parênquima (Pa) contendo várias células parenquimatosas (CPa). Escalas: A e B: 20 μm , C e D: 50 μm .

3.2.2 As ventosas

As duas ventosas apresentam uma organização muscular densa que são importantes para fixação do parasito no hospedeiro. A ventosa oral apresenta um complexo sistema de fibras musculares que, a partir das imagens de microscopia confocal, foi possível observar que estão dispostas radialmente, sobrepondo as demais fibras que se dispõem de forma circular, diagonal, transversal e longitudinal (Figura 11 A). A morfologia da ventosa é sustentada pelo preenchimento de células parenquimatosas que possuem células com núcleos de tamanhos diferentes, sendo as de núcleo maior em menor número (Figura 11 B-E).

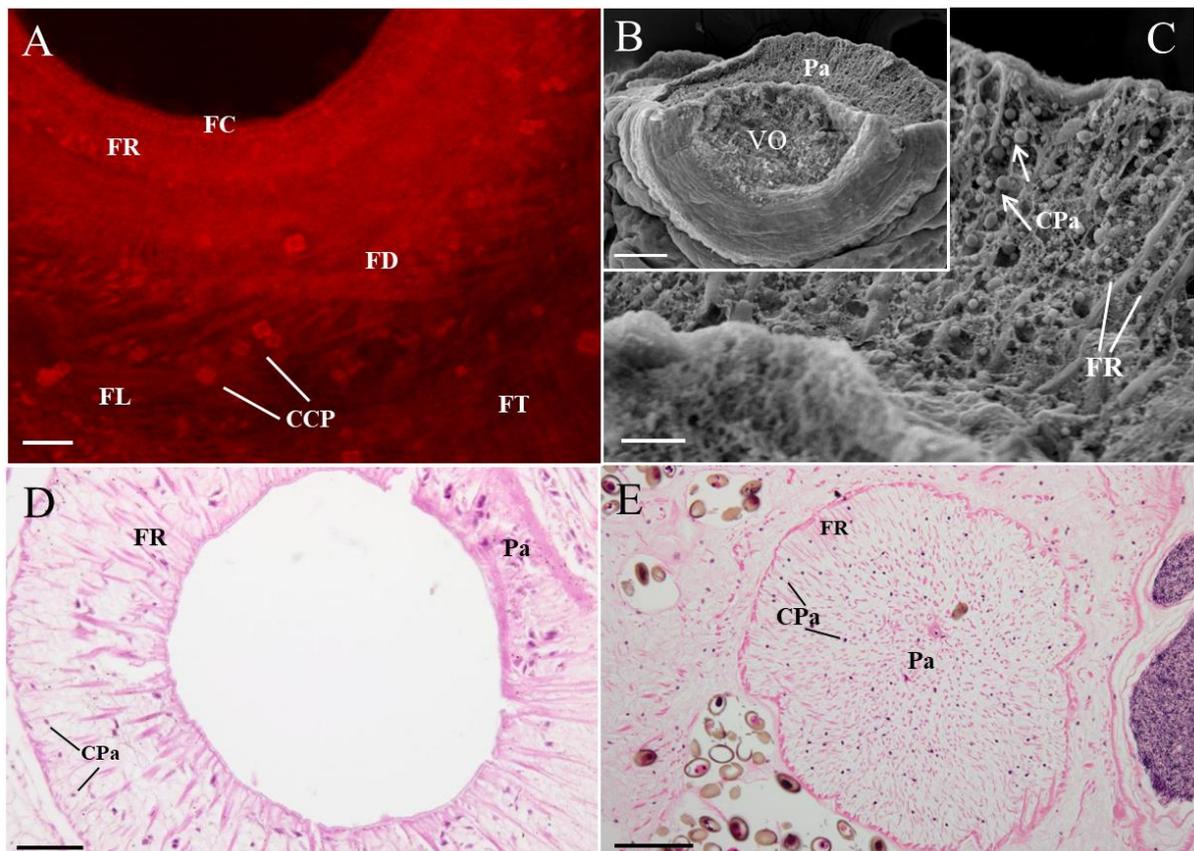
Figura 11 – Ventosa oral de *Eurytrema coelomaticum* analisada por microscopia de luz (campo claro e confocal) e eletrônica de varredura



Legenda: Ventosa oral - A e B – Microscopia confocal, C e D - Corte histológico coronal, E - MEV por criofratura. Fibras musculares diagonais (FD), radiais (FR), transversais (FT) e longitudinais (FL), células do parênquima (CPa) e células com grandes núcleos (CN). Escalas: A, B e E 50 μm, C: 100 μm, D: 20 μm.

Como era de se esperar, a ventosa ventral também segue este padrão e apresenta um arranjo denso e complexo de fibras musculares. Nossa análise de microscopia confocal, evidenciou feixes radiais, circulares, diagonais, transversais e longitudinais, assim como, inclusões de cristais de proteínas distribuindo-se pelo tegumento que contorna a ventosa (Figura 12 A). A criofratura/MEV associada à histologia nos possibilitou mostrar a organização das fibras radiais, que fazem uma ponte unindo a base da ventosa com a margem que circunda a borda central. Estas fibras sustentam a ventosa, em associação com as células parenquimatosas que preenchem o conteúdo interno desta importante estrutura de fixação dos trematódeos (Figura 12 B, C, D e E).

Figura 12 – Ventosa ventral de *Eurytrema coelomaticum* analisada por microscopia de luz (campo claro e confocal) e eletrônica de varredura

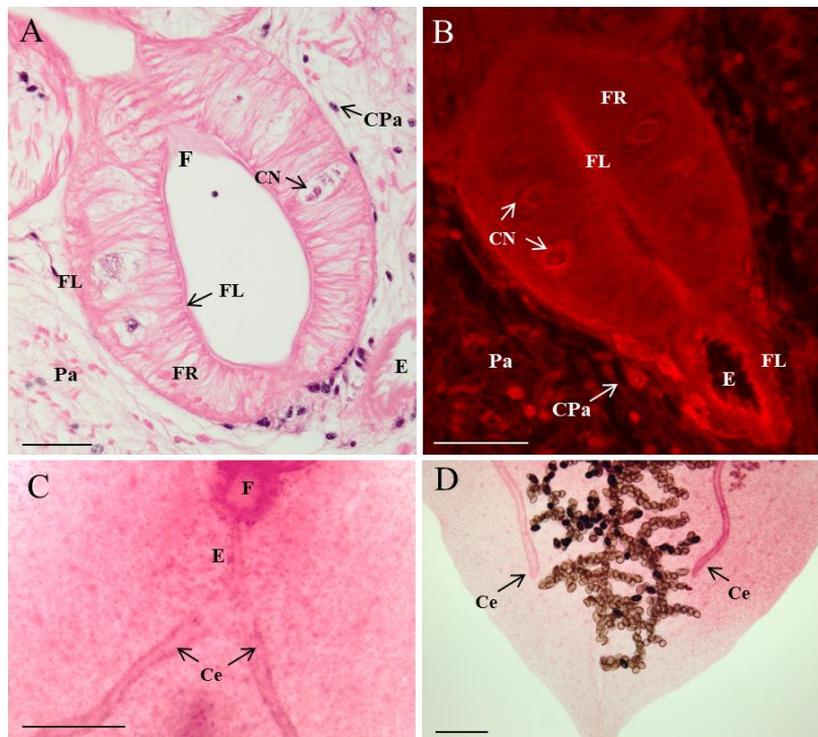


Legenda: Ventosa ventral: A – Microscopia confocal, B e C - MEV por criofratura, D e E - Corte histológico coronal superficial e interno. Fibras musculares circulares (FC), radiais (FR), transversais (FT) e longitudinais (FL), cristais cúbicos de proteínas (CCP), parênquima (Pa), células do parênquima (CPa). Escalas: A: 50 μm , B: 100 μm , C: 20 μm , D: 50 μm e E: 100: 100 μm .

3.2.3 O sistema digestório

Logo após a ventosa oral, internamente, se inicia a organização do sistema digestório, disposto no helminto desde a região anterior se estendendo até a região posterior. Este é formado por uma faringe muscular (Figura 13 A-B) que se conecta ao esôfago bifurcado formando dois cecos. Em cortes histológicos e por microscopia confocal, destacamos a morfologia elipsoide da faringe que é circundada por uma parede muscular espessa com grande quantidade de fibras radiais. O contorno da faringe é marcado por fibras longitudinais (externas e internas) e apresenta células parenquimatosas, que se associam com toda estrutura muscular, e possuem o núcleo muito evidente (Figura 13 A-B). O esôfago, que se encontra imediatamente após a faringe, apesar de ser uma estrutura mais delgada, apresenta um contorno demarcado por fibras longitudinais, também são observadas algumas células glandulares na periferia desta região esofágica (Figura 13 A-B). Os cecos ainda mais delgados, sem estrutura muscular evidente, apresentam uma morfologia geral sinuosa, terminando um pouco antes da região terminal do corpo (Figura 13 C-D).

Figura 13 – Microscopia de luz (corte histológico, confocal e campo claro) da faringe muscular e esôfago de *Eurytrema coelomaticum*

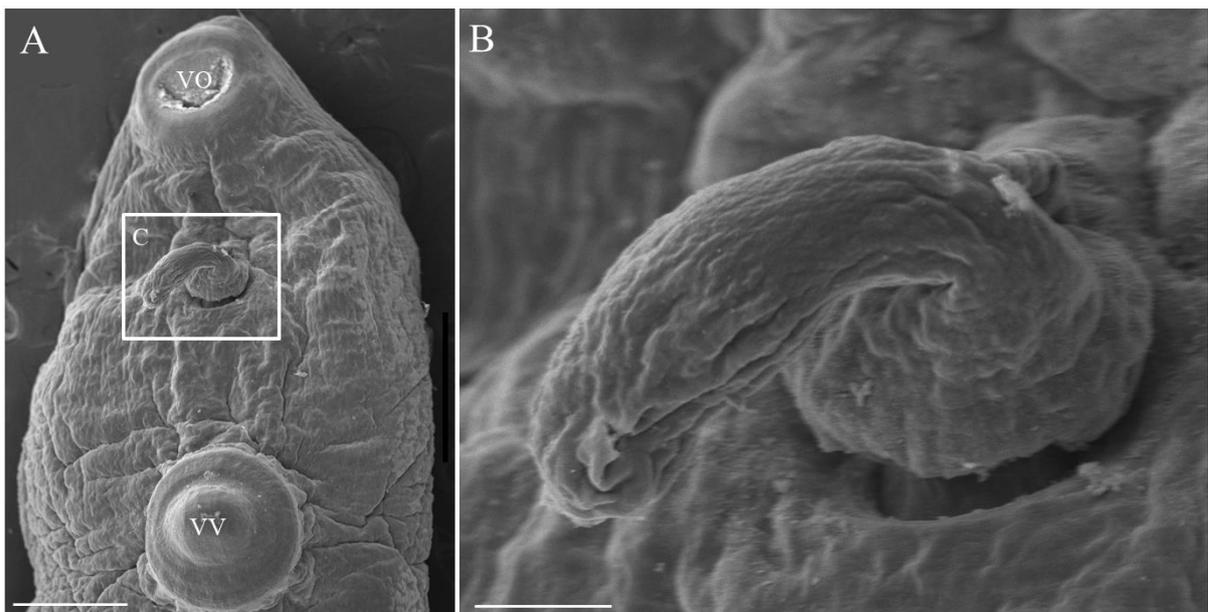


Legenda: A – corte histológico longitudinal da faringe e esôfago, B – microscopia confocal da faringe, C – D – microscopia de luz (campo claro) do esôfago. Abreviação: Fibras radiais (FR), fibras longitudinais (FL), faringe (F), células nucleares (CN), parênquima (Pa), células do parênquima (CPa), esôfago (E), cecos (Ce). Escalas: A-B: 50 μ m, C-D: 200 μ m.

3.2.4 O sistema reprodutor masculino

As principais estruturas do sistema reprodutor masculino estão abrigadas dentro da membrana fibrosa do saco cirroso, incluindo a vesícula seminal, glândula prostática, ducto ejaculatório e o cirro. Dois testículos podem ser distinguidos nas laterais do corpo e posicionados na mesma linha do ceco. Explorando os resultados obtidos por MEV, foi possível identificar entre as ventosas, o cirro extrovertido, curvando-se lateralmente e, em detalhe, mostramos que a sua superfície apresenta algumas rugosidades, porém sem ornamentações mais destacadas (Figura 14).

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura do órgão copulador de *Eurytrema coelomaticum*

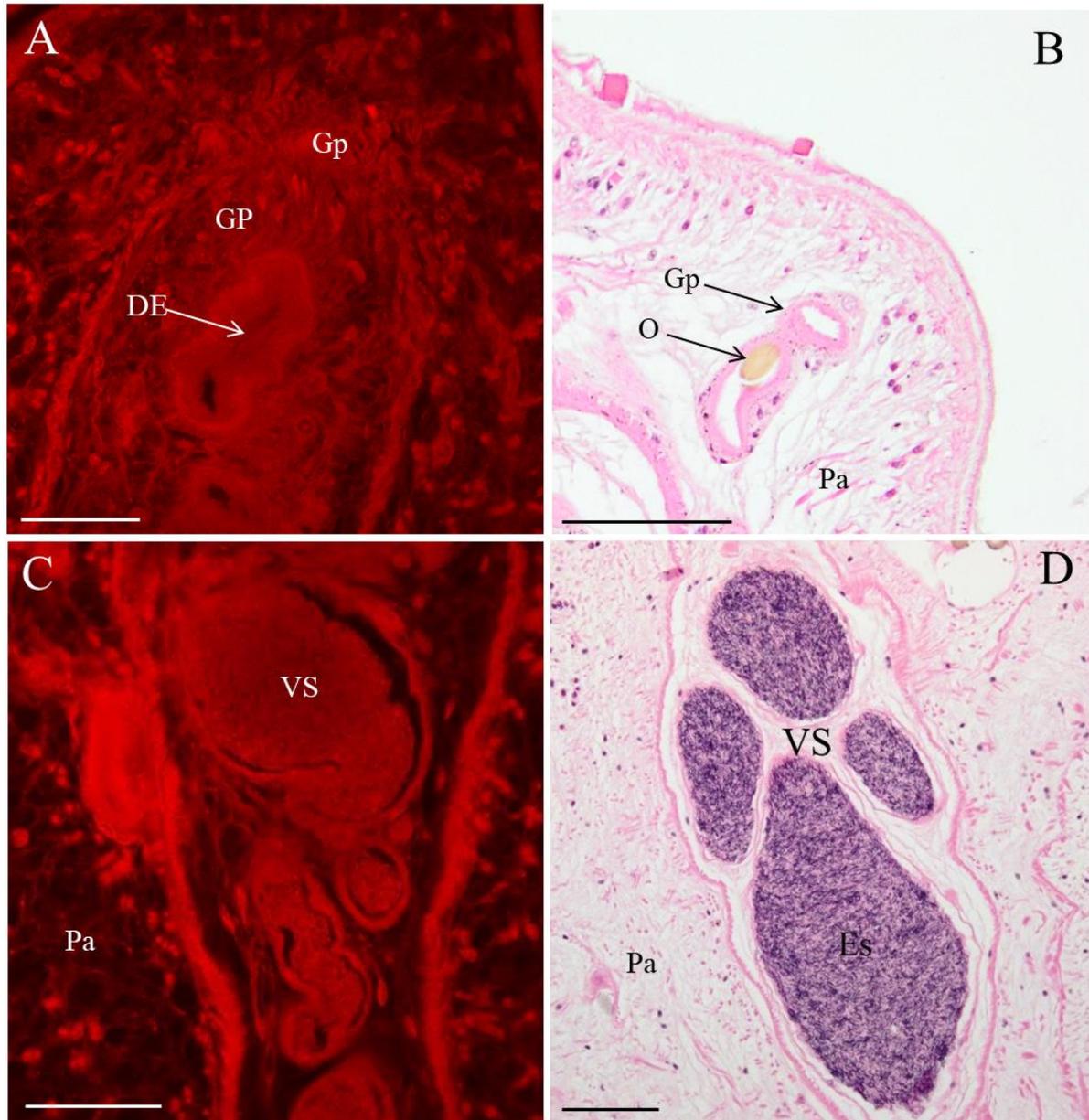


Legenda: Face ventral de *Eurytrema coelomaticum*. A – ventosa oral (VO), cirro (C) em destaque e ventosa ventral (VV); B – detalhe do cirro curvado lateralmente. Escalas A: 500 μm e B: 100 μm .

