# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/12/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

MURILO DE SOUZA QUEIROZ

# CICLOS BIOLÓGICOS DE TREMATÓDEOS DE ANFÍBIOS EM UM FRAGMENTO DE CERRADO, SELVÍRIA, BRASIL

Botucatu
2020

MURILO DE SOUZA QUEIROZ

# CICLOS BIOLÓGICOS DE TREMATÓDEOS DE ANFÍBIOS EM UM FRAGMENTO DE CERRADO, SELVÍRIA, BRASIL

Tese apresentada ao programa de pós graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Instituto de Biociências de Botucatu – IBB/UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Zoologia

Prof. Dr. Luciano Alves dos Anjos

Orientador

Prof. Dr. Hudson Alves Pinto

Coorientador

Botucatu

2020

Q3c

Queiroz, Murilo de Souza

Ciclos biológicos de trematódeos de anfíbios em um fragmento de Cerrado, Selvíria, Brasil / Murilo de Souza Queiroz. -- Botucatu, 2020

138 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Luciano Alves dos Anjos

Coorientador: Hudson Alves Pinto

1. Anuros. 2. Biologia da Conservação. 3. Cercárias. 4. Ciclo de vida. 5. Trematódeos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**DEDICO**

A minha mãe Giselma e meu pai Gilberto, que me educaram e me deram todo apoio e incentivo, além de serem meus exemplos de vida;

A minha irmã Cássia e meus familiares, que foram base e pelo incentivo e apoio incondicional;

A minha vó dona Cornélia, que mesmo em outro plano não deixou de me apoiar e auxiliar.

# AGRADECIMENTOS

Primeiramente a fé em Deus, uma relação a uma entidade maior que nos guia e nos ilumina durante a vida, principalmente nos momentos mais difíceis.

A toda minha família pelo incansável apoio e por nunca duvidarem de mim, em especial ao meu pai Gilberto Rodrigues, minha mãe Giselma Martins e minha irmã Cassia Queiroz que sempre me apoiaram e foram fundamentais para todo esse trabalho ser realizado. Sem eles essa tese seria impossível, amor e gratidão total por vocês.

Ao meu orientador e professor Luciano Alves dos Anjos, que me acolheu em seu laboratório e meu deu a oportunidade e confiança para fazer esse trabalho. Também pela parceria ao longo dos anos que gerou muitos ensinamentos, experiências, além de participações em congressos, simpósios e até no show do Ozzy. Muita gratidão.

Ao professor Hudson Alves Pinto, por ter aceitado coorientar minha tese, por todo aprendizado proporcionado, experiências, incentivo, além de uma ótima recepção na UFMG e oportunidade de conhecer o laboratório de Biologia de Trematoda, os aprendizados adquiridos lá foram fundamentais na minha formação. Muita gratidão pela parceria.

A minha companheira Patrícia Postingel, que com seu amor e carinho me acompanha, auxilia, encoraja e, foi fundamental para tornar uma fase difícil mais leve e tranquila. Muito amor e gratidão por você.

Aos meus amigos que também, de alguma forma, contribuíram com a construção desse trabalho, em especial Bito, Glauco, Marcelo, Matheus, Pedro e Taiene pelas incansáveis idas ao brejo para auxiliar nas coletas e fazer delas uma rotina divertida e enriquecedora. Matheus, Pedro e Taiene também pelas incansáveis horas no laboratório na triagem do material e conversas produtivas. Douglas Ribeiro por todos conselhos e dicas que enriqueceram a elaboração desse trabalho, bem como as horas de coletas noturnas. Rodney Murillo que com toda sua experiência herpetológica foi fundamental para a realização de muitas coletas noturnas, mesmo com chuva ou depois de uma forte chuva. Gratidão por todos vocês pelo conhecimento compartilhado.

Aos orientados do professor Hudson, que me receberam muito gentilmente e dedicaram tempo para me auxiliar nas atividades realizadas no Laboratório de Biologia de Trematoda. Danimar, Eduardo e Jordana muita gratidão por vocês.

Ao técnico de laboratório da Unesp de Ilha Solteira, Wilder, que foi responsável por instalar o sistema de lâmpadas nas prateleiras de aço utilizadas nos experimentos realizados para essa tese.

Ao programa de pós graduação em Zoologia, por permitir que eu pudesse realizar um doutorado e por toda estrutura de docentes, disciplinas e eventos, que possibilitou um enorme aprendizado com boas experiências.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.” **Carl Sagan**

“Estamos todos conectados; uns aos outros biologicamente, à Terra quimicamente e ao resto do universo atomicamente.” **Neil deGrasse Tyson**

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante” **Albert Schweitzer**

## RESUMO

Os trematódeos digenéticos são endoparasitos encontrados em todas as classes de vertebrados e que possuem ciclo de vida complexo, havendo obrigatoriamente um molusco como hospedeiro intermediário. Os anuros, por sua vez, atuam como hospedeiros definitivo e intermediário de uma diversidade de trematódeos e, por isso, são objetos de estudo para a compreensão de aspectos do ciclo biológico desses parasitos, e embora exista uma considerável quantidade de informação disponível na literatura, pouco se sabe a respeito do ciclo biológico dos espécimes encontrados na região neotropical. Visando preencher as lacunas no conhecimento dos ciclos biológicos dos trematódeos parasitas de anuros, coletas de moluscos, insetos aquáticos, girinos e anuros adultos foram realizadas em uma lagoa sazonal localizada na mata ciliar do córrego da Véstia, Selvíria, Mato Grosso do Sul, Brasil, entre dezembro de 2016 a fevereiro de 2019. Um total de 4355 moluscos (6 espécies), 336 artrópodes aquáticos, 261 girinos (11 espécies) e 296 anuros (17 espécies) foram coletados, transportados para o laboratório e submetidos a técnicas helmintológicas convencionais para avaliação da infecção por trematódeos. Todos estágios evolutivos (cercárias, metacercárias e adultos) encontrados foram identificados através de analises *in vivo* em lâminas temporárias e lâminas permanentes utilizando microscopia ótica e de varredura, por fim, infecções experimentais para análises a respeito do ciclo biológico dos parasitos relacionados a anuros. A comunidade componente de trematódeos de anuros compreendeu 17 táxons, sendo 11 no estágio metacercária (*Bursotrema tetracotyloides*, *Clinostomum* sp., Diplostomoidea gen. sp. 1, 2 e 3, Echinostomatidae gen. sp., *Heterodiplostomum lanceolatum*, *Lophosicyadiplostomum* sp., Plagiorchioidea gen. sp., Strigeidae gen. sp., *Tylodelphys* sp.) e 6 no estágio adulto (*Catadiscus marinholutzi*, *Choledocystus incurvatum*, *Gorgoderina parvicava*, *Gorgoderina* aff. *megacetabularis*, *Haematoloechus* sp., *Rauschiella proxima*), parasitando 14 espécies de anuros adultos e girinos, totalizando em 43 novos registros de parasitos nesse grupo de hospedeiros, em moluscos aquático, oito morfotipos de cercárias foram encontradas (Anfistoma tipo 1 e 2, Distoma longifurcada tipo 1 e 2, Distoma brevifurcada, Equinostoma, Spirorchiidae e xifidiocercária), e a maior parte desses trematódeos, adultos e larvais, foram reportados pela primeira vez para a região Centro Oeste, alguns pela primeira vez no Brasil. As infecções experimentais foram realizadas com cinco tipos cercarianos e para quatro deles (Anfistoma, Equinostoma, Distoma longifurcada e Xifidiocercária) obteve-se infecção. Entre estes, o ciclo biológico de *Catadiscus marinholutzi*, parasito intestinal de anuros, foi elucidado. O parasito de aves *Lophosicyadiplostomum* sp., que utiliza anuros como segundo hospedeiro intermediário, teve pela primeira vez sua forma larval (cercária) conhecida, além de informações a respeito do ciclo

biológico. Apesar de não ter sido possível identificação especifica, outros dois táxons de trematódeos que utilizam anuros como segundo hospedeiro intermediário (Echinostomatidae e Plagiorchioidea), tiveram suas cercárias conhecidas, além de informações parciais a respeito do ciclo biológico. Adicionalmente, metacercárias de duas espécies foram encontradas em larvas de Odonata e em *Belostoma* sp. Esses resultados enfatizam a importância do levantamento de trematódeos, principalmente as cercárias, para um melhor conhecimento a respeito da biodiversidade local e, com isso, a possibilidade de planos de manejo e conservação além de formar uma base de conhecimento para estudos adicionais, principalmente na região neotropical aonde informações básicas ainda são escassas.

Palavras chave: Anuros. Biologia da Conservação. Cercárias. Ciclo de vida. Mato Grosso do Sul. Trematódeos.

