



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA  
AMAZÔNIA**

**VANESSA SILVA DO AMARAL**

**PARAMPHISTOMIDAE EM BOVÍDEOS EM MUNICÍPIOS NO ESTADO DO PARÁ:  
Taxonomia e biologia molecular**

**BELÉM  
2021**

**VANESSA SILVA DO AMARAL**

**PARAMPHISTOMIDAE EM BOVÍDEOS EM MUNICÍPIOS NO ESTADO DO PARÁ:  
Taxonomia e biologia molecular**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para a obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Saúde animal

Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elane Guerreiro Giese.

**BELÉM  
2021**

**VANESSA SILVA DO AMARAL**

**PARAMPHISTOMIDAE EM BOVÍDEOS EM MUNICÍPIOS NO ESTADO DO PARÁ:  
Taxonomia e biologia molecular**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elane Guerreiro Giese.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>ª</sup>. Elane Guerreiro Giese - Orientadora  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Dr<sup>ª</sup> Michele Velasco Oliveira da Silva – 1º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Dr<sup>º</sup>. Raimundo Nonato Moraes Benigno – 2º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Dr<sup>ª</sup>. José Ledamir Sindeaux Neto – 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Dr<sup>º</sup>. Tiago Paixão Mangas - 4º Examinador  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PARÁ – IFPA

---

Dr<sup>ª</sup>. Ana Rita de Lima - Suplente  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir chegar onde cheguei e me mostrar que sempre podemos ir além.

À minha família multiespécie: Alberto, Lena, Renato, Manoel e meus filhos de quatro patas. Vocês são a minha base.

À minha orientadora Elane Guerreiro Giese por ser tão amável, paciente e considerada a mãe de todos no Laboratório de Histologia e Embriologia Animal (LHEA).

Aos meus queridos amigos que conheci ao entrar para a família LHEA, em especial ao meu mano Rogerio Rodrigues que assumiu papel de irmão e sempre esteve comigo nos bons e maus momentos e que sempre esteve nas coletas de material para que este trabalho fosse possível.

Ao Diego Ferreira também por toda a contribuição, discussão e algumas lamentações (rsrs!). No decorrer do curso, o Diego sempre dizia para sermos gentis com as pessoas pois nunca sabemos o que elas estão enfrentando...isso me marcou.

Ao Jayme Santos, secretário da pós. Sempre disposto a ajudar os pós-graduandos.

Aos meus queridos amigos Márcia Valéria e George Carvalho que sempre se orgulham e torcem muito por mim.

Ao médico veterinário João Moreira que permitiu o acesso a SOCIPE para que as coletas fossem realizadas bem como aos funcionários do abatedouro que nos ajudavam durante as coletas. Agradeço também à DR<sup>a</sup> Eva Abufaiad que também nos permitiu realizar as coletas no abatedouro de Soure.

À banca de qualificação composta, respectivamente, pela doutora e doutores: Ana Rita, José Neto, Paulo César e Evonnildo Gonçalves pelas sugestões e críticas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia (PPGSPAA), Instituto Saúde e Produção Animal (ISPA) e Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

Ao Projeto Pró-Amazônia Biodiversidade e Sustentabilidade pelos recursos bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por terem financiado o trabalho de doutorado.

*Aos queridos, eternos e amados Rick e Edgato eu digo: “A amizade é um amor que nunca  
morre.”*