As imagens obtidas por confocal nos mostram a bolsa do cirro formada por uma parede bem desenvolvida, com uma abertura muscular para o poro genital (gonoporo) e estas estruturas também foram detalhadas por histologia em corte de orientação sagital. O gonoporo, estrutura por onde o cirro se projeta, onde são depositados os espermatozoides e, também eliminados os ovos, apresenta uma estrutura fibrosa (Figura 15 A-B). Neste mesmo complexo estrutural, o ducto ejaculatório central se organiza em forma de “S” e apresenta células secretoras externas ao redor do ducto (Figura 15 A). A glândula prostática é bem

desenvolvida, de paredes espessas e preenchida por células alongadas (Figura 15 A-B). A última porção da bolsa do cirro é formada pela vesícula seminal que é enovelada e contém inúmeros espermatozoides armazenados em seu lúmen (Figura 15 C-D).

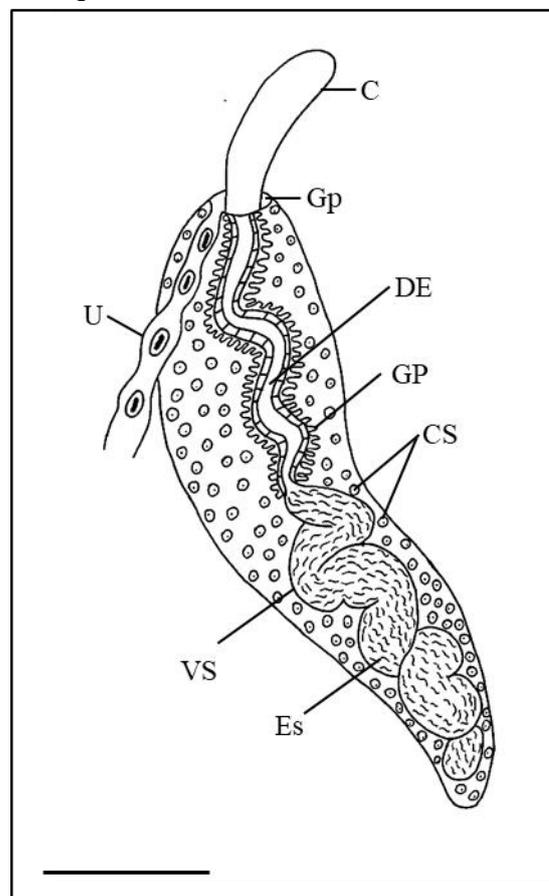
Figura 15 – Microscopia de luz (confocal e corte histológico) da bolsa do cirro de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: A e C – Microscopia confocal; B e D – Corte histológico. Abreviação: Gonoporo (Gp), ducto ejaculatório (DE), glândula prostática (GP), vesícula seminal (VS), parênquima (Pa), espermatozoides (Es). Escalas: A e C – 50 μm ; B e D - 100 μm .

Com base em diferentes imagens obtidas pela associação de diversas técnicas de microscopia, elaboramos um desenho esquemático do saco cirroso, destacando as principais estruturas do sistema reprodutor utilizadas na identificação taxonômica dos trematódeos. Na extremidade anterior apresenta-se o cirro protrátil, emergindo do gonoporo que é provido de um átrio genital pequeno que se conecta lateralmente ao útero. O ducto ejaculatório alarga-se posteriormente formando as vesículas seminais que estão preenchidas por espermatozoides. As glândulas prostáticas estão densamente distribuídas na região anterior à vesícula seminal, circundando o ducto ejaculatório (Figura 16).

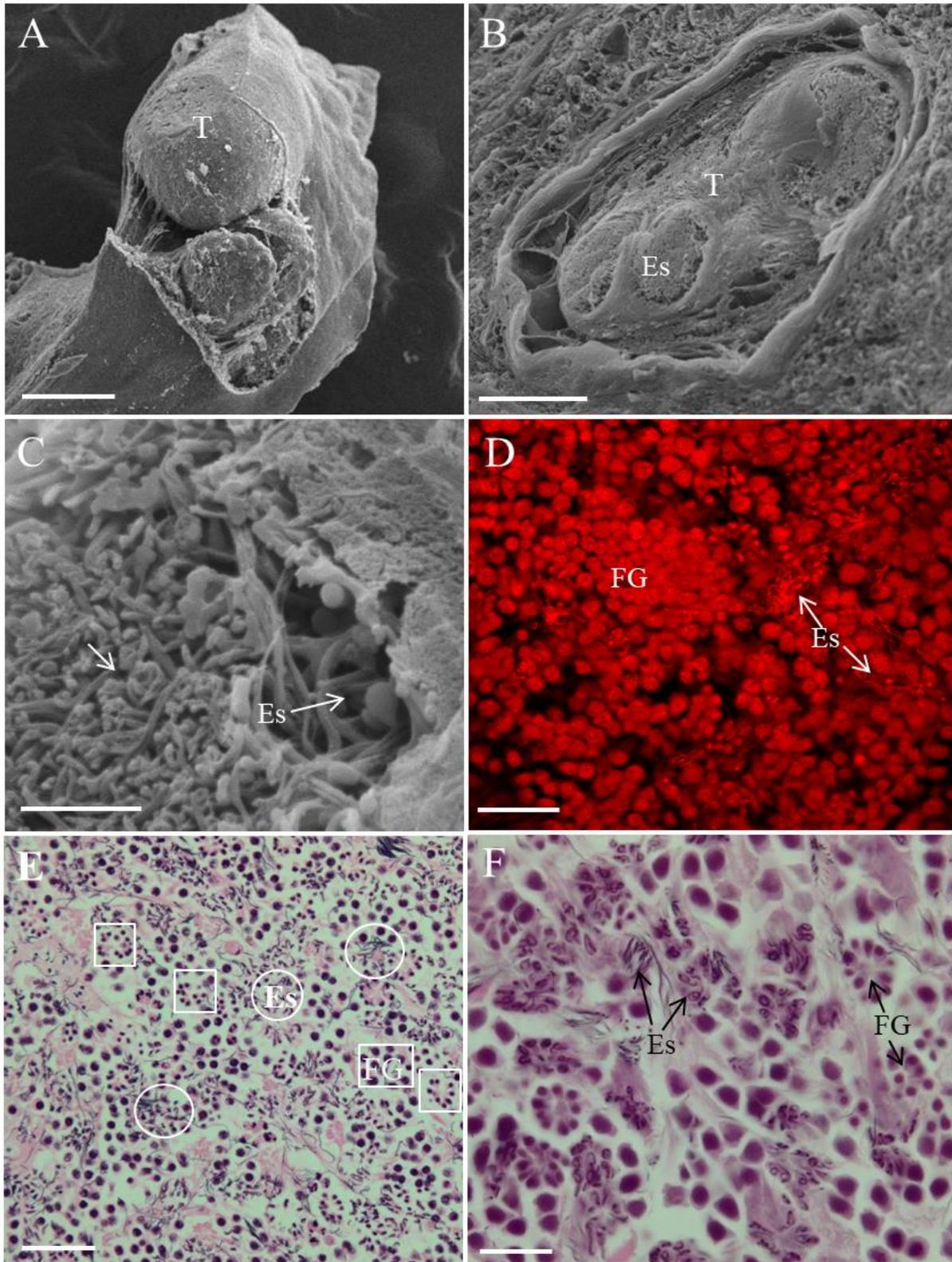
Figura 16 – Desenho esquemático da bolsa do cirro e cirro de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Abreviação: cirro (C), gonoporo (Gp), ducto ejaculatório (DE), glândula prostática (GP), útero (U), vesícula seminal (VS), células secretoras (Cs), espermatozoides (Es). Escala: 200 μ m.

A criofatura seguida da MEV, associada às imagens obtidas por microscopia de luz (campo claro, corte histológico e confocal) nos possibilitou destacar, em detalhes, a organização estrutural dos testículos de indivíduos adultos sexualmente desenvolvidos. Em formato elíptico e coberto por uma superfície lisa (Figura 17 A-B), estas estruturas estão preenchidas por folículos glandulares e espermatozoides em forma de rosetas (Figura 17 C a F).

Figura 17 – Criofratura, microscopia eletrônica de varredura e de luz (campo claro, corte histológico e confocal) dos testículos de *Eurytrema coelomaticum*



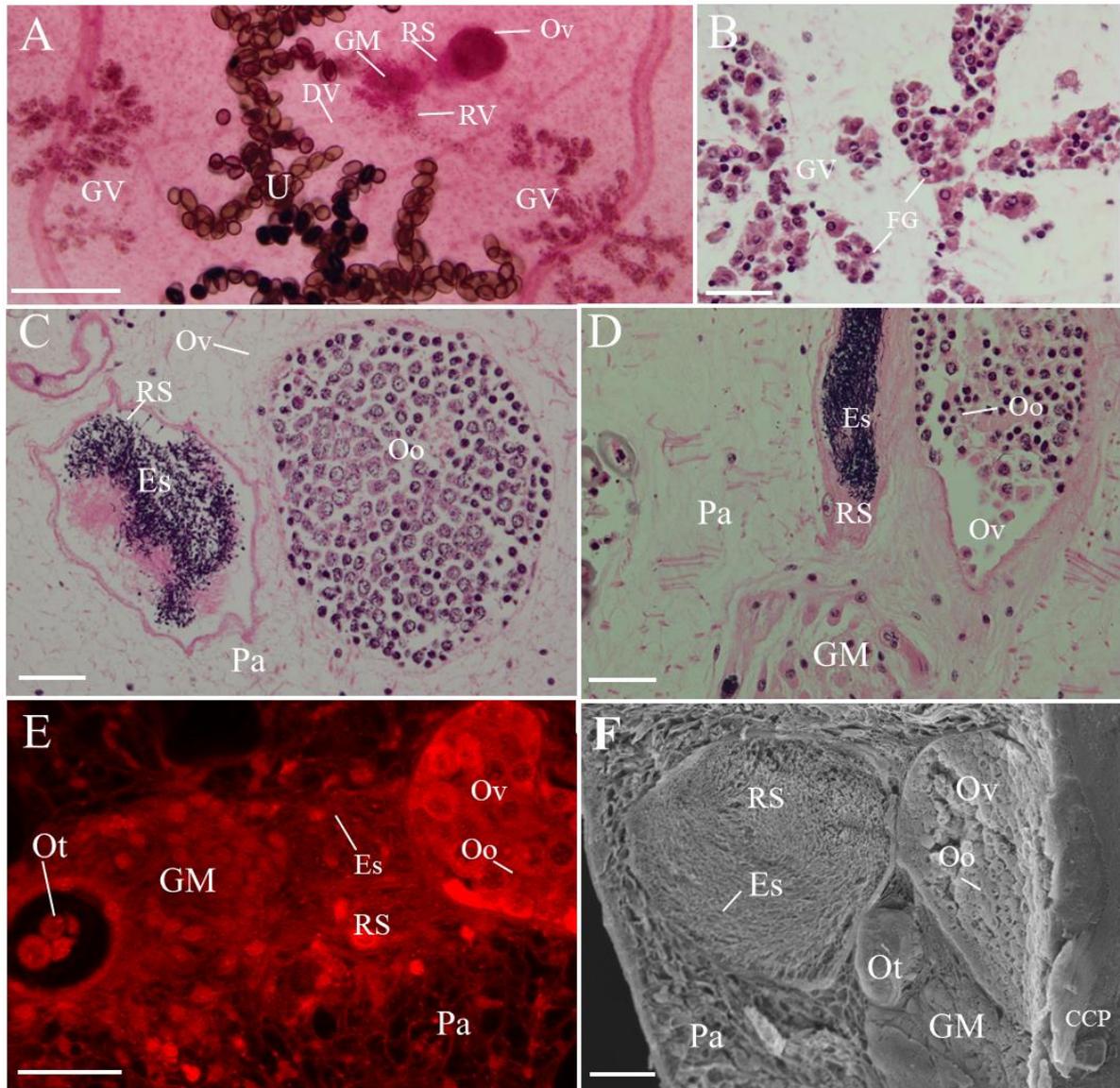
Legenda: A, B e C – Criofratura por MEV mostrando: A - contorno do testículo (T) arredondado; B - testículo em corte sagital evidenciando os espermatozoides (Es); C: detalhe dos espermatozoides (Es) flagelados. D- Vista interna dos testículos por microscopia confocal mostrando os folículos glandulares (FG) e os espermatozoides (Es); E e F corte histológico no eixo longitudinal em diferentes aumentos, evidenciando os folículos glandulares (FG) e os espermatozoides (Es). Escalas: A: 200 μ m, B e E: 50 μ m, C: 5 μ m, D e F: 20 μ m.

3.2.5 O sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor feminino também pôde ser detalhado explorando a associação das diferentes ferramentas de microscopia. Em nossos resultados destacamos a organização do ovário, complexo da glândula de Mehlis, receptáculo seminal, reservatório vitelínico, das duas glândulas vitelínicas e do útero, contendo inúmeros ovos (Figura 18 A). As glândulas vitelínicas, local onde ocorre a produção do vitelo, são formadas por folículos glandulares com aparência de cachos de uvas ou rosetas. Estas glândulas estão distribuídas em dois campos laterais do corpo do helminto e se sobrepõem ao ceco (Figura 18 A-B). O ovário é pequeno, esferoide e pós-testicular, apresenta uma membrana basal que envolve os oócitos e se sobrepõe ao receptáculo seminal, onde é possível identificar os espermatozoides, que precisam ser direcionados aos oócitos para fecundação (Figura 18 C).

Examinando os cortes histológicos, as imagens de confocal e das amostras criofraturadas visualizadas por MEV, foi possível detalhar a topografia do ovário e seus numerosos oócitos arredondados, além do receptáculo seminal, da glândula de Mehlis e do oótipo (Figura 18 D, E e F). A formação da célula ovo ocorre no oótipo, que está conectada ao ovário e às células que formam a glândula de Mehlis (Figura 18 D, E e F). A glândula tem o papel de nutrir o zigoto com vitelo que fica armazenado no reservatório vitelínico, localizado logo abaixo deste complexo (Figura 18 A). O reservatório vitelínico está conectado às glândulas vitelínicas pelos ductos vitelínicos (Figura 18 A).