ABSTRACT

The digenetic trematodes are endoparasites encountered in all vertebrates' classes and has a complex life cycle, obligatorily with an intermediate host mollusk. The anurans act as definitive and intermediate host for a diverse range of trematodes, and are studies object for a better understand of the aspects of the biological cycle of these parasites, and although a considerable amount of information disponible in the literature, little is known about the biology of life cycle on the specimens found in neotropical region. Aiming to fill the gaps on the knowledge in the life cycle of trematode parasites of anuran, mollusks collects, aquatic insects, tadpoles and adult anurans was done in a seasonal pond located in the riparian forest of the Véstia's stream, Sélviria, Mato Grosso do Sul, Brazil, between December 2016 to February 2019. A total of 4355 mollusks (6 species), 336 aquatic arthropods, 261 tadpoles (11 species) and 296 anurans (17 species) were collected, transported to the laboratory and submitted to conventional helminthological techniques for identify the parasitism by trematodes. All the different life stages (cercariae, metacercariae and adult) was identified by *in vivo* analysis with temporary slides and permanent slides using optical microscopy and scanning electron microscopy, also experimental infection for analyses of biological life cycle of parasites related to anurans. The compound community of anuran's trematodes comprise 17 taxa, 11 in metacercariae stage (*Bursotrema tetracotyloides*, *Clinostomum* sp., Diplostomoidea gen. sp. 1, 2 e 3, Echinostomatidae gen. sp., *Heterodiplostomum lanceolatum*, *Lophosicyadiplostomum* sp., Plagiorchioidea gen. sp., Strigeidae gen. sp., *Tylodelphys* sp.) and 6 in adult stage (*Catadiscus marinholutzi*, *Choledocystus incurvatum*, *Gorgoderina parvicava*, *Gorgoderina* aff. *megacetabularis*, *Haematoloechus* sp., *Rauschiella proxima*) parasitizing 14 adult anuran and tadpoles species totalizing 43 new parasite records in this host group, for the aquatic mollusk eight cercariae's morphotype (Anfistoma tipo 1 e 2, Distoma longifurcada tipo 1 e 2, Distoma brevifurcada, Equinostoma, Spirorchiidae e xifidiocercária) was founded, and the majority of these adult and larval trematodes were recorded for the first time in Central west region, some for the first time in Brazil. The experimental infections were performed with five cercariae's morphotype, and for four morphotypes (Anfistoma, Equinostoma, Longifurcada and Xifidiocercariae) got positive results. The biological cycle of *Catadiscus marinholutzi*, an intestinal fluke of anurans, was elucidated. The bird's fluke *Lophosicyadiplostomum* sp. that utilize anurans as second intermediate hosts, has for the first time the identity of cercarial stage, also some information about biological cycle. Despite its not possible to identify specifically, another two taxa of flukes that utilize anurans as second intermediate host (Echinostomatidae

and Plagiorchioidea), was linked to the respective cercarial stage, also some informations about the biological cycle. Additionally, metacercariae of two species were recovered in Odonata larvae and *Belostoma* sp.. These results emphasizing the importance of trematode's survey, mainly the cercariae, for a better understand about the local biodiversity, and with this, the possibility of elaborating conservations plans, also for a basis of additional studies, mainly in neotropical region where basic informations still scare.

Keywords: Anurans. Conservation biology, Cercariae, Life cycle. Mato Grosso do Sul, Trematode.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Padrão básico do ciclo de vida de um trematódeo digenético que inclui: (1) vertebrados hospedeiros definitivos; (2) molusco primeiro hospedeiro intermediário onde são produzidas cercárias a partir de (a) rédias ou (b) esporocistos; (3) cercárias são larvas livre natantes que infectam o segundo hospedeiro intermediário; (4) no segundo hospedeiro intermediário são formadas as metacercárias, que podem ser encistadas (d) ou não (c); o hospedeiro definitivo se infectam ao ingerir o segundo hospedeiro intermediário contendo a metacercária infectante. ..... 19
Figura 2: Mata ciliar do córrego da Véstia, Selvíria – MS. O ponto vermelho corresponde a lagoa sazonal aonde foram realizadas as coletas de hospedeiros. ..... 23
Figura 3: Detalhes da lagoa sazonal aonde foram realizadas as coletas. (a, b):Fotos tiradas na margem da lagoa. (c, d): Fotos tiradas no interior da lagoa. ..... 24
Figura 4: Anuros da família Hylidae coletados no presente estudo. (a): *Boana raniceps*; (b): *Dendropsophus nanus*; (c): *Pseudis platensis*; (d): *Trachycephalus typhonius*; (e): *Scinax nasicus*; (f): *Scinax fuscovarius*; (g): *Dendropsophus elianeae*; (h): *Dendropsophus minutus*. ..... 37
Figura 5:Anuros da família Leptodactylidae, Microhylidae e Phyllomedusidae coletados no presente estudo. (a): *Leptodactylus macrosternum*; (b): *Leptodactylus mystaceus*; (c) *Leptodactylus mystacinus*; (d): *Dermatonotus muelleri*; (e): *Pithecopus azureus*; (f): *Leptodactylus podicipinus*; (g): *Physalaemus cuvieri*; (h): *Physalaemus nattereri*. ..... 38
Figura 6: Metacercária de *Clinostomum* sp encontrada em *Leptodactylus podicipinus*. (a): Aspectos morfológicos gerais da metacercária que apresenta avançado estágio de desenvolvimento, faltando apenas maturação dos órgãos reprodutivos e aumento de tamanho corporal. Barra de escala: 1mm. (b) Detalhes da ventosa oral (VO), faringe (FA) e acetábulo (AC). Barra de escala: 500µm (c): Detalhes dos primórdios genitais (PG) e bolsa do cirro (BC). Barra de escala: 200µm. ..... 44
Figura 7: Aspectos morfológicos gerais de *Catadiscus marinholutzi* em dois diferentes hospedeiros e duas metodologias de fixação. (a): Espécime coletado em *Boana raniceps* e fixado apenas com água quente (70°C). Barra de escala: 500µm (b): Espécime coletado em *Leptodactylus podicipinus* e fixado através de compressão entre lâmina e lamínula. Barra de escala: 200µm. ..... 45
Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura de um espécime de *Catadiscus marinholutzi* coletado em *Leptodactylus podicipinus*. (a) Visão geral do verme, notar a constrição transversal presente no acetábulo (AC). Barra de escala: 20µm (b): Detalhe da abertura oral que é terminal, bem no ápice da região anterior. Barra de escala: 10µm (c): Detalhe do poro genital localizado na região ventral, quase no equador do corpo. Barra de escala: 2µm. ..... 46
Figura 9: Metacercárias não identificadas pertencentes a superfamilia Diplostomoidea. (a) Visão geral da metacercária de Diplostomoidea sp. 3 encontrada na cavidade de *Trachycephalus typhonius*, notar presença de pseudo ventosa (PV) Barra de escala: 200µm (b): Visão geral da metacercária de Diplostomoidea sp. 2 encontrada na cavidade de *Scinax fuscovarius*, notar órgão tribocítico (OT) Barra de escala: 200µm (c): Visão geral da metacercária de Diplostomoidea sp. 1 encontrada na musculatura de *Boana raniceps*. Barra de

escala: 100µm. (d,e) Metacercária de Diplostomoidea sp. 1, detalhe da ventosa oral (VO) e região anterior e órgão tribocítico (OT). Barra de escala: 50µm. .....48
Figura 10: Diferentes estágios de desenvolvimento e variação morfológica encontrado em metacercárias de *Bursotrema tetracotyloides* recuperadas no rim de diferentes hospedeiros anuros (a) *Dermatonotus muelleri*. (b): *Leptodactylus podicipinus*. (c) *Boana raniceps*. (d) *Dendropsophus nanus*. (e) Vista lateral e (f) vista frontal da metacercária encontrada em *Leptodactylus mystacinus*. Barra de escala em todas imagens: 100µm. .....50
Figura 11: Variação morfológica em metacercárias de *Lophosicyadiplostomum* sp. encontrada no rim de diferentes hospedeiros girinos e anuros adultos. (a) Girino de *Dendropsophus nanus*. (b): Anuro adulto de *Leptodactylus podicipinus*. (c) Girino de *Trachycephalus typhonius*. (d) Anuro adulto de *Scinax fuscovarius*. (e) Anuro adulto de *Dendropsophus elianeae*. (f) Vista lateral da metacercária encontrada em *Boana raniceps*. Barra de escala em todas imagens: 100µm.....51
Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura das metacercárias de *Bursotrema tetracotyloides* (a, b) e *Lophosicyadiplostomum* sp. (c,d) encontradas em *Leptodactylus podicipinus*. (a) Detalhe da ventosa oral (VO). Barra de escala: 10µm. (b): Morfologia geral. Barra de escala: 20µm. (c) Morfologia geral, notar ventosa oral (VO), acetábulo (AC) e órgão tribocítico (OT). Barra de escala: 20µm. (d) Detalhe do anel muscular na região dorsal da ventosa oral. Barra de escala: 20µm.....52
Figura 13: Metacercária de *Tylodelphys* sp. encontrada em girinos. (a) Visão geral da metacercária encontrada em *Dendropsophus nanus*. Barra de escala: 200µm. (b): Detalhe do acetábulo (AC) e órgão tribocítico (OT), metacercária encontrada em *Boana raniceps*. Barra de escala: 100µm. (c) Detalhe da ventosa oral (VO), metacercária recuperada em *Boana raniceps*. Barra de escala: 100µm. .....54
Figura 14: Diferentes estágios de desenvolvimento e variação morfológica encontrada em metacercárias de *Heterodiplostomum lanceolatum* recuperadas em *Leptodactylus podicipinus*. Barras de escala: 1mm.....55
Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura e detalhes da morfologia da metacercária de *Heterodiplostomum lanceolatum* encontrada em *Leptodactylus podicipinus*. (a) Vista lateral mostrando corpo bipartido com a região anterior espatuliforme e a região posterior cônica. Barra de escala 200µm. (b) Vista ventral da região posterior mostrando o poro genital (PG) e o poro excretor (PE). Barra de escala 20µm. (c) Detalhe do órgão tribocítico (OT) localizado na região posterior da extremidade anterior do corpo. Barra de escala 100µm. .....56
Figura 16: Aspectos morfológicos gerais de metacercárias de Strigeidae gen. sp. através de visualização in vivo em lâminas temporárias coradas com azul do nilo. (a) Metacercária recuperada em *Pseudis platensis*. Barra de escala 100µm. (b) Detalhe do tecido do mesentério estomacal de um *Pseudis platensis* repleto de metacercárias encistadas. Barra de escala 500µm. (c) Metacercária recuperada na cavidade de um girino de *Scinax fuscovarius*. Barra de escala: 500µm.....58
Figura 17: Aspectos morfológicos gerais de metacercárias de Echinostomatidae gen. sp. através de visualização in vivo em lâminas temporárias coradas com sulfato azul do nilo e vermelho neutro. (a;b) Metacercária recuperada em *Dendropsophus nanus*. Barra de escala 50µm. (c) Detalhe da ventosa oral e ventral de um espécime encontrado em *Scinax fuscovarius*. Barra de