*Mário Quintana*

**PARAMPHISTOMIDAE EM BOVÍDEOS EM MUNICÍPIOS NO ESTADO DO PARÁ:  
Taxonomia e biologia molecular**

**RESUMO:**

O parasitismo por trematódeos da família Paramphistomidae tem sido um dos grandes problemas em rebanho de bovídeos, tendo em vista que há uma grande prevalência desses parasitos encontrados no rúmen e retículo desses hospedeiros quando em fase adulta. Bovídeos são criados atualmente em várias regiões do mundo. Na América, estão presentes em todos os países com exceção do Chile e Canadá. Tem grande destaque para o Brasil. A região marajoara apresenta ótimas condições para a adaptação do bubalino que, por sua vez, é um animal rústico mas este não se viu livre de endoparasitos, uma vez que, quando presente em grande número no hospedeiro, pode acarretar danos à saúde do animal bem como perdas econômicas para os criadores. Um dos exemplos que temos ainda pouco relatada na literatura científica é a família Paramphistomidae presente no rúmen e retículo de bovídeos. As formas adultas do parasito são, geralmente, consideradas assintomáticas. Tais formas possuem como sítio de infecção as porções do rúmen e retículo dos ruminantes. De maneira oposta, as formas imaturas, tem como local de predileção o intestino delgado e são responsáveis pela paramphistomose, doença de reação inflamatória que culmina em diarreia, causando graves prejuízos. O presente trabalho justifica-se por ser relevante na identificação dos helmintos responsáveis pela referida parasitose tendo em vista a carência de identificações taxonômicas recentes de Paramphistomidae sp bem como sugerir o controle deles. Estas são, pois, ações relevantes para que não se tenha quedas na produção, além de se evitar a transmissão desses patógenos para outros animais. Com isto, este trabalho tem como objetivo investigar a ocorrência de Trematoda Digenea da família Paramphistomidae em bovídeos oriundos de alguns municípios do nordeste do Pará. As amostras dos helmintos foram obtidas em abatedouros frigoríficos e feita a análise em microscopia de luz bem como microscopia eletrônica de varredura e extração de DNA com a reação em cadeia de polimerase (PCR) e, desta maneira, foi verificada a classificação taxonômica do helminto estudado. Com base no que foi observado a partir do processamento das análises é possível inferir que trata-se de uma nova espécie de helminto da família Paramphistomidae, gênero *Cotylophoron*.

**Palavras-chave:** Taxonomia. Helminologia. Trematódeos. Paramphistomidae. *Cotylophoron marajoensis*.

## PARAMPHISTOMIDAE IN BOVIDES IN THE STATE OF PARÁ: Taxonomy and Molecular Biology

### ABSTRACT:

Trematodes of the Paramphistomidae family, having been one of the great phases, considering the cattle, there is a high prevalence of these problems in the rumen and reticulum of these hosts in adults. Bovids are currently bred in several regions of the world. In America, they are present in all countries with the exception of Chile and Canada. It has great prominence for Brazil. The Marajoara region presents great conditions for adaptation, in turn, it is a rustic animal which, in turn, is a non-parasitic rustic animal that, when it can present great damage to the animal's health as well as being free from damage to the animal's health, as well as free from harm to the health of the animal as well as to the breeders. One of the few reported examples that we have in scientific papers is the Paramphistomidae family present in the rumen and reticulum of bovids. Adult forms of the parasite are generally considered asymptomatic. Such forms have as infection site the portions of the rumen and reticulum of ruminants. Conversely, the immature forms have the small intestine as their predilection site and are responsible for paramphistomosis, a disease with an inflammatory reaction that culminates in diarrhea, causing serious damages. The present paper is justified for being relevant in the identification of the helminths responsible for the afore mentioned parasitosis, considering the lack of recent taxonomic identifications of Paramphistomidae sp, as well as suggesting their control. These are, therefore, relevant actions in order to avoid drops in production, and halt the transmission of these pathogens to other animals. Thus, this work aims to investigate the occurrence of Trematoda Digenea of the Paramphistomidae family in bovine animals from northeastern Pará on Pará State. Helminth samples were obtained from slaughterhouses in some municipalities in northeastern Pará and analyzed using light microscopy as well as scanning electron microscopy and DNA extraction with the polymerase chain reaction (PCR) and so, the taxonomic classification of the studied helminth was checked. Based on the analysis processing results, it is possible to infer that it is a new species of helminth of the Paramphistomidae family, genus *Cotylophoron*.