Figura 18 – Microscopia de luz (campo claro, corte histológico e confocal), eletrônica de varredura e criofratura do sistema reprodutor feminino de *Eurytrema coelomaticum*

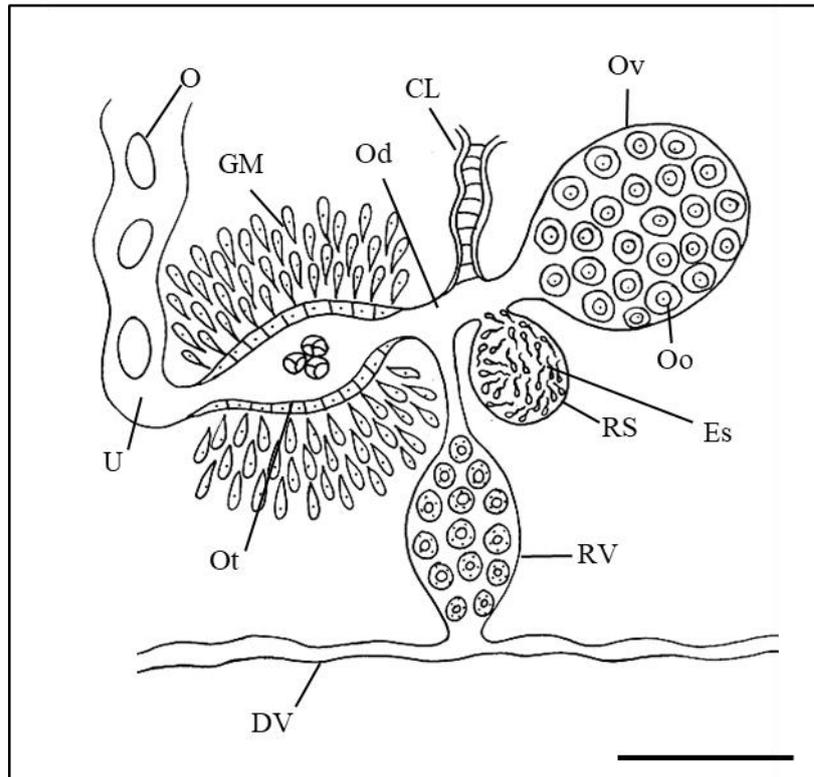


Legenda: Órgãos do aparelho genital feminino. A – Microscopia de luz mostrando B – Corte histológico da glândula vitelínica (GV) mostrando os folículos glandulares (FG). C e D – Corte histológico coronal por microscopia de luz, E – Microscopia confocal e F - Microscopia eletrônica de varredura pelo método de criofratura no plano sagital. ovário (Ov), receptáculo seminal (RS), complexo da glândula de Mehlis (GM), reservatório vitelínico (RV), ductos vitelínicos (DV), glândulas vitelínicas (GV), útero (U), oócitos (Oo), espermatozoides (Es), oótipo (Ot), parênquima (Pa). Escalas: A: 200 μ m, B, C, D, E e F: 50 μ m.

Também realizamos um desenho esquemático do sistema reprodutor feminino. Nele destacamos o oviduto provido de um único ovário com oócitos, que se expande na porção proximal para formar um receptáculo seminal. Um tubo estreito (canal de Laurer) une o oviduto tubular ao receptáculo seminal e ao reservatório vitelínico. O oviduto se expande

formando o oótipo que apresenta paredes espessas, cercado pelas glândulas de Mehlis. Os ovos, em desenvolvimento, partem do oótipo para o útero, amadurecem neste processo e chegam ao gonoporo, por onde são eliminados ao meio externo (Figura 19).

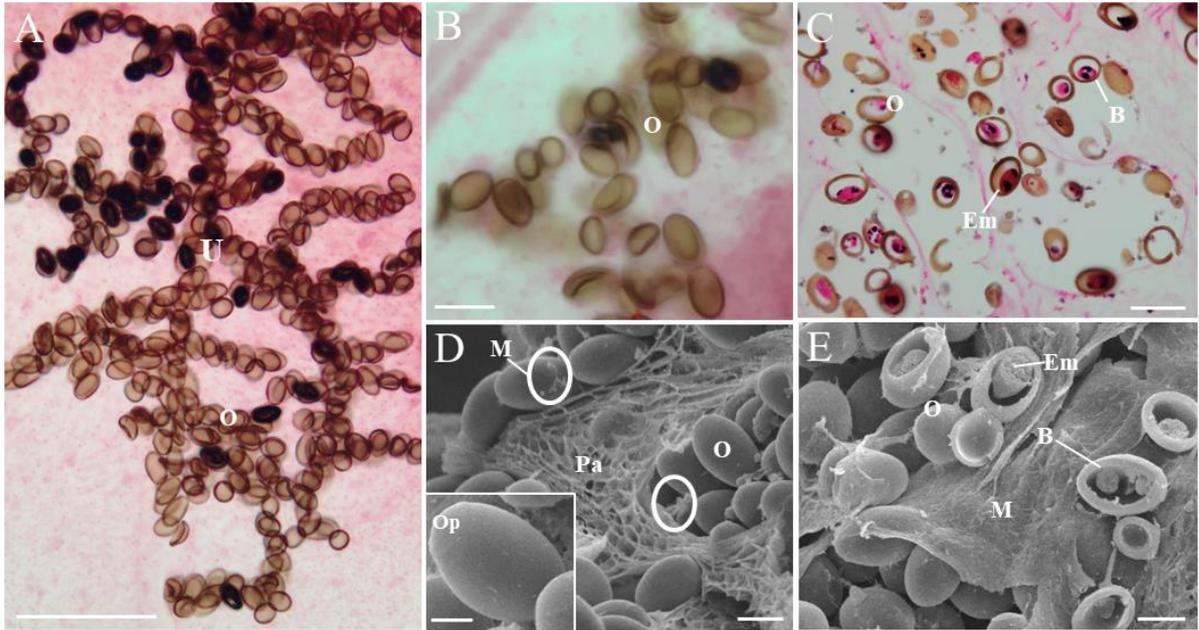
Figura 19 – Desenho esquemático do sistema reprodutor feminino de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Abreviação: Ovo (O), ovário (Ov), oócitos (Oo), canal de Laurer (CL), oviduto (Od), glândula de Mehlis (GM), oótipo (Ot), útero (U), receptáculo seminal (RS), reservatório vitelínico (RV), ductos vitelínicos (DV). Escala: 200 µm.

O útero fica totalmente preenchido por ovos em diferentes estágios de maturação (Figura 20 A-B). Os ovos intrauterinos, examinados utilizando diferentes técnicas de microscopia, nos possibilitou detalhar a sua organização. Por histologia foi possível identificar a sua morfologia elipsoide, o opérculo e a coloração castanho-caramelo a marrom da casca. Os ovos mais distantes do poro genital têm uma coloração mais clara e apresentam blastômeros em seu interior, já os ovos próximos ao gonoporo são mais escuros e apresentam um embrião desenvolvido (Figura 20 C). A MEV dos ovos criofraturados, ainda no lúmen do útero, mostrou que estes estão envoltos por uma estrutura semelhante a muco, além de nos possibilitar identificar novamente o opérculo, a espessura da casca que tem a superfície lisa e, no interior do ovo, se encontra o embrião formado (Figura 20 D e E).

Figura 20 – Microscopia de luz (campo claro e corte histológico), eletrônica de varredura e criofratura do útero e ovos de *Eurytrema coelomaticum*

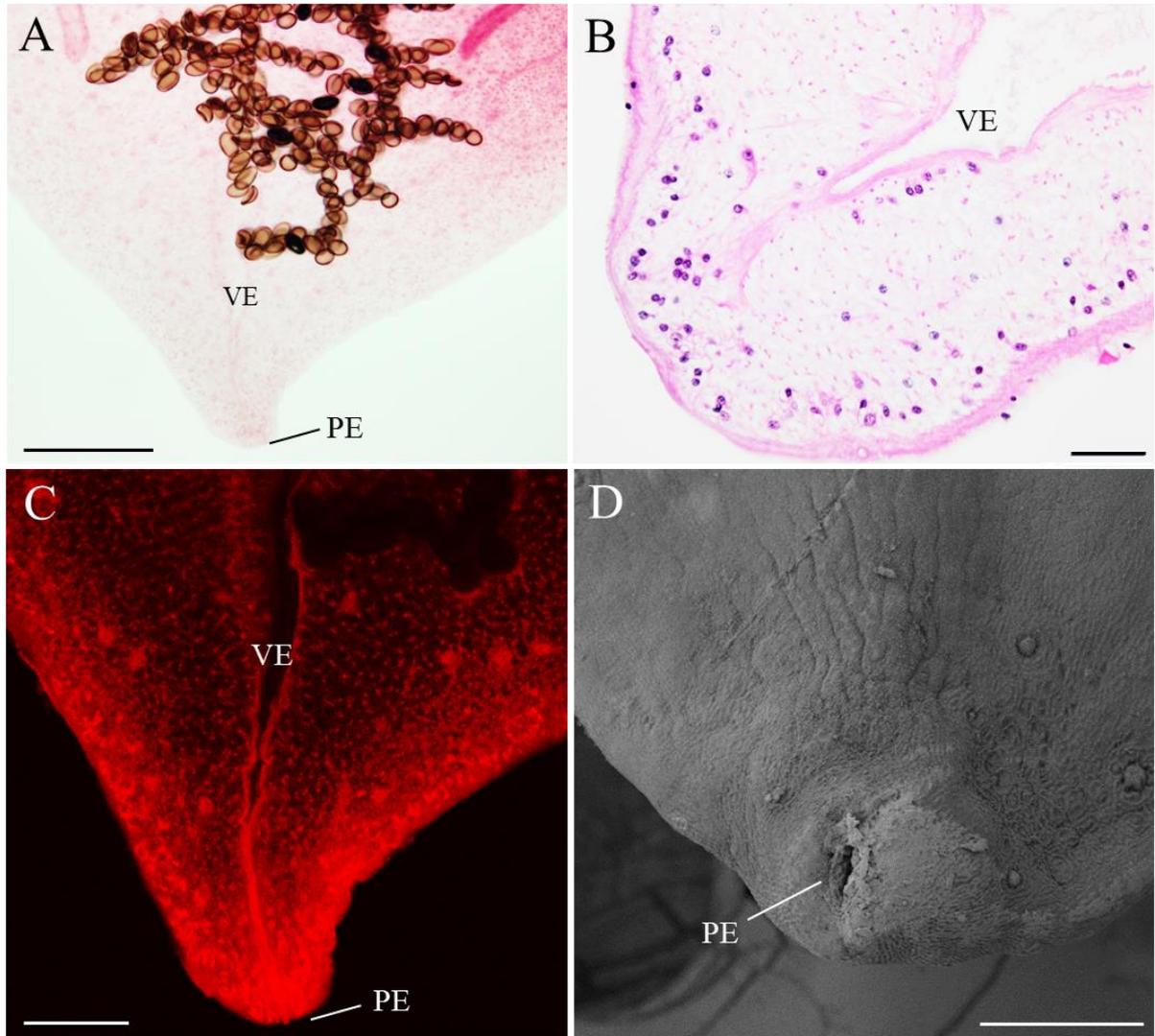


Legenda: A e B – Microscopia de luz mostrando o útero (U) repleto de ovos (O) em diferentes estágios de desenvolvimento, os ovos mais maduros são os mais escuros e os imaturos são mais claros. C – Corte histológico longitudinal evidenciando o interior dos ovos (O), os mais jovens com blastômeros (B) e os mais maduros com embrião formado (Em). D e E – Microscopia eletrônica de varredura pela técnica de criofratura mostrando o parênquima (Pa), o lúmen do útero com muco (M) e os ovos (O) operculados (Op) em destaque e fraturados com os blastômeros (B) e o embrião (Em) amostra. Escalas: A: 200 μm , B: 50 μm , C: 50 μm , D: 20 e 10 μm , E: 20 μm .

3.2.6 A vesícula excretora e o poro excretor

O poro excretor e parte da vesícula excretora estão presentes na extremidade terminal do corpo, e por microscopia de luz revelamos que é formado por uma vesícula excretora simples (Figura 21 A-B). Utilizando a microscopia confocal (Figura 21 C) e MEV (Figura 21 D) e identificamos que o sistema excretor se abre para o ambiente externo por um poro simples e sem ornamentações no tegumento que o circunda.

Figura 21 – Microscopia de luz (campo claro, corte histológico e confocal) e eletrônica de varredura do sistema excretor de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: A- Microscopia de luz, B – Microscopia de luz de corte histológico longitudinal, C – Microscopia confocal, D – Microscopia eletrônica de varredura. Abreviação: vesícula excretora (VE) e poro excretor (PE). Escalas: A: 200 μm , B, C e D: 50 μm .

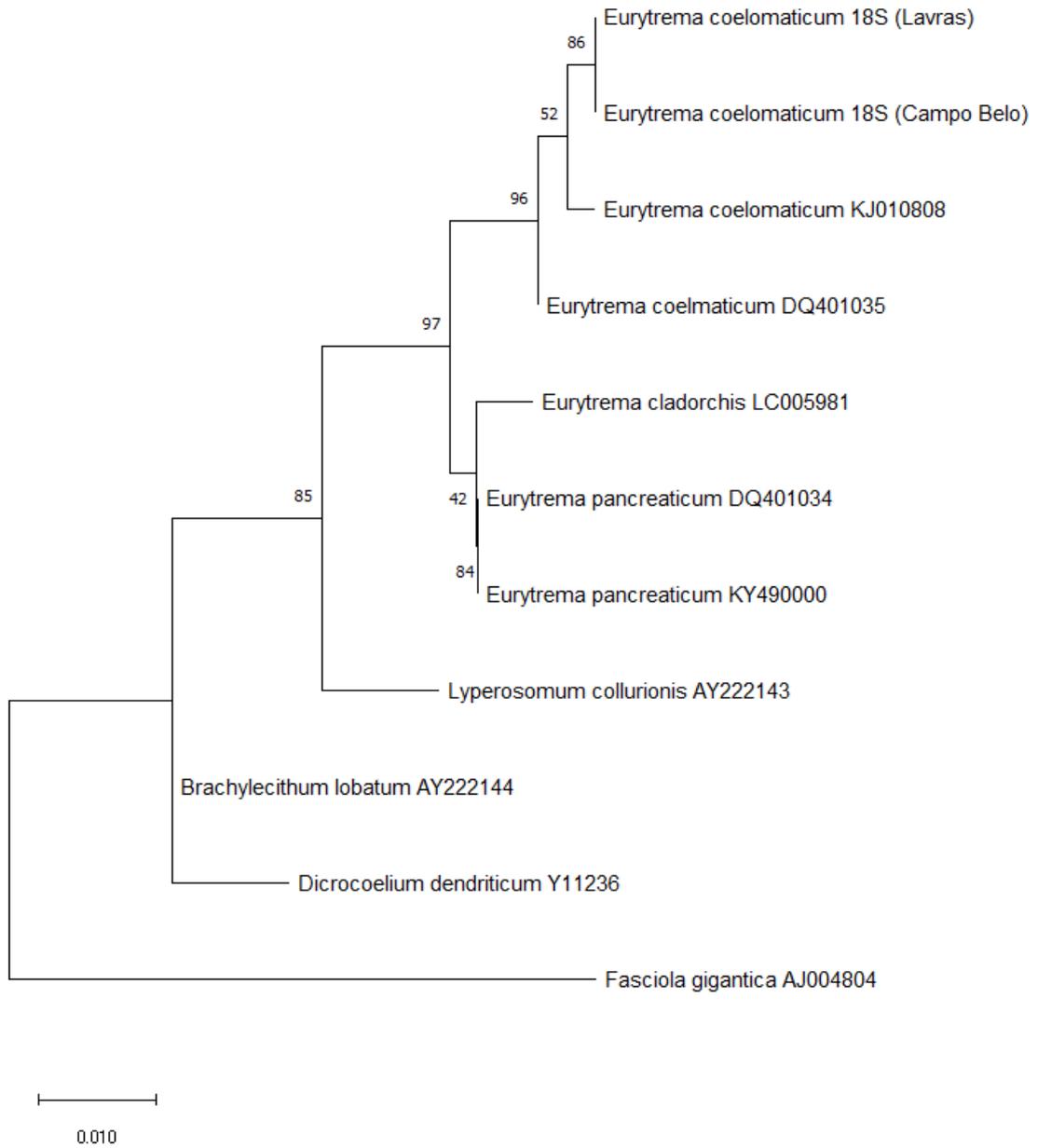
3.3 Caracterização molecular

Realizamos a comparação da diversidade de populações de *E. coelomaticum*, com a análise de dois marcadores genômicos, 18S rRNA e *cox1* mtDNA. Em ensaios de PCR amplificamos um fragmento de aproximadamente 1800 pb para o gene 18S rRNA e 500 pb para o gene *cox1* mtDNA das amostras provenientes de Lavras e Campo Belo.