escala 20µm. (d) Detalhe do colar de espinhos em um espécime recuperado em *Dendropsophus elianeae*. Barra de escala 50µm. ..... 59
Figura 18: Aspectos morfológicos gerais de *Gorgoderina parvicava* recuperada em *Leptodactylus podicipinus* através de duas metodologias de fixação. (a): Espécime fixado apenas com água quente (70°C). Barra de escala: 500µm. (b): Espécime fixado através de compressão entre lâmina e lamínula. Barra de escala: 1mm. ..... 61
Figura 19: Aspectos morfológicos gerais de *Gorgoderina* aff. *megacetabularis* recuperada em diferentes hospedeiros e através de duas metodologias de fixação. (a): Espécime recuperado em *Leptodactylus podicipinus* e fixado apenas com água quente (70°C). Barra de escala: 500µm. (b,c): Espécime recuperado em *Leptodactylus macrosternum* e fixado através de compressão entre lâmina e lamínula. (b) Barra de escala: 500µm, (c) Barra de escala: 200µm. ..... 62
Figura 20: Aspectos morfológicos gerais de metacercárias de Plagiorchioidea gen. sp. através de visualização in vivo em lâminas temporárias coradas com sulfato azul do nilo e vermelho neutro. (a) Metacercária recuperada em *Scinax fuscovarius*. Barra de escala 50µm. (b,c) Espécime recuperado em *Dendropsophus nanus*. Barra de escala 100µm. (d) Espécime recuperado em *Leptodactylus podicipinus*. Barra de escala 50µm. ..... 63
Figura 21: Aspectos morfológicos gerais de *Choledocystus incurvatum* recuperado em *Pseudis platensis*. As duas barras de escala apresentam 500µm. ..... 65
Figura 22: Aspectos morfológicos gerais e variação morfológica encontrada em *Haematoloechus* sp. recuperado em *Pseudis platensis*. Todas as barras de escala apresentam 200µm. ..... 66
Figura 23: Aspectos morfológicos gerais e variação morfológica encontrada em *Rauschiella proxima* recuperado em *Leptodactylus macrosternum*. (a) Barra de escala: 1mm; (b) Barra de escala: 500µm. ..... 67
Figura 24:Aspectos morfológicos gerais e variação morfológica encontrada em *Rauschiella proxima* recuperado em *Leptodactylus podicipinus*. As duas barras de escala: possuem 500µm. ..... 68
Figura 25: Diferentes estágios de desenvolvimento e variação morfológica encontrada em *Rauschiella proxima* recuperada em *Pseudis platensis*. (g) Barra de escala: 500µm. Todas as demais barras de escala possuem 200µm. ..... 69
Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura mostrando a variação morfológica existente entre os espinhos tegumentares encontrados no gênero *Rauschiella* e *Choledocystus*. (a) Vista lateral da região anterior mostrando o tegumento espinhoso em *Choledocystus incurvatum* recuperado em *Pseudis platensis*. Barra de escala 10µm. (b) Vista lateral da região anterior mostrando o tegumento espinhoso em *Rauschiella proxima* recuperada em *Leptodactylus macrosternum*. Barra de escala 20µm. (c) Detalhes do formato mais pontiagudo do espinho encontrado em *C. incurvatum*. Barra de escala 2µm. (d) Detalhes do formato de escama do espinho encontrado em *R. proxima*. Barra de escala 2µm. ..... 70
Figura 27: Manutenção dos girinos obtidos através de desovas coletadas na área de estudo para realização das infecções experimentais. (a): Detalhes da estrutura utilizada para manutenção; (b): detalhe dos girinos em uma bandeja de criação. ..... 88
Figura 28: Esquema ilustrando como as infecções experimentais foram realizadas. ..... 89
Figura 29: Gráfico de linhas mostrando a quantidade de caramujos coletados ao longo das 4 estações de coleta. ..... 91

Figura 30: Gráfico de linhas com a quantidade de caramujos coletados ao longo dos 4 períodos de coleta, dois de seca e dois de cheia. Notar o pico da amostragem na segunda cheia. .....91
Figura 31: Prevalência de infecção por cercárias nos quatro períodos amostrados. O pico de infecção por trematódeos larvais coincidiu com o período de maior abundancia de moluscos hospedeiros, o segundo período chuvoso. .....92
Figura 32: Aspectos morfológicos gerais da cercária longifurcada emergida de *Biomphalaria* sp. 1 e *Biomphalaria* sp. 2. (a) Analise *in vivo* através de lâmina temporária com vermelho neutro, barra de escala: 100µm. (b) Desenho através de câmara clara evidenciando detalhes das glândulas de penetração, canais excretores e células flama, Barra de escala: 100µm. .....96
Figura 33: Aspectos morfológicos gerais da cercária longifurcada encontrada em *Drepanotrema depressissimum* e *Drepanotrema lucidum*. (a) Analise *in vivo* através de lâmina temporária com vermelho neutro. Barra de escala: 200µm. (b) Analise in vivo do esporocisto através de lâmina temporária com sulfato azul do Nilo. Barra de escala: 200µm. (c) Desenho através de câmara clara evidenciando detalhes das glândulas de penetração, canais excretores e células flama, Barra de escala: 100µm. .....97
Figura 34: Aspectos morfológicos gerais e diferentes estágios de desenvolvimento das metacercárias de *Lophosicyadiplostomum* sp. obtidas através de infecção experimental. (a) Metacercária recuperada após 24 horas de infecção. Barra de escala: 50µm. (b) Metacercária recuperada após 4 dias de infecção. Barra de escala: 50µm. (c) Após seis dias de infecção. Barra de escala: 50µm. (d) Análise após oito dias de infecção. Barra de escala 50µm. (e) Análise após 12 dias de infecção. Barra de escala 100µm. (f) Metacercária recuperada após 20 dias de infecção. Barra de escala 100µm. (g) Metacercária recuperada após 30 dias de infecção. Barra de escala 100µm. .....98
Figura 35: Aspectos morfológicos gerais e diferentes estágios de desenvolvimento de *Catadiscus marinholutzi*. (a) Visão geral da cercária anfistoma. Barra de escala: 200µm. (b) Detalhes da pigmentação preta, concreções circulares e células cistogenicas presente no corpo da cercária. Barra de escala: 50µm. (c) Detalhes do acetábulo da cercária que possui uma leve constrição transversal, assim como observado nos adultos. Barra de escala: 50µm. (d) Metacercária logo após se encistar. Barra de escala 50µm. (e) Verme obtido após oito dias de infecção experimental, notar ainda a pigmentação preta presente. Barra de escala: 100µm. (f) Morfologia geral do estágio de rédia que possui uma faringe muscular na região anterior. Barra de escala 200µm. (g) Estágio imaturo recuperado em *Pseudis platensis* na mesma lagoa de estudo, apresenta morfologia semelhante com o verme obtido na infecção experimental e também com a cercária. Barra de escala 200µm. .....103
Figura 36: Aspectos morfológicos gerais e diferentes estágios de desenvolvimento de Echinostomatidae gen. sp. (a) Visão geral da cercária equinostoma. Barra de escala: 100µm. (b) Desenho através de câmara clara, evidenciando glândulas de penetração na ventosa oral, dutos excretores na região caudal, e os triângulos representam as células flama. Barra de escala: 100µm. (c) Visão geral do estágio de rédia recuperado no molusco hospedeiro. Barra de escala 200µm. (d) Detalhes do colar de espinhos em uma metacercária desincistada obtida através de infecção experimental. Barra de escala 50µm. (e) Metacercária recuperada após dois dias de infecção experimental e, (f) metacercária recuperada após 20 dias de infecção, mostrando que não há diferenças morfológicas entre os diferentes estágios. As duas barras de escala possuem 50µm. .....104