As análises BLAST mostraram 98% de identidade com as sequências de *E. coelomaticum* (número de acesso ao GenBank DQ401035) utilizando o marcador 18S rRNA e 90% de identidade com a sequência de *E. pancreaticum* (número de acesso ao GenBank KP241855) para o *cox1* mtDNA.

Em seguida as sequências obtidas foram alinhadas com as disponíveis no GenBank e utilizamos a *Fasciola gigantica* como grupo externo. Na primeira árvore filogenética utilizamos os iniciadores E-18S-R e E-18S-F, sendo analisadas as sequências 18S do gênero *Eurytrema* e de outros trematódeos publicados pelo Nacional Centro de Informações sobre Biotecnologia (NCBI). Ao analisar esta árvore percebemos que as amostras de Lavras e Campo Belo estão situadas em posições distintas com valor de auto-inicialização de 86 e, junto com as demais espécies de *Eurytrema* formam um clado (Figura 22).

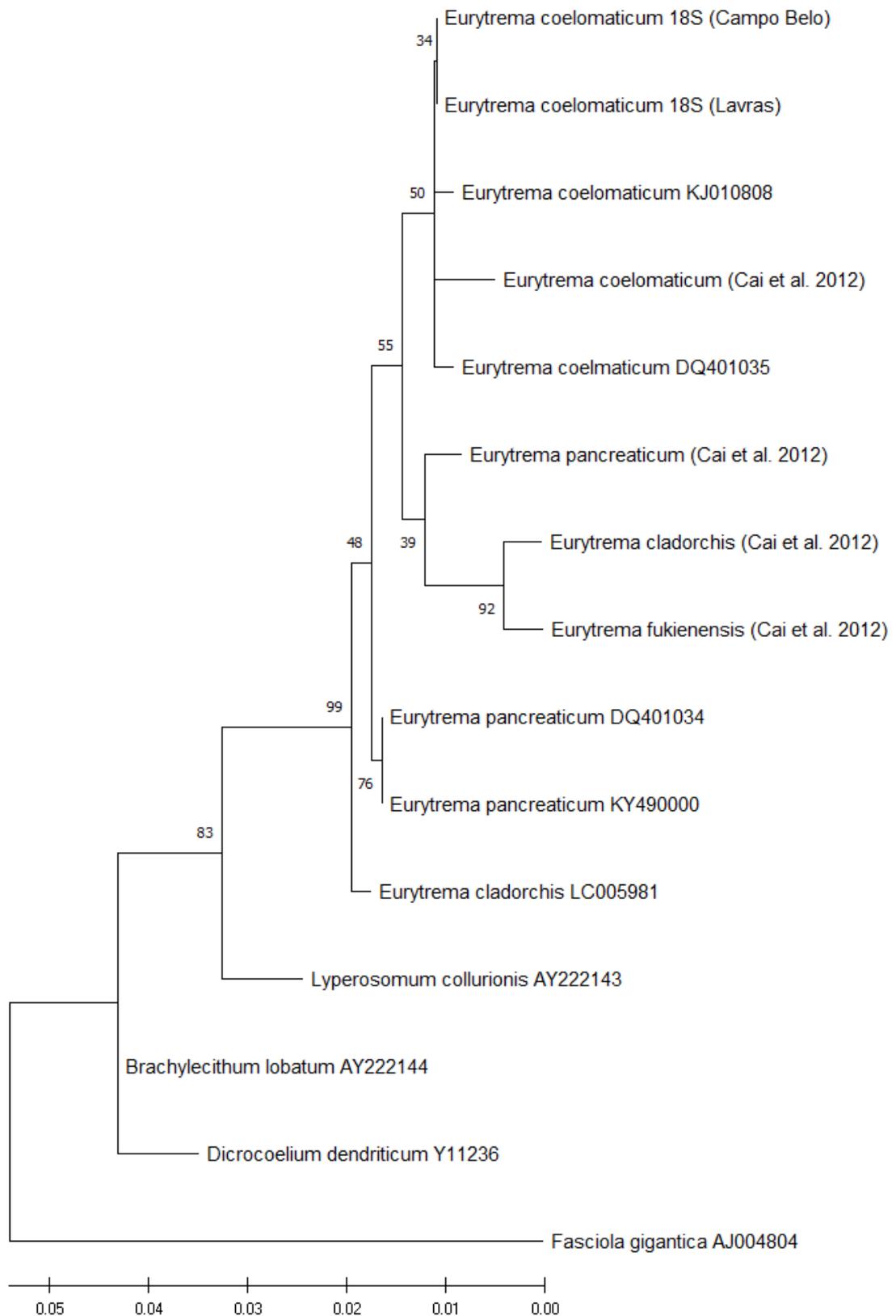
Figura 22 - Filograma de *Eurytrema coelomaticum* inferido a partir de sequências de 18S rRNA utilizando os *primers* E-18S-F e E-18S-R (ZHENG et al., 2007)



Legenda: Árvore inferida pelo MEGAX usando o método Máxima Verossimilhança (ML), modelo Kimura-2 parâmetros e 500 réplicas do *bootstrap*. *Fasciola gigantica* foi usada como *out-group*.

No segundo filograma utilizamos os iniciadores A, B, C e D, com base nas sequências 18S do gênero *Eurytrema* depositadas, juntamente com a sequência de *E. fukienensis* e demais sequências do gênero *Eurytrema* obtidas no trabalho de Cai e colaboradores (2012). Com base nesta análise percebemos que quando os espécimes do gênero *Eurytrema* descritos por Cai e colaboradores (2012) são incluídos na árvore filogenética, ocorre um desmembramento da árvore que divide espécimes de *E. pancreaticum* e *E. cladorchis*, aparecendo um ramo com *E. pancreaticum*, *E. cladorchis* e *E. fukienensis* descritos por estes autores e outro ramo com *E. pancreaticum* depositados no GenBank (ZHENG et al., 2007; SU et al., 2018) próximos a *E. cladorchis* (MOHANTA et al., 2015). No entanto, todos os espécimes de *E. coelomaticum* agruparam juntos, destacando a aproximação genética da espécie (Figura 23).

Figura 23 - Filograma de *Eurytrema coelomaticum* inferido a partir de seqüências de 18S rRNA utilizando os *primers* A, B, C e D (CAI et al., 2012)



Legenda: Árvore inferida pelo MEGAX usando o método Máxima Verossimilhança (ML), modelo Kimura 2 parâmetros e 500 réplicas do *bootstrap*. *Fasciola gigantica* foi usada como *out-group*.

Uma tabela de estimativas de divergência evolutiva entre todas as sequências 18S rRNA presentes nestes filogramas foi produzida utilizando o programa MEGAX (Tabela 9). A partir da tabela pode-se perceber que há pouca divergência evolutiva entre os espécimes de *E. coelomaticum*, alcançando um valor máximo de 0,003 entre as amostras do presente estudo e *E. coelomaticum* relatado por Cai e colaboradores (2012).

Tabela 9 - Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências 18S rRNA

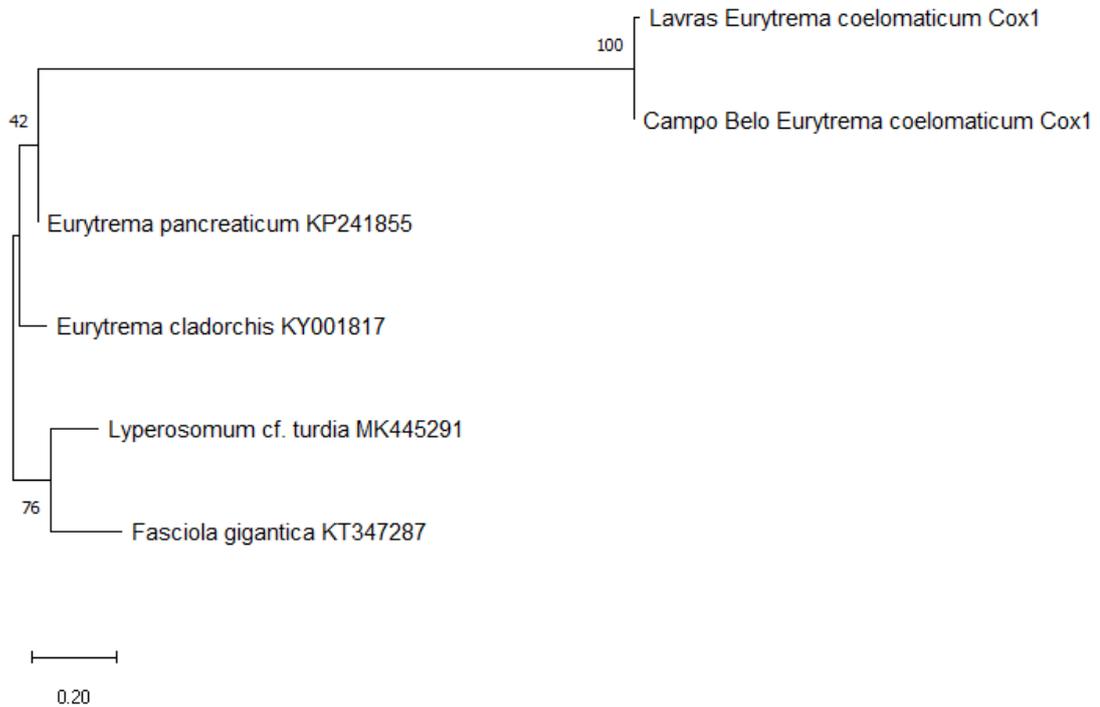
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>Eurytrema coelomaticum</i> 18S (Campo Belo)															
2. <i>Eurytrema coelomaticum</i> 18S (Lavras)	0.000														
3. <i>Eurytrema coelomaticum</i> DQ401035	0.001	0.001													
4. <i>Eurytrema coelomaticum</i> KJ010808	0.002	0.002	0.004												
5. <i>Eurytrema coelomaticum</i> (Cai et al. 2012)	0.003	0.003	0.002	0.008											
6. <i>Eurytrema pancreaticum</i> DQ401034	0.005	0.005	0.006	0.008	0.007										
7. <i>Eurytrema pancreaticum</i> KY490000	0.005	0.005	0.006	0.008	0.007	0.000									
8. <i>Eurytrema pancreaticum</i> (Cai et al. 2012)	0.007	0.007	0.007	0.010	0.007	0.003	0.003								
9. <i>Eurytrema cladorchis</i> LC005981	0.008	0.008	0.009	0.012	0.010	0.005	0.005	0.008							
10. <i>Eurytrema cladorchis</i> (Cai et al. 2012)	0.015	0.015	0.014	0.017	0.015	0.015	0.015	0.014	0.018						
11. <i>Eurytrema fukienensis</i> (Cai et al. 2012)	0.010	0.010	0.009	0.015	0.009	0.011	0.011	0.010	0.014	0.007					
12. <i>Lyperosomum collurionis</i> AY222143	0.016	0.016	0.017	0.026	0.019	0.015	0.015	0.017	0.016	0.028	0.023				
13. <i>Brachylecithum lobatum</i> AY222144	0.023	0.023	0.024	0.026	0.025	0.022	0.022	0.024	0.024	0.033	0.029	0.018			
14. <i>Dicrocoelium dendriticum</i> Y11236	0.024	0.024	0.025	0.032	0.027	0.024	0.024	0.027	0.025	0.037	0.032	0.018	0.011		
15. <i>Fasciola gigantica</i> AJ004804	0.089	0.089	0.091	0.083	0.092	0.087	0.087	0.089	0.085	0.097	0.095	0.082	0.082	0.087	

Legenda: O número de substituições de bases por local entre as sequências é mostrado. As análises foram conduzidas usando o modelo de 2 parâmetros Kimura. A variação da taxa entre os sítios foi modelada com uma distribuição gama. Havia um total de 1762 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X.

A rede filogenética com base em sequências de *cox1* demonstrou semelhanças nas relações evolutivas entre as espécies do gênero *Eurytrema* (*E. pancreaticum* com 90% e *E. cladorchis* com 89% de identidade) depositadas no GenBank sob os números: KP2411851 e KY001817.

Uma terceira árvore filogenética foi construída com base nas sequências do gene *cox1* e as reconstruções filogenéticas de Máxima Verossimilhança (ML) nos forneceram topologias semelhantes, com poucas variações nos valores de suporte. As duas análises filogenéticas, com base na matriz 18S rRNA, recuperaram sequências obtidas neste trabalho como um grupo monofilético com as sequências de *E. coelomaticum* depositadas no GenBank, formando, assim, um clado bem apoiado (Figuras 22 e 23). *E. pancreaticum* e *E. cladorchis* se mostraram mais próximos geneticamente tanto na análise do gene 18S, quanto na análise do gene *cox1*. No entanto, *E. coelomaticum* está mais relacionado ao *E. pancreaticum* do que ao *E. cladorchis*, mostrando uma maior distância genética na análise do gene mitocondrial *cox1* (Figura 24).

Figura 24 - Filograma de *Eurytrema coelomaticum* inferido a partir de sequências de *cox1* mtDNA utilizando os *primers* JB3 e JB4.5 (BOWLES et al., 1992)



Legenda – Árvore inferida pelo MEGAX usando o método Máxima Verossimilhança (ML), modelo Kimura-2 parâmetros e 500 réplicas do *bootstrap*.

4 DISCUSSÃO

As espécies do gênero *Eurytrema* são amplamente distribuídas no globo terrestre, porém se concentram mais especificamente em rebanhos da Europa, Ásia e América do Sul (ILHA et al., 2005; BASSANI et al., 2006; PINHEIRO et al., 2012; MOHANTA et al., 2015). No Brasil, *E. coelomaticum* é a única espécie relatada, sendo comumente encontrada quando os animais são encaminhados para abatedouros e se tem acesso aos órgãos extraídos. Os estados brasileiros onde a identificação deste parasito é mais comum são os das regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (BASSANI et al., 2007; GROSSKOPF et al., 2017).

A morfologia e a morfometria de *E. coelomaticum* foi caracterizada mais frequentemente com o uso da microscopia de luz, principalmente explorando o sistema de campo claro acoplado à câmara clara (GIARD & BILLET, 1892; RAILLIET & MAROTEL, 1898; LOOSS & CUFFEY, 1907; TRAVASSOS, 1944). Mais recentemente, alguns grupos têm investido em inovações metodológicas, contribuindo no detalhamento morfológico e ultraestrutural do grupo com o uso de novas ferramentas, incluindo a estereomicroscopia de fluorescência, microscopia confocal e eletrônica de varredura (LEITE, 2015; DA SILVA JÚNIOR, 2017; DA SILVA JÚNIOR et al., 2018; LEITE et al., 2020). Baseado neste conjunto de dados, destacamos que esta espécie apresenta variações morfológicas frequentes em estruturas que não podem ser utilizadas na identificação taxonômica. Em nossos resultados identificamos e destacamos essas diferenças, estatisticamente significativas, em praticamente todos os parâmetros analisados, com exceção das medidas do comprimento e largura dos ovos e razões entre largura das ventosas oral/ventral e comprimento/largura dos ovos. Esta variação pode estar relacionada a fatores ambientais, como: área geográfica da coleta, número de parasitos por hospedeiro, característica nutricional e a idade variada dos helmintos (POULIN et al., 2003), já tendo sido observada também em *Schistosoma mansoni*, fenômeno conhecido como plasticidade fenotípica, que são alterações pressionadas pela fisiologia do hospedeiro, local, entre outros fatores que podem influenciar no crescimento do parasito (NEVES et al., 2004; MARTINEZ, et al., 2008).

A relação da morfometria entre a ventosa oral e ventral, assim como as medidas de comprimento e largura dos ovos, por não terem apresentado diferença significativa entre nenhum espécime analisado, indicam que devem ser parâmetros mais seguros na classificação taxonômica morfológica desta espécie. Interessante destacar que os espécimes provenientes de Minas Gerais, quando comparados entre si nos 28 parâmetros utilizados, apresentaram

diferença significativa em 21, exceto na largura do corpo, na relação entre a largura da ventosa oral/largura da ventosa ventral, na largura das glândulas vitelínicas, no comprimento, largura e relação do comprimento/largura dos ovos. Já na comparação dos helmintos provenientes de Lavras - MG e Santa Cruz - RJ (LEITE, 2015), não verificamos diferença significativa em nenhum dos parâmetros morfométricos analisados. Quando comparamos os espécimes recuperados de bovinos de Campo Belo com os depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz, identificamos diferença significativa apenas no comprimento da faringe, sugerindo que os helmintos de Lavras e Campo Belo (MG) apresentam diferença entre si. Por outro lado, os espécimes de Lavras e os de Santa Cruz, assim como, os espécimes de Campo Belo e os depositados na CHIOC, apresentam grande semelhança entre si.

Em relação aos espécimes de Campo Belo, também observamos vinte e três características similares com os de Barra Mansa. Segundo Peters (1983), este fato pode estar associado a fatores de escala conhecidos como relações alométricas, que são produzidas pelo processo de adaptação organizacional, pela relação da massa corporal com variáveis da morfologia, fisiologia, comportamento e ecologia. Podem ser derivadas de novas relações não documentadas entre modelos de processos populacionais e ecossistêmicos formulados. Variações morfométricas também foram observadas por Sohn et al (2017) em *Isthmiophora hortensis*, esses autores identificaram que as diferenças morfométricas estavam principalmente relacionadas ao tipo de hospedeiro. No presente estudo, destacamos que algumas medidas não apresentam muitas variações, independente de fatores externos que podem influenciar nas variações morfométricas. Utilizamos como parâmetro a relação da largura da ventosa oral/largura da ventosa ventral, o comprimento e a largura dos ovos e a relação do comprimento/largura dos ovos intrauterinos. Mais uma vez, sugerimos que estes sejam parâmetros que devem ser utilizados para identificação morfológica da espécie.

Quando exploramos a morfologia das estruturas externas e, principalmente, das estruturas internas de *E. coelomaticum*, comumente utiliza-se a microscopia de campo claro e, em alguns trabalhos se explora resultados de fluorescência (GIARD & BILLET, 1892; RAILLIET & MAROTEL, 1898; LOOSS & CUFFEY, 1907 e TRAVASSOS, 1944). No entanto, para detalhar a topografia do tegumento de helmintos e agregar novas informações da organização interna, investimos na combinação da histologia, microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de técnicas de criofatura seguida de MEV. Estas ferramentas contribuíram para explorar em detalhes o tegumento, as estruturas de fixação, o sistema digestório, os sistemas reprodutores feminino e masculino e o sistema

excretor. Nosso grupo já havia demonstrado o significativo avanço que podemos obter ao investir na inovação metodológica no estudo da morfologia de helmintos, inclusive publicamos estes dados com adultos de *E. coelomaticum* provenientes do Rio de Janeiro (LEITE et al., 2020). Outros autores também tiveram sucesso na descrição detalhada das estruturas morfológicas de helmintos com o uso de técnicas avançadas de microscopia (NEVES et al., 2005; ADNET et al., 2013; SOUZA et al., 2017 LOPES-TORRES et al., 2013; 2015; 2019).

Eurytrema coelomaticum é caracterizado por não possuir uma cobertura tegumentar rica em ornamentações (TRAVASSOS, 1944; LEITE et al., 2020). Pinheiro e colaboradores (2012), utilizando a MEV, mostraram que as cercárias desta espécie apresentam ventosas oral e ventral providas de papilas. Esta característica ainda não havia sido descrita em vermes adultos, em nossos resultados identificamos papilas na face dorsal da região anterior em indivíduos adultos, mostrando que são características que surgem já nas cercárias e são conservadas até vermes adultos. Além disso, na camada sincicial, destaca-se a presença de cristais cúbicos de proteínas, estruturas descritas anteriormente, porém que tem a sua função ainda desconhecida (SAKAMOTO & OIKAWA, 2007; DA SILVA JÚNIOR et al., 2018; LEITE et al., 2020). Estas estruturas representam um caráter conservado, que pode estar atrelado a uma atividade metabólica característica deste grupo de Trematoda, uma vez que foram encontradas em adultos coletados em diferentes partes do mundo e, também observadas em outras espécies do gênero *Eurytrema* (SAKAMOTO & OIKAWA, 2007). Sakamoto & Oikawa (2007) detalharam a distribuição destes cristais proteicos no corpo de *Eurytrema coelomaticum* e *E. pancreaticum* usando da MEV e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Como esperado, as nossas imagens de MEV mostraram estes cristais cúbicos na superfície do tegumento nas faces ventral e dorsal do helminto. Além disso, com base na estereomicroscopia de fluorescência, destacamos que estes cristais apresentam ampla distribuição pelo corpo do trematódeo (LEITE et al., 2020). Nossa análise de microscopia confocal revelou, pela primeira vez, que estas inclusões proteicas também estão presentes na região da ventosa ventral, reforçando a importância do uso da microscopia confocal no estudo morfofuncional de helmintos (MACHADO-SILVA et al., 1998; ŠEBELOVÁ et al., 2004; NEVES et al., 2005, SOUZA et al., 2017). Sakamoto & Oikawa (2007) identificaram que estes cristais proteicos são compostos por moléculas ricas em enxofre e sugeriram que se originam a partir da região subtegumentar do helminto. De acordo com os nossos resultados, ratificamos esta afirmativa com base nas imagens obtidas com a MEV de parasitos criofraturados. É provável que os cristais de proteínas estejam associados à atividade

metabólica básica destes helmintos, podendo ter relação com o processo de adaptação e sucesso parasitário desta espécie. Estes cristais foram identificados em todos os parasitos analisados independente das diferenças ambientais e nutricionais dos seus hospedeiros.

Embora estudos anteriores, baseados em microscopia de luz (TRAVASSOS, 1944; TRAVASSOS et al., 1969), tenham mostrado invaginações margeando o corpo de *E. coelomaticum* adulto, não há informações mais detalhadas em relação a função destas estruturas. Nossos resultados de microscopia confocal e MEV mostraram que estas invaginações apresentam vários tamanhos e intervalos irregulares. De maneira similar, Cohen e colaboradores (2001), descreveram estruturas semelhantes em *Paranaella luquei*, trematódeo parasito de bagres brasileiros. Os autores sugerem que estas invaginações estão associadas ao processo de excreção, absorção de nutrientes e osmorregulação.

A morfologia do cirro foi detalhada nos resultados por estar extrovertido. Esta estrutura masculina de cópula é utilizada na caracterização taxonômica de trematódeos e, em *E. coelomaticum*, não apresenta ornamentações, somente uma superfície levemente rugosa. Também foi possível detalhar o gonoporo, orifício por onde o cirro se projeta, onde ocorre o depósito de espermatozoides e, também por onde os ovos são liberados. Da mesma forma que o cirro, o gonoporo também não apresenta ornamentações tegumentares, como já havia sido demonstrado anteriormente (LEITE et al., 2020).

A organização muscular é muito importante para a estratégia parasitária, e as ventosas desempenham um papel fundamental na fixação e deslocamento do helminto nos tecidos de seus hospedeiros. A organização muscular dessas ventosas atrai muito interesse, principalmente devido a sua complexa organização biofísica que agrega conhecimento sobre a distribuição das fibras que podem ser alvos para novos fármacos com maior especificidade, eficiência e baixa toxicidade (KUMAR et al., 2003; KRUPENKO, 2019). Em investigações com outros trematódeos, também com o uso da microscopia confocal, foi descrito um arranjo típico formado por fibras musculares diagonais, circulares, radiais, transversais e longitudinais (= meridionais) (MAIR et al., 1998; KUMAR et al., 2003, ŠEBELOVÁ et al., 2004; KRUPENKO, 2014; BORGES et al., 2017; KRUPENKO, 2019, LEITE et al., 2020). Em nossos resultados, identificamos esta mesma organização, destacando que as fibras se sobrepõem formando um complexo muscular bastante denso. Esses tipos de fibras musculares podem variar em relação a sua distribuição/organização e quantidade de acordo com o grupo de helmintos que está sendo estudado, sugerindo um caráter evolutivo associado ao comportamento do parasito helminto e a sua especificidade com o tecido onde está alojado

no hospedeiro (MAIR et al., 2000; KRUPENKO & DOBROVOLSKIJ, 2015; KRUPENKO, 2019).

O sistema digestório apresenta, logo após a abertura anterior da ventosa oral, uma faringe guarnecida de fibras musculares circulares (SOUZA et al., 2017; KRUPENKO, 2019) seguido por um esôfago sinuoso que é característico dos trematódeos (TRAVASSOS, 1944; DA SILVA et al., 2017). Além disso, nossos experimentos com confocal e histologia, auxiliaram a identificar células na faringe que apresentam núcleos grandes. Estas estruturas ainda não haviam sido descritas e não tem uma função ainda conhecida, mas podem estar associadas ao processo de secreção de enzimas ligadas ao processo digestório.

Combinando diferentes ferramentas de microscopia, detalhamos estruturas internas e externas do sistema reprodutor masculino, o que nos permitiu redescrever a morfologia do gonoporo, bolsa do cirro e dos testículos, complementando dados anteriores (TRAVASSOS et al., 1969; PINTO & MELO, 2016). Nossos resultados de microscopia confocal revelaram uma bolsa do cirro bem desenvolvida, composta por uma vesícula seminal e uma glândula prostática robusta. As células secretoras circundam o ducto ejaculatório em forma de S e terminam se conectando ao cirro que se extroverte pelo poro genital, características semelhantes à *F. hepatica* e *Trichobilharzia regenti* (TERASAKI et al., 2001; SKÍRNISSON et al., 2012). Com a criofratura e MEV, mostramos que testículos têm a superfície lisa com margens bem delimitadas, como já foi descrito em outras espécies da família Dicrocoeliidae (CASANOVA & RIBAS, 2004; HILDEBRAND et al., 2007).

A eficiência reprodutiva é uma importante adaptação de organismos parasitos, com base nisso investimos nos experimentos de microscopia confocal para detalhar o sistema reprodutor feminino. Este é provido de ovário preenchido com numerosos oócitos e um receptáculo seminal repleto de espermatozoides, uma característica comum nos trematódeos digenéticos (NEVES et al., 2005; SOUZA et al., 2011; HANNA, 2015; MARQUES et al., 2017). Vale destacar que a posição do ovário apresentada por Giard & Billet (1982), apresenta um desenho esquemático de *E. coelomaticum* adulto onde o ovário está posicionado no lado direito do corpo. Entretanto, esta estrutura é representada do lado esquerdo na maioria dos trabalhos de descrição de *E. pancreaticum*, incluindo Travassos (1944) que descreveu que o ovário geralmente se apresenta no lado esquerdo em *E. pancreaticum*, porém não mencionou a localização do ovário em *E. coelomaticum*. Esta informação apresenta uma dificuldade na taxonomia e, também foi omitida por outros autores (RAILLIET & MAROTEL, 1898; TANG & TANG, 1977, MATTOS & VIANNA, 1987; BRAY et al., 2008). Em nossos resultados, tivemos uma atenção especial em relação a esta estrutura e destacamos que o ovário em *E.*

coelomaticum não apresenta uma localização fixa, com uma variação de 46% dos espécimes com o ovário posicionado do lado esquerdo e 52% do lado direito, destacando que um espécime apresentou uma anomalia morfológica com a ausência de ovário. Bakke (1988) relata a localização anfitípica das gônadas em digenéticos adultos, o qual chamou de “*situs inversus*” e foi ocasionalmente observada, com referência especial a *Phyllodisfomum urnblae*, embora normalmente o ovário estivesse situado no lado esquerdo. Nossos resultados mostram que a posição do ovário não deve ser utilizada como um carácter taxonômico na identificação morfológica de espécies do gênero *Eurytrema*.

As glândulas vitelínicas são descritas como estruturas longas, dispostas em grupos extracecais e que se localizam nas laterais do corpo do parasito (WIRORENO et al., 1987; YAMAMURA 1989; ILHA et al., 2005). No presente estudo, complementamos este dado descrevendo que as glândulas apresentam 1,16 mm de comprimento por 0,56 mm de largura, estão dispostas em folículos e concentram-se da porção mediana para a posterior do corpo do helminto, se sobrepondo ao ceco, e nunca ocupando a área pós-cecal do corpo.