Figura 37: Metacercárias de Echinostomatidae gen. sp. encistadas em girinos e anuros juvenis. (a) Detalhes da região da cauda de um girino de *Trachycephalus typhonius* contendo várias metacercárias encistadas através de infecção experimental. Notar a facilidade em observar os cistos por conta da pele fina dos girinos. Barra de escala: 1mm. (b) Detalhe da região cefálica de um anuro recém metamorfoseado em que não é possível ver nenhum cisto, porém em (c) observamos, após necropsia, o cisto localizado em baixo da pele. As duas barras de escala possuem 1mm. ..... 105
Figura 38: Aspectos morfológicos gerais e diferentes estágios de desenvolvimento de Paramphistomoidea gen. sp. (a) Visão geral da cercária recuperada em *Drepanotrema lucidum*. Barra de escala 200µm. (b) Detalhes do estágio de rédia recuperado em *Drepanotrema lucidum*. Barra de escala 200µm. (c) Metacercária encistada. Barra de escala 50µm. (d) Detalhes do corpo da cercária mostrando a intensa pigmentação marrom presente. Barra de escala 100µm ..... 107
Figura 39: Aspectos morfológicos gerais da xifidiocercária encontrada em *Drepanotrema lucidum*, através de visualização *in vivo* em lâminas temporárias. (a,c) Visão geral da do corpo e cauda da cercária. Barra de escala 200µm. (b) Detalhes da região anterior incluindo glândulas de penetração e o estilete da ventosa oral. Barra de escala 50µm. (d) Detalhe do formato do estilete encontrado na ventosa oral. Barra de escala 20µm. ..... 109
Figura 40: Aspectos morfológicos gerais através de visualização *in vivo* em lâminas temporárias, das metacercárias recuperadas em girinos de *Trachycephalus typhonius* experimentalmente infectado com xifidiocercárias obtidas em *Drepanotrema lucidum*. (a,b) Visão geral do cisto. Barra de escala 50µm. (c) Metacercária desincistada. Barra de escala: 100µm. ..... 110
Figura 41: Aspectos morfológicos gerais da cercária brevifurcada de Schistosomatidae recuperada em *Biomphalaria* sp. 1 através de visualização *in vivo* em lâminas temporárias. (a) Visão geral da cercaria mostrando corpo e cauda. Barra de escala 200µm. (b,c) Detalhes da região anterior mostrando os ocelos pigmentados e glândulas de penetração. Barra de escala 50µm ..... 112
Figura 42: Aspectos morfológicos gerais da cercária brevifurcada de Spirorchiidae gen. sp. recuperada em Ancylinae gen. sp. através de visualização *in vivo* em lâminas temporárias. (a) Visão geral da cercaria mostrando corpo e cauda bifurcada. Barra de escala 200µm. (b) Detalhes do corpo cercariano mostrando as glândulas de penetração e os ocelos pigmentados. Barra de escala 50µm. (c) Detalhes da cauda brevifurcada da cercária mostrando os espinhos presentes nas membranas natatórias em cada uma das furcas. Barra de escala 50µm. ..... 114
Figura 43: Aspectos morfológicos gerais da metacercária de Plagiorchioidea gen. sp. recuperada em larvas de Odonata (Anisoptera) através de visualização *in vivo* em lâminas temporárias. (a) Visão geral da metacercária desincistada. Barra de escala 200µm (b) Metacercária encistada. Barra de escala 100µm. ..... 118
Figura 44: Aspectos morfológicos gerais da metacercária de *Stomylotrema* sp. recuperada em dois diferentes indivíduos de *Belostoma* sp. através de visualização in vivo em lâminas temporárias. As duas barras de escala possuem 200µm. ..... 118

**SUMÁRIO**

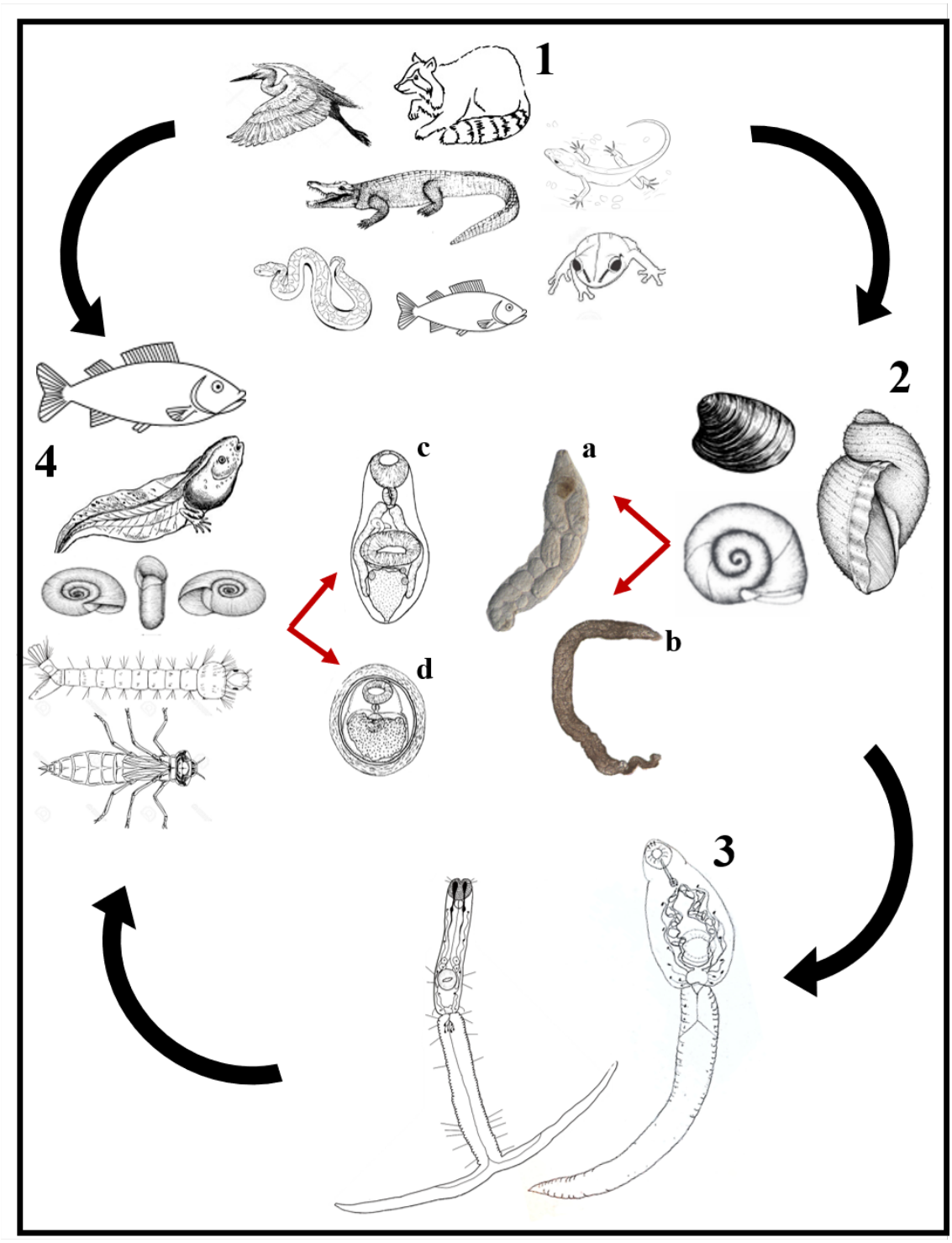
1- INTRODUÇÃO GERAL ..... 18
2- ÁREA DE ESTUDO ..... 22
3- OBJETIVOS ..... 24
3.1-Objetivo geral ..... 24
3.2- Objetivos específicos ..... 24
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 25
CAPÍTULO 1 ..... 31
1 INTRODUÇÃO ..... 32
2 OBJETIVOS ..... 34
3 MATERIAL E MÈTODOS ..... 34
3.1 Coleta de anuros adultos e girinos ..... 34
3.2 Identificação taxonômica dos trematódeos recuperados ..... 35
3.3 Análise dos dados ..... 36
3.4- Comitê de ética ..... 36
4 RESULTADOS ..... 37
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO ..... 70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 74
CAPÍTULO 2 ..... 82
1 INTRODUÇÃO ..... 83
2 OBJETIVOS ..... 85
3 MATERIAL E MÉTODOS ..... 85
3.1 Coleta dos hospedeiros ..... 85
3.2 Analise dos parasitas recuperados ..... 86
3.3 Infecção experimental ..... 87
3.4 Analise dos dados ..... 87
3.5- Comitê de ética ..... 87
4 RESULTADOS ..... 89
4.1 Cercárias e moluscos hospedeiros ..... 89
4.2 Metacercárias recuperadas em insetos aquáticos ..... 115
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO ..... 119
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 126
CONCLUSÕES GERAIS ..... 136

## 1- INTRODUÇÃO GERAL

Os trematódeos são platelmintos neodermados que, na maioria das vezes, possuem vertebrados como hospedeiros definitivos. Uma grande diversidade de espécies é conhecida, atualmente divididas entre duas subclasses, Aspidogastrea Faust & Tang, 1936 e Digenea Carus, 1863. Os trematódeos da subclasse Digenea formam o grupo mais diverso e numericamente abundante, com aproximadamente 18.000 espécies descritas (Pérez-Ponce de León e Hernánez-Mena, 2019). Eles possuem ciclo de vida complexos, havendo obrigatoriamente um molusco como hospedeiro intermediário e, no mínimo, dois estágios evolutivos infectantes (miracídio e cercária) (Schell, 1970; Esch *et al*. 2002; Galaktionov e Dobrovolskij, 2003).