Entre os trematódeos digenéticos está bem estabelecido que a formação dos ovos ocorre no oótipo, uma câmara de paredes espessas, onde a casca do ovo é formada a partir de material proveniente das células vitelinas combinadas com outras secreções da glândula de Mehlis (COGSWELL et al., 2012). Estas características estruturais foram mostradas em *F. hepatica* usando a microscopia eletrônica de transmissão (COLHOUN et al., 1998) e em *Echinostoma paraensei* usando microscopia confocal (SOUZA et al., 2011). Com relação ao *E. coelomaticum*, poucos grupos têm explorado este tema, porém Pinheiro et al. (2015) detalharam a formação do ovo e afirmaram que a maior parte do material da casca é produzida pelas células vitelinas. Além disso, destacaram a relação da coloração dos ovos e o desenvolvimento do embrião. Os ovos castanho-amarelados não continham miracídios, enquanto os ovos maduros, que continham um único miracídio totalmente desenvolvido, eram castanhado-marrons. Os autores explicam que essa diferença pode estar relacionada ao estágio distinto da impregnação do tanino. Os ovos imaturos são pobres e os maduros, ricos em tanino. A presença de tanino na casca de ovo dos trematódeos lhes dá a coloração acastanhada e, provavelmente, é responsável pelas diferentes birrefringências observadas. Nossos resultados de confocal associado aos experimentos com histologia e criofatura, nos revelaram um útero contendo numerosos ovos elipsóides de paredes espessas, que ficam livres nas alças uterina, como descrito anteriormente (PINHEIRO et al., 2015). Também identificamos ovos cercados por muco com embrião em diferentes estágios de desenvolvimento (CONN et al., 2018), além de detalharmos a presença do opérculo (PINHEIRO et al., 2015) e, em conjunto,

nossos dados também corroboram com trabalhos anteriores em relação ao formato e coloração, com base na histologia de cortes corados com hematoxilina e eosina (YAMAMURA, 1989; PINHEIRO et al., 2015). Destacamos que identificamos embriões em ovos ainda no interior do útero, o que apresenta uma nova possibilidade para se estudar a embriogênese neste e em outros grupos de helmintos.

Imagens de microscopia de luz já mostravam que o poro excretor está localizado na porção terminal do corpo do helminto, porém vale destacar que a vesícula excretora está sobreposta pelo útero e os ovos dificultam a sua visualização (BRAY & JUSTINE, 2013). Com o uso da microscopia confocal, foi possível observamos que a abertura do poro excretor apresenta uma borda bem definida, e os resultados de MEV nos permitiram analisar que essa estrutura apresenta um tegumento enrugado com depressões suaves na parede do corpo, característica também já descrita anteriormente em outros digenéticos (MACHADO-SILVA et al., 1997; MALDONADO et al., 2003).

O sequenciamento do produto obtido por PCR do gene parcial 18S permitiu confirmar a identidade da espécie, como *E. coelomaticum* e verificar a conservação desta região, apesar de seu polimorfismo, diferente do obtido com o gene *cox1* que apresentou pouco polimorfismo nas amostras analisadas. Entretanto, não há registro de análise das sequências de produtos de PCR do gene mitocondrial *cox1* para *E. coelomaticum* no GenBank, o que limita a comparação apenas às demais espécies do gênero.

Tanto a população de Minas como a da China (ZHENG et al., 2007) revelaram possuir diversidade genética para o marcador nuclear 18S, que poderá ser usado em estudos populacionais mais aprofundados. Os filogramas inferidos pelo gene 18S a partir dos diferentes iniciadores mostraram que as amostras de Lavras e Campo Belo estão situadas em posições distintas com valores consideráveis de autoinicialização entre 34 e 86 e, junto com as demais espécies de *Eurytrema* formam um clado. Estes resultados indicaram *E. coelomaticum* apresenta uma relação evolutiva mais distante das demais espécies do gênero, sendo *E. pancreaticum* e *E. cladorchis* mais próximos. Quando os espécimes do gênero *Eurytrema* descritos por Cai e colaboradores (2012) foram incluídos na árvore, ocorreu um desmembramento que separou *E. pancreaticum* de *E. cladorchis*, surgindo um novo ramo com *E. pancreaticum*, *E. cladorchis* e *E. fukienensis*. Estes foram descritos em outro ramo junto com *E. pancreaticum* (ZHENG et al., 2007; SU et al., 2018) próximos a *E. cladorchis* (MOHANTA et al., 2015), demonstrados na figura 23.

Cai e colaboradores (2012), demonstraram que os fatores genéticos de distância entre *E. fukienensis* e *E. pancreaticum* são maiores do que a distância genética entre *E.*

pancreaticum e *E. coelomaticum*, o que indicou que *E. fukienensis* seria uma espécie independente no gênero *Eurytrema*. Para esses autores, parece haver diferença filogenética entre as mesmas espécies de *Eurytrema* spp. de diferentes hospedeiros e localizações geográficas.

Mohanta et al. (2015), apresentaram em seu filograma, construído a partir do gene 18S rRNA, que todos os haplótipos de *E. cladorchis* do seu estudo recuperados de bovinos (Bangladesh) formam um clado monofilético e outros membros do gênero *Eurytrema* são irmãos de *E. cladorchis*, e que o aglomerado formado por *E. cladorchis* do seu estudo seria bastante distinto daquele formado por *E. cladorchis* e *E. fukienensis* relatados da China e recuperados de cervos (CAI et al., 2012). Esses resultados indicam que *E. cladorchis* desses dois países é geneticamente distinto, o que levou Mohanta e colaboradores (2015) discutirem que pode haver uma compreensão errada sobre a identificação de *E. cladorchis* realizada por Cai e colaboradores (2012).

Figueira e colaboradores (2014) realizaram ensaios de PCR amplificando um fragmento de 528 pb do gene 18S rRNA em amostras de *E. coelomaticum* do Paraná. As análises filogenéticas revelaram que os seus isolados formaram um *cluster* que continha *E. coelomaticum*, *E. pancreaticum* e *Lyperosomum collurionis*. No entanto, suas amostras estavam mais intimamente relacionadas à *E. pancreaticum*, enquanto formavam um aglomerado distante filogeneticamente de *F. gigantea*, o mesmo visualizado em nossos resultados. Estes autores sugerem que *E. coelomaticum* de regiões distintas poderiam estar intimamente relacionados, considerando que os seus isolados e os da China (ZHENG et al., 2007) se agruparam. Em nossos resultados mostramos que os isolados de *E. coelomaticum* do Brasil estão mais próximos geneticamente entre si ao comparar com as sequências dos helmintos da China (ZHENG et al., 2007).

Estudos filogenéticos da família Dicrocoeliidae apontam que os dicrocelídeos parasitos de aves apresentam grande aproximação genética com os dicrocelídeos presentes em mamíferos. Já foi demonstrada a relação entre os gêneros *Lyperosomum* que parasita aves e *Eurytrema* que parasita mamíferos. O mesmo ocorre com o gênero *Dicrocoelium* que também parasita bovinos e se encontra mais relacionado geneticamente a *Brachylecithum*, espécie parasito de rapinantes (HILDEBRAND et al., 2019; SULEMAN et al., 2020), e nossos resultados corroboram com estas informações.

Su et al. (2018) realizaram a caracterização molecular completa da sequência de DNA de *E. pancreaticum* e apresentaram a análise filogenética. Concluíram que membros da subclasse Digenea e a posição filogenética de *E. pancreaticum*, que se apresentou no mesmo

clado que *E. coelomaticum*, como esperado, tem como gêneros mais próximos: *Lyperosomum*, *Dicrocoelium* e *Brachylecithum*, todos representantes da família *Dicrocoeliidae*, o mesmo observado em nossos resultados.

Mohanta et al. (2015) mostraram em seu filograma construído a partir de sequências ITS2 (229 pb), que *E. cladorchis* de Bangladesh e *E. pancreaticum* formaram um clado monofilético a partir de ancestral comum com um alto valor de autoinicialização (100). Além disso, destacou que os membros do gênero *Dicrocoelium* são distintos do gênero *Eurytrema*. Em nossos resultados a árvore filogenética inferida a partir do gene mitocondrial *cox1* demonstrou que *E. coelomaticum* forma um clado separado de *E. pancreaticum* e *E. cladorchis* e o gênero distinto mais próximo é *Lyperosomum*.

Chang e colaboradores (2016) realizaram a caracterização completa do genoma mitocondrial de *E. pancreaticum*, estes autores ressaltam a importância da expansão da amostragem de táxons usando conjuntos de dados genômicos mitocondriais como fundamentais para estudos filogenéticos futuros de trematódeos digenéticos. Nossos resultados filogenéticos são consistentes com os métodos morfológicos tradicionais de classificação, isso evidencia a importância da taxonomia integrativa com a associação da biologia molecular com a morfologia. A integração destes resultados é fundamental em estudos taxonômicos, filogenéticos e epidemiológicos.

Na seção 'Em espécies', Bonde (1977) explica: “se a filogenia é visualizada como uma árvore filogenética, todos os inter-nós (ou segmentos) representam uma espécie, independentemente das mudanças que ocorrem entre os nós. Desta maneira, o grau de similaridade dentro de uma espécie é irrelevante”, deixando evidente que não basta a biologia molecular para garantir a autenticidade de uma espécie ou sua variabilidade dentro de uma população. Esse aspecto destaca a importância da morfologia/morfometria para indicar quando uma espécie real é encontrada na natureza.

De acordo com Brooks (2003), a parasitologia tem uma rica tradição de estudos que ligam taxonomia, ecologia e ciclos de vida e desenvolvimento. Esta tradição produziu uma enorme quantidade de evidências empíricas demonstrando que os parasitos formam organismos reprodutivos altamente integrados - sistemas ecológicos de desenvolvimento altamente persistentes no espaço e no tempo. Além disso, estudos filogenéticos de parasitos, especialmente de platelmintos, representam uma das áreas que mais contribuem para a biologia sistemática.

Como a euritrematose bovina é endêmica no Brasil já tendo sido descrita nos estados do Paraná (AZEVEDO et al., 2000; BASSANI et al., 2006; FIGUEIRA et al., 2014), Santa

Catarina (GROSSKOPF et al., 2017), Rio Grande do Sul (COSTA et al., 1986), Minas Gerais (RACHID et al., 2011; DA SILVA JR et al., 2018), São Paulo (MATTOS JUNIOR & VIANNA, 1987), Rio de Janeiro (PINHEIRO et al., 2015; LEITE et al., 2020), Mato Grosso do Sul (YAMAMURA et al., 1995), Mato Grosso e Goiás (SANTOS & PRATA, 1998) seria interessante realizar a caracterização molecular completa de *E. coelomaticum* existente no Brasil e de espécies relatadas em todo o mundo, utilizando o marcador 18S rRNA, devido à sua diversidade genética, para estudos populacionais.

CONCLUSÕES

- a) A caracterização morfológica e molecular dos helmintos recuperados de bovinos provenientes das duas fazendas de MG nos permitiu identificar a espécie de trematoda *Eurytrema coelomaticum*.
- b) Com base nos dados da morfometria concluimos que a relação entre ventosa oral e ventosa ventral, bem como o comprimento e a largura dos ovos, são estruturas mais conservadas e devem ser valorizadas na identificação morfológica de espécies do gênero *Eurytrema*;
- c) Com a caracterização morfológica dos sistemas reprodutores, demonstramos que a posição do ovário, glândulas vitelínicas, assim como a presença de papilas na região anterior da face dorsal são características que enriquecem a diagnose da espécie *E. coelomaticum*;
- d) A região *cox1* apresenta-se bastante conservada e pode ser aplicada em estudos futuros de diversidade intra-populacional de *E. coelomaticum*;
- e) A aplicação da taxonomia integrativa em *E. coelomaticum*, baseada na combinação de diversas técnicas de microscopia e biologia molecular, contribuiu para inserção de novos critérios morfométricos, morfológicos e moleculares, ampliando a compreensão desta espécie no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ADNET, F.A., GONÇALVES, J.P., DE SOUZA, W., ATTIAS, M., 2013. **A simple and efficient method to observe internal structures of helminths by scanning electron microscopy.** *Microsc. Microanal.* 19:1470-1474.
- AMATO, J.F.R.; BOEGER, W.A.; AMATO, S.B. 1991. **Coleta e processamento de parasitos de pescado.** Seropédica: UFRRJ, 81p. Protocolos para laboratório.
- AVISE, J. C. 2000. **Phylogeography: The history and formation of species.** Cambridge: Harvard University Press. p. 447.
- AZEVEDO, J. R.; MANNIGEL, R. C.; BORBA, T. R.; BARBIÉRI, A. W.; OLIVEIRA, D. C. L.; HEADLEY, S. A.; JANEIRO, V. 2000. **Prevalence and geographical distribution of bovine eurytrematosis in cattle slaughtered in Northern Paraná, Brazil.** Maringá: CESUMAR.
- BARBOSA, E.F.G., CARDOSO, S.P., SANTOS, B.H.S., CASTRO, M.B. 2014. **Pancreatite por *Eurytrema* spp. em caprinos no Distrito Federal.** Trabalho apresentado em congresso Endivet – VII Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário e Enisap – II Encontro Internacional de Sanidade Animal de Produção.
- BASSANI, C.A., SANGIONI, L.A., PAULO, J., SAUT, E., HEADLEY, S.A., YAMAMURA, M.H. 2007. **Euritrematose bovina.** *Ciências Agrar. Londrina.* 28: 299–316.
- BASSANI, C.A., SANGIONI, L.A., SAUT, J.P.E., YAMAMURA, M.H., HEADLEY, S.A. 2006. **Epidemiology of eurytrematosis (*Eurytrema* spp. Trematoda: Dicrocoeliidae) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the state of Paraná, Brazil.** *Vet. Parasitol.* 141: 356–361.
- BAKKE, T. A. 1988. **Abnormalities in adult digeneans, with special reference to *Phyllodisfomum urnblae* (Fabricius) (Platyhelminthes, Gorgoderidae).** *Zoologica Scripta.* 17-2:123-134.
- BELÉM, P. A. D.; OLIVEIRA, M. R.; PADOVANI, C. R. 1994. **Alterações pancreáticas em bovinos naturalmente infectados por *Eurytrema* sp e sua associação com a carga parasitária e o número de ovos por grama de fezes (OPG).** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo.* 3-4:273-281.
- BELÉM, A.D ; PERAÇOLI, M.T.S.; DE OLIVEIRA, M.R ; PADOVANI, C.R. 1996. **Intradermo-reação cervical para diagnóstico de infecções por *Eurytrema* sp em bovinos.** *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* São Paulo. 24-27.
- BHALERAO, G.D. 1936. **Studies on the helminths of India.** Trematoda I. *J Helminthol.* 14: 163-180.
- BONDE, N. 1977. **Cladistic classification as applied to vertebrates.** In: Hecht MK Goody PC Hecht BM eds. *Major patterns in vertebrate evolution.* New York, NY: Plenum Press, 741–804.