O padrão básico do ciclo de vida da grande maioria dos trematódeos digenéticos inclui três hospedeiros e três eventos de transmissão. Primeiro um hospedeiro definitivo, quase sempre um vertebrado, no qual o parasito se reproduz sexuadamente, produzindo ovos que, alcançando o ambiente externo (aquático ou terrestre), dão origem a larvas ciliadas denominadas miracídios. Estes necessitam encontrar o primeiro hospedeiro intermediário, na maioria das vezes um gastrópode ou bivalve, que se infecta pela penetração ativa do miracídio ou indiretamente pela ingestão de ovos larvados. Logo após infectar o molusco, os miracídios migram pelos tecidos e, dependendo da espécie, dão origem a esporocistos e/ou rédias, iniciando a fase de reprodução assexuada do parasito. Essa consiste em um processo de partenogênese apomítica (Galaktionov e Dobrovolskij, 2003), que resulta, dependendo da espécie, na produção de milhares de cercárias. Na maioria das espécies, estas larvas são liberadas nos corpos aquáticos e infectam ativa ou passivamente o segundo hospedeiro intermediário, nos quais são formadas metacercárias. Estas ao serem ingeridas após uma relação trófica entre o segundo hospedeiro intermediário e o definitivo, darão origem as formas adultas (Schell, 1970; Combes *et al*. 1994; Esch *et al*. 2002; Galaktionov e Dobrovolskij, 2003; Sukhdeo e Sukhdeo, 2004; Morley, 2012; Pinto e Melo, 2013a). Contudo, há variações desse ciclo, podendo haver abreviação de fases do ciclo em determinados grupos de trematódeos (Schell, 1970).

Figura 1: Padrão básico do ciclo de vida de um trematódeo digenético que inclui: (1) vertebrados hospedeiros definitivos; (2) molusco primeiro hospedeiro intermediário onde são produzidas cercárias a partir de (a) rédias ou (b) esporocistos; (3) cercárias são larvas livre natantes que infectam o segundo hospedeiro intermediário; (4) no segundo hospedeiro intermediário são formadas as metacercárias, que podem ser encistadas (d) ou não (c); o hospedeiro definitivo se infectam ao ingerir o segundo hospedeiro intermediário contendo a metacercária infectante.




Fonte: Elaboração do próprio autor

As cercárias encontradas em moluscos são estágios larvais que vem sendo foco de estudos por diferentes autores ao longo do tempo. O estudo dessas larvas se iniciou no século XVIII, elas foram incluídas no gênero *Cercaria* Muller, 1773 sendo consideradas no grupo dos infusorios, organismos planctônicos de vida livre (Pinto e Melo, 2013b), a primeira cercaria descrita foi *Cercaria gyrinus*, uma alusão a sua semelhança com o estágio larval dos anuros. Apenas em 1882, graças a Steenstrup, que descreveu o processo de alternância de gerações, foi possível mais tarde se descobrir de que as cercárias são estágios larvais de trematódeos adultos, o que foi um marco no conhecimento da biologia desses parasitos e impulsionou estudos visando a elucidação de ciclos biológicos (Pinto e Melo, 2013a). Durante o século XX houveram vários estudos relatando a presença de cercárias, porém sempre sendo consideradas como parte do zooplâncton, ou apenas citadas em estudos limnológicos (Morley, 2012). Apenas recentemente, estudos mostraram a importância desses organismos nas teias tróficas e fluxo de energia nas comunidades aquáticas (Morley, 2012), no declínio de populações de anfíbios (Szuroczki e Richardson, 2009), assim como sua aplicação como bioindicadores, controladores biológicos e em doenças de importância médico-veterinária (Morley, 2012; Pinto e Melo, 2013a).

As cercárias são larvas que não se alimentam e dependem de uma reserva limitada de glicogênio. Sua morfologia compreende em um corpo simples ovalado ou alongado com um tamanho geralmente variando de poucos milímetros até alguns centímetros, presença de uma ou duas ventosas de disposição variável e sistema digestório incluindo boca, faringe e esôfago que se bifurca em cecos de fundo cego. O sistema excretor apresenta uma vesícula excretora posterior aonde partem, de ambos os lados, canais excretores que percorrem o corpo e terminam em células flama, cujo número e disposição são importantes para taxonomia. A cauda pode ser simples ou bifurcada e impulsiona a cercária na coluna d'água. Existem diferentes morfotipos que são classificados de acordo com suas adaptações morfológicas para nadar e infectar seus hospedeiros, tais adaptações incluem órgãos sensoriais (ocelos, pelos e espinhos) e estruturas acessórias (estilete, colar de espinhos e membrana dorsal na cauda) (Schell, 1970; Bush *et al*., 2001; Esch *et al*. 2002; Galaktionov e Dobrovolskij, 2003; Morley, 2012; Pinto e Melo 2013a).

Dependendo da espécie, milhares de cercárias são produzidas por dia em um único molusco hospedeiro (Morley, 2012), elas possuem um tempo de vida limitado que compreende desde algumas horas até semanas, período o qual sua infectividade declina conforme a idade avança, sendo assim, a maioria delas logo após emergir dos moluscos iniciam sua busca pelo

próximo hospedeiro intermediário que podem ser anelídeos, artrópodes, moluscos, anfíbios ou peixes (Schell, 1970; Esch *et al*. 2002; Morley, 2012; Pinto e Melo, 2013a). Essa busca não é um processo aleatório e inclui adaptações comportamentais e estratégias que variam de acordo com o tipo de hospedeiro a ser infectado. Estas estratégias podem ser: 1 - infecção ativa, quando as cercarias nadam ativamente e/ou passivamente para se colocar no espaço do hospedeiro ou sendo atraídas por sinais químicos do hospedeiro, ou 2 - infecção passiva, em que as cercárias são ingeridas pelo próximo hospedeiro, como por exemplo, agrupamentos em massa para mimetizar uma larva de invertebrado, ou a formação de metacercárias em substratos sólidos ou na vegetação aquática (p. ex. *Fasciola hepatica*) (Schell, 1970; Combes, *et al*. 1994; Esch *et al*. 2002; Galaktionov e Dobrovolskij, 2003; Morley, 2012; Pinto e Melo 2013a).

O estágio de metacercária ocorre na maioria das espécies de Digenea e compreende uma fase entre a cercária e a forma adulta. Algumas metacercárias exibem um comportamento de se encistar e, esses cistos podem ser encontrados, em sua maioria, dentro ou sobre o corpo do segundo hospedeiro intermediário, porém podem se localizar na vegetação ou em substratos sólidos (Schell, 1970; Esch *et al*. 2002), há uma vasta literatura com identificações morfológicas de metacercárias a nível de família, gênero e, em alguns casos, nível de espécie. Esses trabalhos mostram a grande variação morfológica existente em relação ao estágio de desenvolvimento dessas larvas de trematódeos, desde metacercárias bastante desenvolvidas, contendo ovos e com tamanho e forma semelhantes aos adultos, até formas com baixo desenvolvimento e sem sinais dos órgãos reprodutivos. Ainda, esta literatura enfatiza o padrão de relações tróficas nos ciclos da maioria dos Digenea, como por exemplo, parasitos de anuros que formam metacercárias em artrópodes e outros anuros (Bolek e Janovy, 2007a, 2007b; Bolek; Synder; Janovy, 2009; Bolek; Tracy; Janovy, 2010), parasitos de crocodilos que formam metacercárias em peixes (Szidat, 1969; Abdallah *et al*. 2006; Tavares-Dias *et al*. 2011; Hernández-Mena *et al*. 2017), parasitos de serpentes com metacercárias em anuros (Kehr e Hamann, 2003; Hamann *et al*. 2006; Schaefer *et al*. 2006; Hamann e González, 2009; Pinto e Melo, 2012), parasitos de aves com metacercárias em peixes e anuros (Hamann e González, 2009; Ramos *et al*. 2016; Lins *et al*. 2017; Pozza *et al*. 2018; Brioso-Aguillar *et al*. 2018; Hamann; Fernández; González, 2019) e parasitos de mamíferos com metacercárias em anuros (Hamann e González, 2009).

No Brasil, os estudos helmintológicos relacionados a larvas de trematódeos começaram há pouco mais de um século. Apesar do registro de uma dezena de tipos cercarianos, só recentemente surgiram estudos que abordam não apenas os estágios larvais mas também

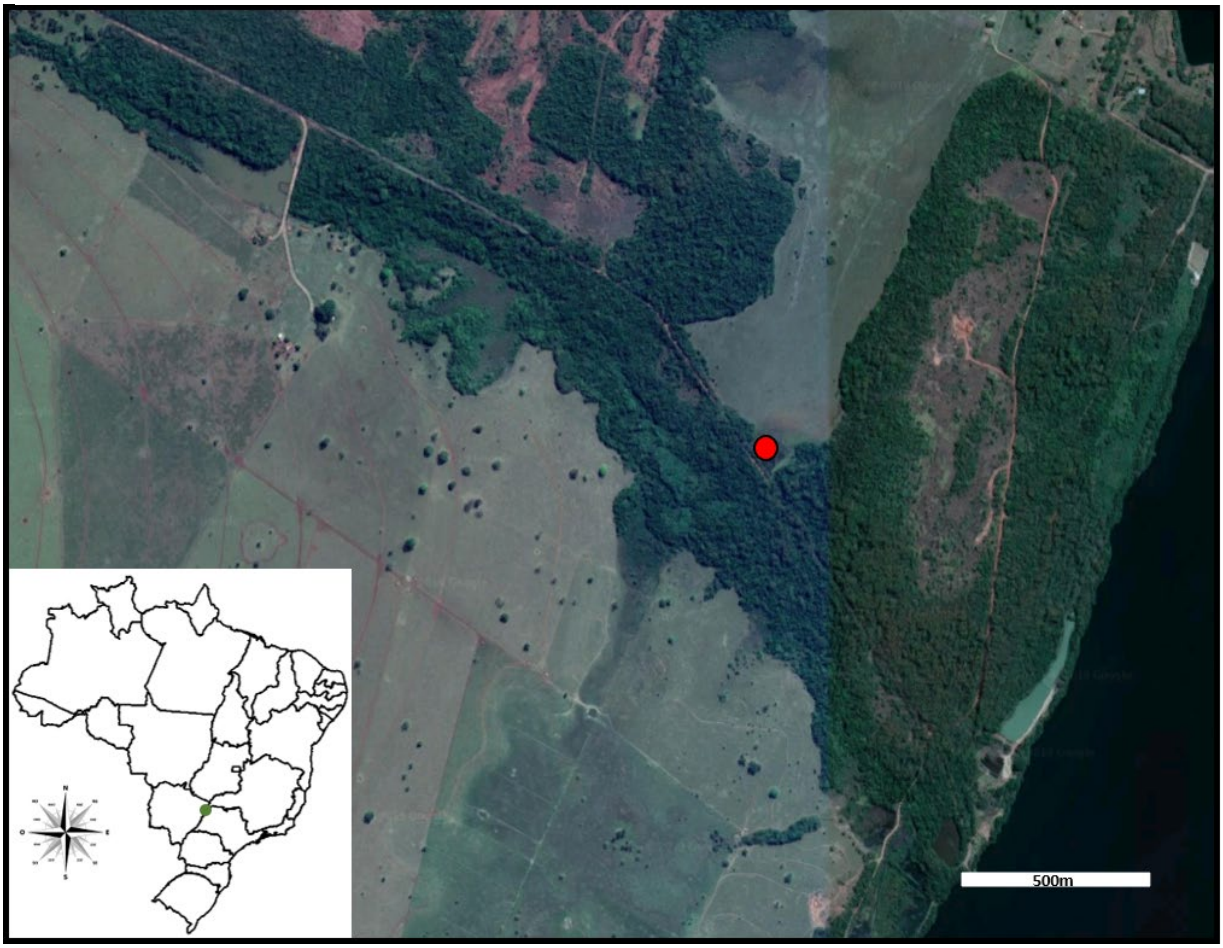
informações adicionais a respeito do ciclo de vida desses parasitos (Pinto e Melo, 2013a; Pinto; Brant; Melo, 2014, Pinto; Melo; Brant, 2015; Pinto *et al*. 2015a,b, 2016; Fernandez *et al*. 2018; López-Hernández *et al*. 2018,2019; Assis *et al*. 2019; Paviotti-Fischer *et al*. 2019; Lopes *et al*. 2020; Onaca *et al*. 2020). Em relação aos parasito de anuros, até então 56 táxons de trematódeos adultos e larvais, foram registradas em mais de 30 espécies de hospedeiros (Campião *et al*. 2014; Fernandes e Kohn, 2014; Gomes *et al*. 2017; Graça *et al*. 2017; Lins *et al*. 2017; Queiroz *et al*. 2020). Destes apenas duas espécies (*Halipegus dubius* e *Haematoloechus* sp.) possuem cercárias e moluscos transmissores conhecidos (Pinto e Melo, 2013b). Considerando a enorme extensão territorial do país, com seis biomas existentes e com a maior diversidade mundial de anfíbios anuros, 1093 espécies (Segalla *et al*. 2019), fica nítido que essa biodiversidade é subestimada e negligenciada, enfatizando a necessidade desses estudos que podem contribuir com o conhecimento da ecologia desses parasitos, biologia do ciclo de vida e relação parasito-hospedeiro.

## 2- ÁREA DE ESTUDO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, com um território que ocupa oito estados (Goiás, Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo) além do distrito Federal (IBGE, 2020). É considerado a savana de maior biodiversidade no mundo e está entre os 36 mais importantes hotspots de biodiversidade (Myers *et al*. 2000; Mittermeier *et al*. 2011; Dalle-Laste; Durigan; Andersen, 2019), infelizmente nas últimas quatro décadas perdeu cerca de 2 milhões de km² de área para a silvicultura, pastagens e monoculturas como a soja e a cana (Hunke *et al*. 2015; Dalle-Laste; Durigan; Andersen, 2019). Nosso estudo foi realizado em uma área pertencente a Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão– FEPE/UNESP, que é uma Unidade Auxiliar de Estrutura Complexa, diretamente ligada a Direção do Campus, que tem por finalidade dar suporte às atividades de ensino, pesquisa e extensão, ligadas principalmente aos Cursos de Graduação Agronomia, Ciências Biológicas e Zootecnia e de Pós-Graduação em Agronomia. A FEPE é composta por quatro áreas, sendo três localizadas no município de Selvíria/MS e uma área no município de Ilha Solteira/SP, perfazendo um total de 1.647 ha (1.576 ha/MS e 71 ha/SP; www.feis.unesp.br/unidade/uafep/). A mata ciliar do córrego da Véstia é composta por um fragmento de Cerrado *sensu stricto*, fica na área do município de Selvíria, Mato Grosso do Sul, Brasil, e possui uma parte que está situada dentro da área da FEPE. Associado à mata existem diversos corpos d'agua como: brejos,

poças temporárias e lagos artificiais que possuem um contato natural com os animais silvestres que transitam ou residem no fragmento, mas essa área também está suscetível ao contato com humanos e também os animais domésticos (bovinos, felinos e cães) pertencentes as propriedades adjacentes e, devido a crescente antropização no local (seva de caçadores, pescadores e algumas propriedades rurais), não sabemos até quando .a biodiversidade local resistirá. O local da coleta (Figuras 1 e 2) (20°23′43.57″S, 51°23′39.28″W) é uma lagoa temporária que fica ao fundo de uma grande área de pastagem e cercada aos lados por mata, dependendo do ano fica cheia por volta de 10 meses, tem uma profundidade máxima de 1,5m, 314m de perímetro e 5000m² de área total. A temperatura média do período de outubro de 2016 até março de 2019 foi de 25,7 ºC (Unesp, 2019).

Figura 2: Mata ciliar do córrego da Véstia, Selvíria – MS. O ponto vermelho corresponde a lagoa sazonal aonde foram realizadas as coletas de hospedeiros.




Fonte: Imagem de satélite e mapa: Google imagens. Montagem de elaboração do próprio autor.

Figura 3: Detalhes da lagoa sazonal aonde foram realizadas as coletas. (a, b):Fotos tiradas na margem da lagoa. (c, d): Fotos tiradas no interior da lagoa.




Fonte: Elaboração do próprio autor.

## 3- OBJETIVOS

### 3.1-Objetivo geral

Descrever a comunidade de trematódeos de anuros, adultos e girinos, caracterizando cercárias, metacercárias e adultos, e identificar os moluscos, hospedeiros intermediários e invertebrados aquáticos envolvidos no ciclo de vida desses parasitas.

### 3.2- Objetivos específicos

a) Identificar a comunidade de trematódeos parasitos dos anuros (adultos e girinos) encontrados na lagoa sazonal da mata ciliar do córrego da Véstia, Selvíria, Mato Grosso do Sul,

(b) Realizar levantamento malacológico na lagoa e identificar a comunidade de cercarias encontradas em moluscos no mesmo local de estudo,

(c) Caracterizar a morfologia dos estágios evolutivos de trematódeos (cercária, metacercária e adultos) através de microscopia de luz e microscopia de varredura.

(d) Realizar infecções experimentais a partir das cercárias obtidas de moluscos naturalmente infectados a fim de se obter o elo entre as formas larvais e adultas de parasitos relacionados a anuros na localidade.

## 4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ABDALLAH, V. D.; AZEVEDO, R. K.; LUQUE J. L. Ecologia da comunidade parasitária do tamboatá *Hoplosternum littorale* (Siluriformes: Callichthyidae) do Rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p.413–419, 2006.

AMATO, J.; BOEGER, W.; AMATO, S. **Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado***,* Seropédica, UFRRJ, 1991.

ASSIS, J. C. A.; LOPEZ-HERNÁNDEZ, D.; PULIDO-MURILLO, E. A.; MELO, A. L.; PINTO, H. A. A morphological, molecular and life cycle study of the capybara parasite *Hippocrepis hippocrepis* (Trematoda: Notocotylidae). **Plos One**, v. 14, n. 8, p.1-15, 2019.

BOLEK, M. G.; JANOVY, J. Small frogs get their worms first: the role of nonodonate arthropods in the recruitment of *Haematoloechus coloradensis* and *Haematoloechus complexus* in newly metamorphosed northern leopard frogs, *Rana pipiens*, and woodhouse's toads, *Bufo woodhousii*. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p.300-312, 2007a.