- BORGES, J.N., COSTA, V.S., MANTOVANI, C., BARROS, E., SANTOS, E.G., MAFRA, C.L. & SANTOS, C.P. 2017. **Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidiopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara***. Journal of Fish Diseases. 40, 191-203.
- BOWLES, J., BLAIR, D., MCMANUS, D. P. 1992. **Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing**. Mol Biochem Parasitol. 54(2):165-73.
- BRANDOLINI, S.V.P.B. & AMATO, S.B. 2001. **Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae)**. Rev. Bras. Zool. 18: 499–510.
- BRANT, P. C. 1962. **Frequência de algumas parasitoses em carcaças e vísceras de bovinos abatidos em Belo Horizonte**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.14, p.127-132.
- BRAY, R. A., GIBSON, D. I; JONES, A. 2008. **Keys to the Trematoda**. CAB International and Natural History museum, London v.3.
- BRAY, R.A. & JUSTINE, J.L. 2013. **Bucephalidae (Digenea) from epinephelins (Serranidae: Perciformes) from the waters off New Caledonia, including *Neidhartia lochepintade* n. sp.** Parasite. 20,56.
- BROOKS, D.R. 2003. **Lessons from a quiet classic**. Journal of Parasitology, 89(5):878-885.
- CAI, Z., ZHANG, Y., YE, X. 2012. **Phylogenetic relationships of the genus *Eurytrema* from domestic and wild animal based on 18S rRNA sequences**. Parasitol Res. 111:1637-1644.
- CAMPOS, M. S.; RAGUSA, A. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M. M. 1974. **Correlação entre o número de parasitas e peso de pâncreas em bovinos naturalmente infestados por *Eurytrema pancreaticum*, Janson 1889 (Trematoda, Dicrocoeliidae); diferença de peso entre pâncreas parasitados e não parasitados**. Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, v.11, p.295-299.
- CAPUTO, L.F.G., GITIRANA, L.B., MANSO, P.P.A. 2009. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais e laboratório de saúde. Técnicas histológicas**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro v.2. Cap. 3, 290p.
- CASANOVA, J.C. & RIBAS, A. 2004. **Description of *Brachylecithum mackoi* n. sp. (Digenea: Dicrocoeliidae) from the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* (Insectivora: Erinaceidae)**. Journal of Parasitology. 90, 793-796.
- CHANG, Q.C., LIU, G.H., GAO, J.F., ZHENG, X., ZHANG, Y., DUAN, H., YUE, D.M., FU, X., SU, X., GAO, Y., WANG, C.R. 2016. **Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genome from the pancreatic fluke *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae)**. Gene. 576: 160–165.

- CHATTERJI, R. C. 1938. **Annotated list of the helminths recorded from domesticated animals of Burma.** Part I. Trematoda. Proceedings of the National Academy of Sciences, India 8:93-104.
- COGSWELL, A.A., KOMMER, V.P., WILLIAMS, D.L. 2012. **Transcriptional Analysis of a Unique Set of Genes Involved in *Schistosoma mansoni* Female Reproductive Biology.** PLOS Neglected Tropical Diseases. 6: e1970.
- COHEN, S.C., KOHN A., BAPTISTA-FARIAS, M.D.F. 2001. **Scanning and Transmission Electron Microscopy of the Tegument of *Paranaella luquei* Kohn, Baptista-Farias & Cohen, 2000 (Microcotylidae, Monogenea), Parasite of a Brazilian Catfish, *Hypostomus regain*.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 96, 555-560.
- COLHOUN, L.M., FAIRWEATHER, I., BRENNAN, G.P. 1998. **Observations on the mechanism of eggshell formation in the liver fluke, *Fasciola hepatica*.** Parasitology. 116, 555-567.
- CONN, D.B., ŚWIDERSKI, Z., MIQUEL, J. 2018. **Ultrastructure of digenean trematode eggs (Platyhelminthes: Neophora): A review emphasizing new comparative data on four European Microphalloidea.** Acta Parasitologica, 2018, 63(1), 1–14; ISSN 1230-2821.
- CORREA, W. M., CORREA, C. N. M., FERREIRA, A. C., PAES, A. C. 1984. ***Eurytrema pancreaticum*: clínica e diagnóstico em bovinos.** A Hora Veterinária, Porto Alegre, v.4, n.19, p.31-34.
- COSTA, H. M. A; LEITE, A. C. R.; GUIMARÃES, M. P.; LIMA, W. S. 1986. **Distribuição de helmintos parasitas de animais domésticos no Brasil.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Belo Horizonte, v.38, n.4, p.465- 579.
- DA SILVA JR, F.A. 2017. **Ocorrência e caracterização morfológica de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) em rebanhos bovinos provenientes da região sul de Minas Gerais, Brasil.** 2017. 75 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Saúde)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/26665>
- DA SILVA JÚNIOR, F.A, MONTEIRO DA SILVA C., DE ALMEIDA F.B., RODRIGUES-SILVA R. 2018. **Digital image analysis to estimate the minimum number of *Eurytrema coelomaticum* eggs in the uterus of adult specimens.** Helminthologia, 55, 3: 204 – 212.
- DE SOUZA, W. 2011. **Técnicas Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas.** 3 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 420p.
- DOLLFUS, R. P. 1922. **Variations dans la form du corps, la position et la form des testicules chez *Dicrocoelium lanceolatum* (Rudolphi).** Bull. Soc. Zool. France. 312-342.
- EDUARDO, S. L.; MANUEL, M. F.; TONGSON, M. S. 1976. ***Eurytrema escuderoi*, a new species and two other previously known species of the genus *Eurytrema*.** Philippine Journal of Science, Manila, v.15, n.1-2, p.104-116.

- FARJALLAH, S., SLIMANE, B.B.E.N., PIRAS, C.M., AMOR, N., GARIPPA, G., MERELLA, P. 2013. **Molecular characterization of *Fasciola hepatica* from Sardinia based on sequence analysis 68 of genomic and mitochondrial gene markers.** Exp. Parasitol. 135: 471–478.
- FAULWETTER, S., VASILEIADOU, A., KOURATORAS, M., THANOS, D., ARVANITIDIS, C. 2013. **Micro-computed tomography: Introducing new dimensions to taxonomy.** Zookeys. 263:1-45.
- FERNÁNDEZ, N., RIVERO, C.L.R., PÉREZ, C.J.S. 2012. **Incremento de la sensibilidad analítica del sistema FasciDIG® para el diagnóstico de *Fasciola hepatica*.** Revista cubana de medicina tropical 64(3):224-228.
- FIGUEIRA, G.F., DE OLIVEIRA, V.H.S., TARODA, A., ALFIERI, A.A., HEADLEY, S.A. 2014. **Caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos do estado do Paraná, Brasil.** Rev. Bras. Parasitol. Vet. 23: 383–386.
- FIGUEIREDO, C. B. 1928. **Sobre as lesões do pâncreas de boi produzidos pelo *Eurytrema pancreaticum*.** Rio de Janeiro: Memorial Instituto Oswaldo Cruz.
- FRANCO-ACUÑA, D.O, PINHEIRO, J., OLIVEIRA-MENEZES, A., BRANDOLINI, S.V.P.B., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. 2016. **Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, adenosine deaminase activity and zinc levels.** Res. Vet. Sci. 110: 79-84.
- FREELAND, J. R. 2005. **Molecular Ecology.** Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. PMCID: 548581.
- GIARD, A. & BILLET, A. 1982. **Sur quelques trematodes parasites des boeufs du Tonkin.** C.R. Social Biology, Madison, v.4, p.613-615.
- GOMES, E.M., CHAGAS, G.M., PINHEIRO, J. 2000. **The Influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*.** Braz. arch. biol. technol 2011; 43: 1–7.
- GROSS, R., NILSSON, J. & SCHMITZ, M. 1996. **A new species-specific nuclear DNA marker for identification of hybrids between Atlantic salmon and brown trout.** Journal of Fish Biology, 49(3). 537-540.
- GROSSKOPF, H.M., SCHWERTZ, C.I., MACHADO, G., BOTTARI, N.B., DA SILVA, E.S., GABRIEL, M.E., LUCCA, N.J., ALVES, M.S., SCHETINGER, M.R.C, MORSCH, V.M., MENDES, R.E., DA SILVA, A.S. 2017. **Cattle naturally infected by *Eurytrema coelomaticum*: Relation between adenosine deaminase activity and zinc levels.** Res. Vet. Sci.. 110: 79-84
- GUIMARÃES, C. T., DE MAGALHÃES, J. V., LANZA, M. A., SCHEUSTER, I. 2009. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte 30.253: 86-95.

HANNA, R.E.B. 2015. ***Fasciola hepatica*: Histology of the Reproductive Organs and Differential Effects of Triclabendazole on Drug-Sensitive and Drug-Resistant Fluke Isolates and on Flukes from Selected Field Cases.** Pathogens. 4, 431-456.

HEADLEY, S.A. 2000. **Bovine Eurytrematosis : Life Cycle, Pathologic Manifestations and Public Health Considerations.** Cesumar. 2: 59–62.

HEADLEY, S.A., SAUT, J.P.E., BASSANI, C.A., SANGIONI, L.A., JUNIOR, E.H.B., YAMAMURA, M.H. 2009. **Histopathologic patterns of pancreatic lesions induced by *Eurytrema coelomaticum* in cattle from the central-west region of the state of Paraná, southern Brazil.** Brazilian J. Vet. Pathol. 2: 3–7.

HENEBERG, P., SITKO, J., BIZOS, J. 2015. **Integrative taxonomy of central European parasitic flatworms of the family *Prosthogonimidae* Lühe, 1909 (Trematoda: Plagiorchiida).** Parasitol Int. 64: 264-273.

HENEBERG, P., SITKO, J., BIZOS, J. 2016. **Molecular and comparative morphological analysis of central European parasitic flatworms of the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda: Plagiorchiida).** Parasitology. 143:455-474.

HILDEBRAND, J., PYRKA, E., SITKOB, J., JEŻEWSKIC, W., ZALEŚNYD, G., TKACHE, V.V., LASKOWSKIC, Z. 2019. **Molecular phylogeny provides new insights on the taxonomy and composition of *Lyperosomum* Looss, 1899 (Digenea, Dicrocoeliidae) and related genera.** IJP: Parasites and Wildlife 9:90–99

HILDEBRAND, J., OKULEWICZ, J. & POPIOLEK, M. 2007. **A new dicrocoeliid from the bank vole *Clethrionomys glareolus* (Rodentia: Microtidae) from Poland.** Journal of Parasitology. 93, 151-154.

HORTA, P.P. 1918. **Distomatose pancreática e glicosúria em bovinos.** A lavoura, Rio de Janeiro, v.22, n.3-4, p.157-158.

IBGE - Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Pecuária Municipal, 2017. Disponível em: <https://www.beefpoint.com.br/ibge-rebanho-bovino-predomina-no-centro-oeste-e-mato-grosso-lidera-entre-os-estados/>. Acessado em: 03 de set. 2020

ILHA MRS, LORETTI AP, REIS ACF. 2005. **Wasting and mortality in beef cattle parasitized by *Eurytrema coelomaticum* in the state of Paraná, southern Brazil.** Vet. Parasitol. 133: 49–60.

ISHII, Y., KOGA, M., FUGINO, T., HIGO, H., ISHIBASHI, J., OKA K, SAITO S. 1983. **Human infection with the pancreas fluke, *Eurytrema pancreaticum*.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 32(5):1019-1022.

ITAGAKI, H. & CHINONE, S. 1982. **Histories of rumen flukes and pancreas of ruminants. In: Japan-Brazil Symposium on Science and Technology.** Proceeding Tokyo: Agency of Industrial Science and Technology, out. p.25-27.

JIMÉNEZ, B. & MAYA-RENDON, C. 2007. **Helminths and sanitation.** Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol. 52: 60–71.

- JONES, A. 1985. *Eurytrema cladorchis* Chin, Li and Wei, 1965 (Trematoda: Dicrocoelidae), a little known species from China and Nepal. Syst. Parasitol. 7: 43–45.
- KEISER, J. & UTZINGER, J. 2009. Food-borne trematodiasis. Clin. Microbiol. Rev. 22: 466–483.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MEINTJES, P., DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 28(12): 1647–1649.
- KRUPENKO, D.Y. & DOBROVOLSKIJ, A.A. 2015. Somatic musculature in trematode hermaphroditic generation. BMC Evolutionary Biology. 15, 189.
- KRUPENKO, D.Y. 2014. Muscle system of *Diplodiscus subclavatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous, and ovigerous adults. Parasitology Research. 113, 941–952.
- KRUPENKO, D.Y. 2019. Oral sucker in Digenea: structure and muscular arrangement. Zoomorphology. 138, 29–37.
- KUMAR, D., MCGEOWN, J.G., REYNOSO-DUCOING, O., AMBROSIO, J.R. & FAIRWEATHER, I. 2003. Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Parasitology. 127, 457-73
- LAPAGE, G. 1956. Monning's veterinary helminthology and entomology. 4. ed. London: Baillière-Tindall & Cox, Covent Garden.
- LEITE, K.G. 2015. Caracterização morfométrica e morfológica por microscopia de campo claro, microscopia de varredura a laser confocal e microscopia eletrônica de varredura de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 (Trematoda: Digenea) recuperado de bovinos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. 68 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia e Imunologia médica humana) Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- LEITE, K.G., LOPES-TORRES, E.J., SOUZA, J.G.R., NEVES, R.H., GOMES, D.C., MACHADO-SILVA, J.R. 2020. *Eurytrema coelomaticum*: updated morphology of adult worms using advanced microscopy experiments. Journal of Helminthology 94, e122, 1–9.
- LOOSS, A & CUFFEY, E. 1907. On some parasites in the museum of the School of Tropical Medicine, Liverpool with a contribution on the case of distomiasis of the liver and rectum. Ann Trop Med Parasitol. 1:123–154.
- LOPES-TORRES, E.J., DE SOUZA, W., MIRANDA, K. 2013. Comparative analysis of *Trichuris muris* surface using conventional, low vacuum, environmental and field emission scanning electron microscopy. Vet. Parasitol. 196: 409–416.
- LOPES-TORRES, E.J., GIRARD-DIAS W., MELLO W.N., SIMOES R.O., PINTO I.S., MALDONADO JR A., DE SOUZA W. & MIRANDA K. 2019. Taxonomy of *Physaloptera*

mirandai (Nematoda: Physalopteroidea) based in three-dimensional microscopy and phylogenetic positioning. *Acta Tropica*. 195, 115-126.

LOPES-TORRES, E.J., MALDONADO JR., A., ANJOS, D.H., DE SOUZA, W. & MIRANDA, K. 2015. **Redescription of *Spirura guianensis* (Nematoda: Spiruridae) from a rare South American Gracile Opossum.** *Acta Tropica*. 150, 87-93.

MACHADO-SILVA, J.R., LANFREDI, R.M. & GOMES, D.C. 1997. **Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by scanning electron microscopy.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 92, 647-653.

MACHADO-SILVA, J.R., PELAJO-MACHADO, M., LENZI, H.L. & GOMES, D.C. 1998. **Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93, 303-307.

MAIR, G.R., MAULE, A.G., DAY, T.A.; HALTON, D.W. 2000. **A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*.** *Parasitology*. 121, 163-170.

MAIR, G.R., MAULE, A.G., SHAW, C.; HALTON, D.W. 1998. **Muscling in on parasitic flatworms.** *Parasitology Today*. 14, 73–76.

MALDONADO JR, A., LOKER, E.S., MORGAN, J.A., REY, L., LANFREDI, R.M. 2011. **Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis.** *Parasitol Res*. 87: 840-848.

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

MANNINGER, R. & MÓCSY, J. 1973. **Patología y terapêutica especiales de los animales domésticos.** 3. ed. Barcelona: Labor, v.2.