BOLEK, M. G.; JANOVY, J. J. 2007b. Evolutionary avenues for, and constraints on, the transmission of frog lung flukes (*Haematoloechus* spp.) in dragonflysecond intermediate hosts. **Journal of Parasitology,** v. 93, n. 3, p.593-607, 2007b.

BOLEK, M. G.; SNYDER, S. D.; JANOVY, J. Alternative Life Cycle Strategies and Colonization of Young Anurans by *Gorgoderina attenuata* in Nebraska. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 3, p.604-616, 2009.

BOLEK, M. G.; TRACY, H. R.; JANOVY, J. The Role of Damselflies (Odonata: Zygoptera) as Paratenic Hosts in the Transmission of *Halipegus eccentricus* (Digenea). **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p.724-735, 2010.

BRIOSO-AGUILAR, R.; GARCÍA-VARELA, M.; HERNÁNDEZ-MENA, D.I.; RUBIO-GODOY, M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Morphological and molecular characterization of an enigmatic clinostomid trematode (Digenea: Clinostomidae) parasitic as metacercariae in the body cavity of freshwater fishes (Cichlidae) across Middle America. **Journal of Helminthology,** v. 93, n. 1, p.461-474, 2018.

BUSH, A. O.; FERNANDEZ, J. W.; ESCH, G. W.; SEED, J. R. **Perspectives in parasitology: The ecology and diversity of parasites**. Cambridge University Press, Cambridge, 2001.

CAMPIÃO, K. M.; MORAIS, D. H.; DIAS, O. T.; AGUIAR, A.; TOLEDO, G.; TAVARES, L. E. R.; SILVA, R. J. Checklist of Helminth parasites of Amphibians from South America. **Zootaxa**, v. 3843, n. 1, p.1-93, 2014.

COMBES, C.; A. FOURNIER, H. MONE, & A. THERON. Behaviours in trematode Cercáriae that enhance parasite transmission. **Parasitology**, v. 109, n. 1, p.3–13, 1994.

DALLE-LASTE, K. C.; DURIGAN, G.; ANDERSEN, A. N. Biodiversity responses to land-use and restoration in a global biodiversity hotspot: Ant communities in Brazilian Cerrado. **Austral Ecology**, v: 44, n: 2, p.313-326, 2019.

ESCH, G. W.; BARGER, M. A.; FELLIS, K. J. The Transmission of Digenetic Trematodes: Style, Elegance, Complexity. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 2, p.304–312, 2002.

FERNANDES, B. M M; KOHN, A. 2014. **South American trematodes parasites of amphibians and reptiles**. – Rio de Janeiro: Ofcina de Livros, 2014.

FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C.; AMARAL, R. S. **Técnicas Malacológicas. In Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: diretrizes técnicas** (R.S. Amaral, S.C. Thiengo & O.S. Pieri, eds). Ministério da Saúde, Brasília, 2008. p.43-70.

FERNANDEZ, M. A.; SILVA, E. F.; ESTEVES, R. A.; THIENGO, S. C. Snail transmitters of schistosomiasis and other mollusks of medical and economic importance at the Simplício Queda Única Hydroeletric Plant, Southeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p.689-694, 2018.

GALAKTIONOV, K. V.; DOBROVOLSKIJ, A. A. **The Biology and Evolution of Trematodes: An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycles, Transmissions, and Evolution of Digenetic Trematodes.** St. Petersburg: Springer –science Busnisses, 2003. 592p.

GOMES, T. F. F.; MELO, F. T. V.; GIESE, E. G.; FURTADO, A. P.; SANTOS, J. N. *Choledocystus elegans* (Digenea: Plagiorchiidae) of *Leptodactylus paraensis* (Amphibia: Leptodactylidae) from the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p.511-515, 2017.

GOSNER, K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p.183-190, 1960.

GRAÇA, R. J.; ODA, F. H.; LIMA, F. S.; GUERRA, V.; GAMBALE, G.; TAKEMOTO, R. M. Metazoan endoparasites of 18 anuran species from the mesophytic semideciduous Atlantic Forest in southern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 51, n. 1, p.705–729, 2017.

HALLIDAY. T, Amphibians. *In*: Sutherland WJ (Eds) Ecological census Techniques. New York, University of Cambridge, 2006. Cap. 6, p. 278-293.

HAMANN, M. I.; GONZALEZ, C. E; KEHR, A. I. Helminth community structure of the oven frog *Leptodactylus latinasus* (Anura:Leptodactylidae) from Corrientes, Argentina. **Acta Parasitologica**, v. 51, n. 1, p.294–299, 2006.

HAMANN, M. I.; GONZÁLEZ, C. E. Larval Digenetic Trematodes in Tadpoles of Six Amphibian Species from Northeastern Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 3, p.623-628, 2009.

HAMANN, M. I.; FERNÁNDEZ, M. V.; GONZÁLEZ, C. E. Metacercariae of Strigeidae Parasitizing amphibians of the Chaco region in Argentina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, p.1-6, 2019.

HERNÁNDEZ-MENA, D. I.; GARCÍA-VARELA, M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Filling the gaps in the classification of the Digenea Carus, 1863: systematic position of the Proterodiplostomidae Dubois, 1936 within the superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886, inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Systematic Parasitology**, v. 94, n. 1, p.833–848, 2017.

IBGE. **Brasil em síntese – Biomas brasileiros.** Disponível em: https://brasilemsintese.ibge.gov.br/territorio.html. Acesso em 12 set. 2020.

KEHR, A. I.; HAMANN, M. I. Ecological aspects of parasitism in the tadpole of *Pseudis paradoxa* from Argentina. **Herpetological Review**, v. 34, p.336-341, 2003.

LINS, A. G. S.; AGUIAR, A.; MORAIS, D. H.; DA SILVA, L. A. F.; ÀVILA, R. W.; SILVA, J. R. Helminth fauna of *Leptodactylus syphax* (Anura: Leptodactylidae) from Caatinga biome, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p.74-80, 2017.

LOPES, A. S.; PULIDO-MURILLO, E. A.; MELO, A. L.; PINTO, H. A. *Haplorchis pumilio* (Trematoda: Heterophyidae) as a new fish-borne zoonotic agent transmitted by *Melanoides tuberculate* (Mollusca: Thiaridae) in Brazil: A morphological and molecular study. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, n. 1, p.1-6, 2020.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; LOCKE, S. A.; DE MELO, A. L.; RABELO, E. M. L. R.; PINTO, H. A. Molecular, morphological and experimental assessment of the life cycle of *Posthodiplostomum nanum* (Trematoda: Diplostomidae) from Brazil, with phylogenetic evidence of the paraphyly of the genus Posthodiplostomum Dubois, 1936. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, n. 1, p.95-103, 2018.

LOPEZ-HERNÁANDEZ, D.; LOCKE, S.A.; DE ASSIS, J. C. A.; DRAGO, F. B.; DE MELO, A. L.; LEITE RABELO, E. M.; PINTO, H. A. Molecular, morphological and experimental-infection studies of cercariae of five species in the superfamily Diplostomoidea (Trematoda: Digenea) infecting *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in Brazil, **Acta Tropica**, v. 199, n. 1, p.1-11, 2019.

MORLEY, N. J. Cercáriae (Platyhelminthes: Trematoda) as neglected components of zooplankton communities in freshwater habitats. **Hydrobiologia**, v. 691, n. 1, p.7-19, 2012.

MITTERMEIER, R. A.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. *In*: Biodiversity Hotspots, p. 3–22. Zachos, F., Habel, J., Ed., Berlin, GER, Springer Heidelberg, 2011.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.; MITTERMEIER, C.; DA FONSECA, G.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 1, p.853–858, 2000.

ONACA, F. M. T.; DA GRAÇA, R. J.; FABRIN, T. M. C.; TAKEMOTO, R. M.; OLIVEIRA, A. V. Molecular characterization and identification of digenean larval stages in *Anylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae) from a neotropical floodplain. **Journal of Helminthology**, v. 94, p.1-8, 2020.

PARAENSE, W. L.; DESLANDES, N. The Brazilian species of *Drepanotrema* III. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 17, n. 1, p.339-344, 1957.

PAVIOTTI-FISHCER, E.; LOPES-TORRES, E. J.; SANTOS, M. A. J.; BRANDOLINI, S. V. P. B.; PINHEIRO, J. Xiphidiocercariae from naturally infected *Lymnaea columela* (Mollusca, Gastropoda) in urban area: morphology and ultrastructure of the larvae and histological changes in the mollusc host. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 3, p.446-451, 2019.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. Metacercariae of *Renifer heterocoelium* (Trematoda: Reniferidae) in tadpoles of *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) in Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, V. 83, n. 2, p.553-556, 2012.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. **Revista de** Patologia Tropical, v. 42, n. 4, p.369-386, 2013a.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. A checklist of cercariae (Trematoda: Digenea) in molluscs from Brazil. **Zootaxa**, v. 3666, n. 4, p.449-475, 2013b.

PINTO, H. A.; BRANT, S. V.; MELO, A. L. *Physa marmorata* (Mollusca: Physidae) as a natural intermediate host of *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae), a potential causative agent of avian cercarial dermatitis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 138, n. 1, p.38-43, 2014.