MARQUES, J.S.; ROCHA, B.M., MANSO, P.P.A. & D'ÁVILA, S. 2017. **New insights on the morphology of a digenean parasite (Digenea: Brachylaimidae, *Brachylaima mazzantii* (Travassos, 1927) using confocal laser scanning microscopy.** *Zoosystema*. 39, 449-462.

MARTINEZ, E.M.; COSTA-SILVA, M.; NEVES, R.H.; DE OLIVEIRA, R.M.F.; MACHADO-SILVA, J.R. 2008. **Biological implications of the phenotypic plasticity in the *Schistosoma mansoni*-*Nectomys squamipes* model.** *Rev. Inst. Med. trop.* 50(4):229-232.

MATTOS, J.R.D.G & VIANNA, S.S. 1987. **O *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae) no Brasil.** *Arquivos Fluminenses de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro*, v.2, n.1, p.3-7.

MOHANTA, U.K., ICHIKAWA-SEKI, M., HAYASHI, K., ITAGAKI, T. 2015. **Morphological and molecular characterization of *Eurytrema cladorchis* parasitizing cattle (*Bos indicus*) in Bangladesh.** *Parasitol. Res*. 114: 2099–2105.

- MORIYAMA, N.; TSUJI, M.; SETO, T. 1980. **Karyological studies on bovine pancreatic flukes (*Eurytrema* sp.) and their phenotypes.** Japanese Journal of Parasitology, Tokyo, 29:281-291.
- NEVES, R.H., DE LAMARE, B.C., MACHADO-SILVA, J.R., CARVALHO, J.J., BRANQUINHO, T.B., LENZI, H.L., HULSTIJN, M. & GOMES, D.C. 2005. **A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy.** Parasitology Research. 95, 43-49.
- NEVES, R.H.; COSTA-SILVA, M.; MARTINEZ, E. M.; BRANQUINHO, T.B.; DE OLIVEIRA, R.M.F.; LENZI, H.L.; GOMES, D.C.; MACHADO-SILVA, J.R. 2004. **Phenotypic plasticity in adult worms of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) evidenced by brightfield and confocal laser scanning microscopies.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99:2.
- NEVES, R.H., PEREIRA, M.J., DE OLIVEIRA, R.M., GOMES, D.C., MACHADO-SILVA, J.R. 1998. ***Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: morphometric differences between adult worms from sympatric rodent and human isolates.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 93:309-312.
- NEVEU-LEMAIRE, M. 1936. **Traite D 'Helminthologie Médicale et Vétérinaire.** Tomo II. Vigot Frères, E diteurs. Paris
- NIERBERLE, K. & COHRS, P. 1970. **Anatomia patológica especial dos animais domésticos.** Lisboa: Fund. Calous. Gulbenkian.
- OGAWA, H., TAKEHARA, Y., NAGANAWA, S., YAMAGUCHI, J., NAKAGURO, M. 2019. **A case of human pancreatic eurytremiasis.** Abdominal Radiology. 44(4):1213-1216.
- PETERS, R.H. 1983. **The ecological implications of body size.** Cambridge University Press, Cambridge
- PINHEIRO, J., FRANCO-ACUÑA, D.O., OLIVEIRA-MENEZES, A., BRANDOLINI, S.V., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. 2011. **Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907.** Vet Parasitol. 182: 201-212.
- PINHEIRO, J., FRANCO-ACUÑA, D.O., OLIVEIRA-MENEZES, A., BRANDOLINI, S.V.P.B., ADNET, F.A., LOPES-TORRES, E.J., MIRANDA, F.J.B., DE SOUZA, W., DAMATTA, R.A. 2015. **Additional study of the morphology of eggs and miracidia of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda).** Helminthol. 52: 244–251.
- PINHEIRO, J., FRANCO-ACUÑA, D.O., OLIVEIRA-MENEZES, A., PASCHOAL BLANCO BRANDOLINI, S.V., DAMATTA, R.A., DE SOUZA, W. 2012. **New insight into the morphology of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae) cercariae by light, scanning, and transmission electron microscopies.** Parasitol. Res. 111: 1437–1445.
- PINTO, H.A. & MELO, A.L. 2016. **Comments on human eurytremiasis in Brazil.** World. J. Exp. Med. 6:55-57.

- POULIN, R.; GIARI, L.; SIMONI, E.; DEZFULI, B. S. 2003. **Effects of conspecifics and heterospecifics on individual worm mass in four helminth species parasitic in fish.** Parassitology Research 90:143-147.
- PURVIS, G.B. 1931. **The species of *Eurytrema* in domestic ruminants.** Vet. Rec. 121(1): 283-584.
- QUEVEDO, P. DE S., MENDES, M., FELIPE, G.P., SOARES, M.P., MULLER, G., FARIAS, N.A. DA R.F. 2013. **Pancreatite intersticial crônica em bovino causada por *Eurytrema coelomaticum*.** Ciência Rural. 43: 1449–1452.
- RACHID, M.A., AQUINO NETO, H.M., FACURY-FILHO, E.J., CARVALHO, A.U., VALLE, G.R., VASCONCELOS, A.C. 2011. **Chronic interstitial pancreatitis and chronic wasting disease caused by *Eurytrema coelomaticum* in Nelore cow.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 63:741-743.
- RAILLIET, A. & MAROTEL, G. 1898. **La douve pancréatique parasite des boeufs et des buffles em Cochinchine,** in Arch. Paras., V.I, 30-38.
- RIBEIRO, C.M., LIMA, D.E., KATAGIRI, S. 2013. **Importância do exame coprológico no diagnóstico da eurytrematose bovina.** Veterinária e Zootec. 20: 70–73.
- SANTOS, I. F.& PRATA, L. F. 1998. **Monitoramento de afecções crônica no abate de bovinos: ocorrência e distribuição geográfica de *Eurytrema* ssp. Em animais abatidos em Barretos, estado de São Paulo.** Ars Veterinaria, Jaboticabal, 61-69.
- SAKAMOTO, T. & OIKAWA, T. 2007. **Cubic crystal protein inclusions in the neodermis of the pancreatic fluke, *Eurytrema pancreaticum*, and *Eurytrema coelomaticum*.** Parasitol. Res. 101: 1393–1399.
- SAKAMOTO, T., KONO, I.S., YASAUDA, N., YAMAMOTO, Y., NAKAGAWA, H. 1980. **Studies on *Eurytrema coelomaticum* II. : The Anthelmintic efficiency of nitroxynil and praziquantel against *Eurytrema coelomaticum* in cattle.** Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 16: 93–101.
- SCHWERTZ, C.I, DO CARMO, G.M., BOTTARI, N.B., DA SILVA, E.S., GABRIEL, M.E., LUCCA, N.J., GUARDA, N.S., MORESCO, R.N., MACHADO, G., MORSCH, V.M., SCHETINGER, M.R.C., STEFANI, L.M., MENDES, R.E., DA SILVA, A.S. 2016a. **Relationship between pathological findings and cholinesterase activity and nitric oxide levels in cattle infected naturally by *Eurytrema coelomaticum*.** J. Comp. Pathol. 154: 150–156.
- SCHWERTZ, C.I., GABRIEL, M.E., HENKER, L.C., BOTTARI, N.B., DO CARMO, G., GUARDA, N.S., MORESCO, R.N., MACHADO, G., MORSCH, V.M., SCHETINGER, M.R.C., STEDILLE, F.A., BASKA, P., MATTEI, V., DA SILVA, A.S., MENDES, R.E. 2016b. **Oxidative stress associated with pathological changes in the pancreas of cattle naturally infected by *Eurytrema coelomaticum*.** Vet. Parasitol. 223: 102–110.
- SCHWERTZ, C.I., HENKER, L.C., MENDES, R.E. 2017. **Comments on eurytrematosis in Brazil and the possibility of human infection.** World J Exp Med. 7(1): 40-41.

SCHWERTZ, C.I., LUCCA, N.J., DA SILVA, A.S., BASKA, P., BONETTO, G., GABRIEL, M.E., CENTOFANTI, F., MENDES, R.E. 2015. **Eurytrematosis: An emerging and neglected disease in South Brazil.** World J Exp Med.. 5:160-163.

ŠEBELOVÁ, S., STEWART, M.T., MOUSLEY, A., FRIED, B., MARKS, N.J. & HALTON, D.W. 2004. **The musculature and associated innervation of adult and intra molluscan stages of *Echinostoma caproni* (Trematoda) visualised by confocal microscopy.** Parasitology Research. 93, 196-206.

SKÍRNISSON, K., KOLÁROVÁ, L., HORÁK, P., FERTÉ, H. & JOUET, D. 2012 **Morphological features of the nasal blood fluke *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae, Digenea) from naturally infected hosts.** Parasitology Research. 110, 1881-1892.

SOHN, W-M., NA, B-K, SHIN, S-S. 2017. **New Definitive Hosts and Differential Body Indices of *Isthmiophora hortensis* (Digenea: Echinostomatidae).** Korean J Parasitol 55, 3: 287-294

SOUZA, J.G.R., GARCIA, J.S., GOMES, A.P.N., MACHADO-SILVA, J.R.; MALDONADO Jr, A. 2017. **Comparative pattern of growth and development of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) in hamster and Wistar rat using light and confocal laser scanning microscopy.** Experimental Parasitology. 183, 41-49.

SOUZA, J.G.R., GARCIA, J.S., MANSO, P.P.A., NEVES, R.H., MALDONADO Jr., A.; MACHADO-SILVA, J.R. 2011. **Development of the reproductive system of the *Echinostoma paraensei* in *Mesocricetus auratus* analyzed by light and confocal scanning laser microscopy.** Experimental Parasitology. 128, 341-346.

SU, X., ZHANG, Y., ZHENG, X., WANG, X.X., LI, Y., LI, Q., WANG, C.R. 2018. **Characterization of the complete nuclear ribosomal DNA sequences of *Eurytrema pancreaticum*.** Journal of Helminthology, 1-7.

SULEMAN, KHAN, M.S., TKACH, V.V., MUHAMMAD, N., ZHANG, D., ZHU Z-Q, MA, J. 2020. **Molecular phylogenetics and mitogenomics of three avian dicrocoeliids (Digenea: Dicrocoeliidae) and comparison with mammalian dicrocoeliids.** Parasites Vectors 13:74

TANG, Z. & TANG, C. 1977. **The biology and epidemiology of *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) and *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) in cattle and sheep in China.** Acta Zool. 23: 267-282.

TENEVA, A. 2009. **Molecular markers in animal genome analysis.** Biotechnology in Animal Husbandry, 25(5-6), 1267-1284.

TEOFANOVA, D., HRISTOV, P., YOVEVA, A., RADOSLAVOV, G. 2012. **Issues Associated with Genetic Diversity Studies of the Liver Fluke, *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes, Digenea, Fasciolidae).** INTECH Open Access Publisher.

- TERASAKI, K., ITAGAKI, T., SHIBAHARA, T., NODA, Y. & MORIYAMA-GONDA, N. 2001. **Comparative study of the reproductive organs of *Fasciola* groups by optical microscope.** Journal of Veterinary Medical Science. 63, 735-42.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. 1994. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acids Res. 22(22):4673-80.
- TRAVASSOS, L. 1944. **Revisão da família Dicrocoeliidae, Odhner, 1910.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional (Monografia do Instituto Oswaldo Cruz, n. 2).
- TRAVASSOS, L., TEIXEIRA DE FREITAS, J.F., KOHN, A. 1969. **Trematódeos do Brasil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 67: 1-886.
- WARE, F. 1923. **Some members of the family Dicrocoelidae affecting domestic animals.** Journal of Comparative Pathology and Therapeutics. Volume 36, 33-39.
- WIRORENO, W., CARNEY, W.P., ANSORI, M. 1987. **Description and growth pattern of *Eurytrema pancreaticum* from *Bos indicus* from East Java.** Proc. Helm. Soc. Wash. 54: 73-77.
- YAMAGUTI, S. 1975. **A Synoptical review of life histories of digenetic of vertebrates.** Tokyo: Keikan Publish Co. Japan.
- YAMAMURA, M.H. 1989. **Algumas avaliações sobre a patologia e controle da euritrematíase bovina.** Rio de Janeiro. Tese [Doutorado], Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 128p. Disponível em: <http://r1.ufrjr.br/wp/ppgcv/wp-content/themes/PPGCV/pdf/R103.pdf>.
- ZHENG, Y., LUO, X., JING, Z., HU, Z., CAI, X. 2007. **Comparison of 18S ribosomal RNA gene sequences of *Eurytrema coelomaticum* and *Eurytrema pancreaticum*.** Parasitol Res. 100: 645-646.

ANEXO – Formato final do 1º artigo científico publicado

Journal of Helminthology

cambridge.org/jhl

Research Paper

*These authors contributed equally to this work.

Cite this article: Leite KG, Lopes-Torres EJ, Souza JGR, Neves RH, Gomes DC, Machado-Silva JR (2020). *Eurytrema coelomaticum*: updated morphology of adult worms using advanced microscopy experiments. *Journal of Helminthology* **94**, e122, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19001135>

Received: 10 September 2019

Revised: 13 November 2019

Accepted: 23 December 2019

Key words:

Eurytrema coelomaticum; morphology; confocal microscopy; scanning electron microscopy; cryofracture

Author for correspondence:

J.R. Machado-Silva, E-mail: jmasilva@gmail.com

Eurytrema coelomaticum: updated morphology of adult worms using advanced microscopy experiments

K.G. Leite^{1,*} , E.J. Lopes-Torres^{1,*}, J.G.R. Souza², R.H. Neves¹, D.C. Gomes³ and J.R. Machado-Silva¹

¹Laboratório de Helminthologia Romero Lascasas Porto, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Prof. Manoel de Abreu 444/5º andar, Vila Isabel, 20511-070, Rio de Janeiro, Brazil; ²Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos 21040-900, Rio Janeiro, Brazil and ³Laboratório de Helminthos Parasitos de Vertebrados, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Pavilhão Cardoso Fontes 3º andar, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Eurytrema coelomaticum is a digenean flatworm of ruminants that is the causative agent of eurytrematosis, a disease of veterinary health concern. Although modern techniques of morphological analysis have provided new insights about the morphology and anatomy of parasitic helminths, most studies on *E. coelomaticum* adults are based on conventional light microscopy. In the present study, a combined approach using brightfield, fluorescence, confocal and scanning electron microscopies (SEMs), together with the cryofracture technique, have updated morphological data on *E. coelomaticum* recovered from cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. Light microscopy confirmed the presence of several structures present in the current description, such as suckers, pharynx, oesophagus, intestinal bifurcation and the cirrus-sac. Fluorescence stereomicroscopy revealed for the first time the cubic crystal protein inclusions in the forebody, which were further detailed by confocal and SEMs. Confocal microscopy provided detailed information of the muscular architecture associated with the attachment structures (suckers), digestive system (pharynx and oesophagus), egg-forming complex (ovary, Mehlis' gland and Laurer's canal) and male reproductive system, which are similar to those found in other digenean flukes. SEM images of cryofractured parasites showed mucus and developing eggs within uterine loops. It was demonstrated that the combination of advanced tools generated complementary information, confirming the importance of experimental morphology in parasitology. Therefore, the knowledge of the adult structural organization of *E. coelomaticum* was improved and this work has contributed to propose new morphological criteria to evaluate the effects of antiparasitic drugs on flukes of medical and veterinary importance.

Columbia University. <https://doi.org/10.1017/50022149x1901135>