PINTO, H. A.; MELO, A. L.; BRANT, S. V. Where are the South American freshwater turtle blood flukes (Trematoda: Spirorchiidae)? The first morphological and molecular analysis of spirorchiid cercariae from freshwater snails in Brazil. **Parasitology International**, v. 64, n. 1, p.553-558, 2015.

PINTO, H. A.; CAFFARA, M.; FIORAVANTI, M. L.; MELO, A. L. Experimental and molecular study of cercariae of *Clinostomum* sp. (Trematoda: Clinostomidae) from *Biomphalaria* spp. (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 1, p.108-113, 2015a.

PINTO, H. A.; CANTANHEDE, S. P. D.; THIENGO, S. C.; Melo, A. L.; Fernandez, M. A. The apple snail *Pomacea maculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) as the intermediate host of *Stomylotrema gratiosus* (Trematoda: Stomylotrematidae) in Brazil: the first report of a mollusc host of a stomylotrematid trematode. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 2, p.134–139. 2015b.

PINTO, H. A.; GRIFFIN, M. J.; QUINIOU, S. M.; WARE, C.; MELO, A. L. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an intermediate host of *Drepanocephalus* spp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil: a morphological and molecular study. **Parasitology Reserarch**, v. 115, n. 1, p.51-62. 2016.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G., HERNÁNDEZ-MENA, D.I. Testing the higher-level phylogenetic classification of Digenea (Platyhelminthes, Trematoda) based on nuclear rDNA sequences before entering the age of the 'next-generation' Tree of Life. **Journal of Helminthology,** v. 93, n. 1, p.260-276. 2019.

POZZA, A.; LIMA, F.; HAAS, M. L.; LEHMANN-ALBORNOZ, P. C. *Clinostomum* sp. (Digenea: Clinostomidae) and *Ascocotyle* sp. (Digenea: Heterophyidae): metacercariae with zoonotic potential in fishes from Tramandaí river basin, Southern Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 1, p.105-109, 2018.

PROVETE, D. B; GAREY, M. V.; SILVA, F. R. ROSSA-FERES, D. C. Anuranfauna from northwestern region of the State of São Paulo: species list and taxonomic key for adults. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 6, p377-391, 2011.

QUEIROZ, M. S.; PONTES, M. R.; NETO, M. C.; CAMPIÃO, K. M.; ANJOS, L. A. Helminths of eight anuran species from a remnant riparian forest in the Cerrado biome, Brazil. Herpetology Notes, v. 13, n. 1, p.463-478. 2020.

RAMOS, I. P.; FRANCESCHINI, L.; ZAGO, A. C.; ZICA, E. O. P.; WUNDERLICH, A. C.; LIMA, F. P.; SILVA, R. J. *Austrodiplostomum compactum* metacercariae (Digenea: Diplostomidae) in *Schizodon intermedius* (Characiformes: Anostomidae) from Jurumirim reservoir, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p.240-243, 2016.

ROSSA-FERES, D. C.; NOMURA, F. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 1, p.2-26, 2006.

SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GARÇIA, P. C. A.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; SANTANA, D. J.; TOLEDO, L. F.; LANGONE, J. A. Brazilian amphibians: List of species. **Herpetologia Brasileira**, v. 8, n. 1, p.65-96, 2019.

SCHAEFER, E. F.; HAMANN, M. I.; KEHR, A. I.; GONZÁLEZ, C. E.; DURÉ, M. I. Trophic, reproductive and parasitological aspects of the ecology of *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. **Herpetological Journal, v.** 16, n. 1, p.387–394, 2006.

SCHELL, S.C. **How to know the trematodes**. Wm.C. Brown Co., Dubuque, 1970. 355p.

SUKHDEO, M. V.; SUKHDEO, S. C. Trematode behaviours and the perceptual worlds of parasites. Canadian Journal of Zoology, v. 82, n. 2, p.292–315, 2004.

SZIDAT, L. Structure, development, and behaviour of new strigeatoid metacercariae from subtropical fishes of South America. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 26, n. 1, p.753–786, 1969.

SZUROCZKI, D.; RICHARDSON, J. M. L. The role of trematode parasites in larval anuran communities: an aquatic ecologist's guide to the major players**. Oecologia**, v. 161, n. 2, p.371-385, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; NEVES, L. R.; FERNANDES, B. M. M. First report of metacercariae (Digenea) infecting *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae) from the Amazon region. Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 5, n. 1, p.235–240, 2011.

THIENGO S. **Técnicas malacológicas**, 1995. p. 255. In F. S. Barbosa. Tópicos em malacologia médica. Rio de Janeiro, Brasil: Fio Cruz.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP Dados climáticos de Ilha Solteira. Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos/Área de Hidráulica e Irrigação. Disponivel em: http://clima.feis.unesp.br/dados_diarios.php. Acesso em: 4 abr. 2019.

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

## CONCLUSÕES GERAIS

1. Na lagoa sazonal aonde foram realizadas as coletas há uma comunidade em que ocorrem ao menos 17 espécies de anuros coexistindo com 17 espécies de trematódeos, 11 no estágio metacercária (*Bursotrema tetracotyloides*, *Clinostomum* sp., Diplostomoidea gen. sp. 1, 2 e 3, Echinostomatidae gen. sp., *Heterodiplostomum lanceolatum*, *Lophosicyadiplostomum* sp., Plagiorchioidea gen. sp., Strigeidae gen. sp., *Tylodelphys* sp.) e 6 no estágio adulto (*Catadiscus marinholutzi*, *Choledocystus incurvatum*, *Gorgoderina parvicava*, *Gorgoderina* aff. *megacetabularis*, *Haematoloechus* sp., *Rauschiella proxima*), que utilizam esses animais como hospedeiros intermediário ou definitivo, além de seis espécies de moluscos parasitadas por oito diferentes tipos cercarianos.

2. Todas as espécies de girinos relatadas no presente estudo, bem como as nove espécies de trematódeos encontrados representam a primeira vez que esse tipo de estudo é feito no país, aumentando o conhecimento a respeito da diversa gama de relações parasitarias encontradas nesse grupo de hospedeiros vertebrados.

3. *Leptodactylus podicipinus* e *Pseudis platensis* foram as espécies de anuros que tiveram, respectivamente, as maiores riqueza e diversidade de trematódeos encontradas, fato que foi atribuído ao hábito aquático de *P. platensis* e *L. podicipinus* uma espécie bem abundante no local.

4. A análise ecológica da comunidade nos mostrou que no grupo dos Hilídeos o trematódeo dominante foi a metacercária de *Lophosicyadiplostomum* sp. enquanto que nos Leptodactylideos a metacercária de *Bursotrema tetracotyloides* foi dominante, fato que atribuímos ao padrão de relações tróficas entrado na transmissão ao hospedeiro definitivo no ciclo de vida da maioria dos trematódeos.

5. Em uma análise separada dos anuros adultos e girinos, temos que nos girinos a metacercária de *Lophosicyadiplostomum* sp. foi o táxon dominante, enquanto que nos anuros adultos *Catadiscus marinholutzi* foi o trematódeo dominante.

6. No total 42 novos registros de parasitos e hospedeiros foram feitos envolvendo trematódeos e anuros adultos e girinos, alguns registros pela primeira vez no país, enfatizando a importância de estudos desse tipo para o incremento no conhecimento da biodiversidade local dos ecossistemas além de uma base para estudos adicionais.

7. Os oito tipos cercarianos reportados na lagoa sazonal são registrados pela primeira vez na região centro oeste, alguns, como a cercaria de *Catadiscus marinholutzi* e *Lophosicyadiplostomum* sp., pela primeira vez no Brasil.

8. A análise ecológica dos caramujos parasitados por cercárias, mostrou que o pico das infecções foi no período chuvoso, fato relacionado a respectiva época que coincide com animais entrando em atividade em busca de comida e reprodução.

9. Diferente da maioria das espécies de trematódeos em que a relação da cercaria com a forma adulta, através apenas morfologia, não é possível, em *Catadiscus marinholutzi* conseguimos essa relação graças a morfologia do acetábulo, que se mostra um caráter conservado nesse grupo de paranfistomídeos neotropicais, visto que o mesmo formato encontrado na cercaria persiste no adulto.

10. O gênero de parasitos de aves *Lophosicyadiplostomum* sp. que já foi previamente relatado em anuros na América do Sul, em nosso estudo experimental mostrou que o desenvolvimento no segundo hospedeiro intermediário leva cerca de 25 dias, e que a metacercária em questão é proxima ao parasito adulto, faltando apenas desenvolvimento e maturação dos órgãos reprodutivos bem como um incremento do tamanho corporal.

11. A presença de uma série de moluscos e cercárias no ecossistema estudado, indica a manutenção dos ciclos biológicos de parasitos relacionados a todos os grupos de verberados, isso mostra o quanto as cercárias são importantes como ferramentas indiretas para uma análise da biodiversidade existente em determinada localidade.

12. Ambientes aquáticos, efêmeros ou não, são propícios a infecção por trematódeos devido ao seu ciclo desses parasitas que possui larvas aquáticas e a infeção associada ao ambiente aquático, esse padrão já foi relatado em estudos anteriores pela América do Sul.
13. Por fim, esse estudo demonstra o quanto a região neotropical possui uma biodiversidade negligenciada, tendo em vista que o pequeno corpo d'agua analisado no presente estudo possui uma rica diversidade, considerando o fato da intensa antropização do local podemos afirmar que essa biodiversidade ainda resiste.