**Keywords:** Taxonomy. Helminthology. Trematodes. Paramphistomidae. *Cotylophoron marajoensis*.

## Sumário

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 CRONOGRAMA.....</b>	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
<b>2 COTYLOPHORON MARAJOENSIS N. SP. (DIGENEA: PARAMPHISTOMIDAE) A PARASITE OF BUBALUS BUBALIS ON MARAJÓ ISLAND, PARÁ, BRAZILIAN AMAZON <a href="https://doi.org/10.1590/S1984-29612020101">https://doi.org/10.1590/S1984-29612020101</a>.....</b>	<b>25</b>
<b>ABSTRACT:.....</b>	<b>25</b>
<b>RESUMO:.....</b>	<b>26</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>26</b>
<b>Material and Methods.....</b>	<b>27</b>
<b>Results.....</b>	<b>28</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>32</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>34</b>
<b>References.....</b>	<b>35</b>
<b>3 PROPOSTA DE MANUSCRITO – COMUNICAÇÃO BREVE (PERIÓDICO BIOTEMAS) 36 COTYLOPHORON. SP. (DIGENEA: PARAMPHISTOMIDAE) PARASITO DE BOVÍDEOS (<i>Bos taurus indicus</i>, <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bubalus bubalis</i>) ORIUNDOS DO MUNICÍPIO DE CASTANHAL, PARÁ.....</b>	<b>36</b>
<b>4 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>44</b>
<b>NORMAS PARA MANUSCRITO (COMUNICAÇÃO BREVE) DO PERIÓDICO BIOTEMAS – B4 MEDICINA VETERINÁRIA.....</b>	<b>44</b>



## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O Brasil se destaca na bovinocultura em quase todas as regiões do país em virtude do clima que não oferece grandes restrições. As regiões com maiores destaques são Centro-oeste, Sudeste e Norte. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (AIBEC, 2019), tais regiões são responsáveis por quase toda a produção nacional.

A bovinocultura ocorre, no país, em três modalidades de criação: a) intensiva, quando o gado é criado confinado; b) extensiva, que compreende a criação do gado solto no pasto e, c) semi-intensiva, onde há a permuta entre as duas modalidades citadas anteriormente. O estado do Pará possui o quinto maior rebanho bovino brasileiro com uma estimativa de 20.475.541 cabeças onde a modalidade mais praticada no estado é a de criação extensiva, ou seja, com o gado solto no pasto em grandes áreas territoriais (VALE et al., 2019).

O Marajó, localizado no estado do Pará e na Foz do Rio Amazonas, é o maior arquipélago fluviomarinho do mundo. Com mais de 50 mil km<sup>2</sup> tem a paisagem dividida entre Marajó dos Campos e Marajó das Florestas. O primeiro está localizado ao oriente e é composto pelos municípios de Soure, Salvaterra, Cachoeira do Arari, Santa Cruz do Arari, Ponta de Pedras e Muaná. Já o segundo, localizado a ocidente, tem como municípios Afuá, Gurupá, Anajás, Portel, Melgaço, Breves, Currálinho e São Sebastião da Boa Vista. (MARIN, 2015).

O arquipélago, de acordo com a autora supracitada, é conhecido pela grande variedade de ecossistemas e, no decorrer da história do Marajó, houve exploração madeireira bem como a introdução bubalinos onde há a prática da pecuária extensiva principalmente na região do Marajó dos Campos embora tal prática se estende também para a parte florestal do território marajoara (MARIN, 2015).

Como dito anteriormente, houve a inserção da pecuária extensiva no arquipélago onde há, predominantemente a bubalinocultura. O búfalo doméstico é um animal dócil e rústico pertencente à espécie *Bubalus bubalis*, possuindo 19 raças distribuídas pelo mundo, algumas sendo muito utilizadas para trabalho motor e produção de leite e de carne. Estima-se que o búfalo tenha sido domesticado em torno de 3.000 a.C., na China, sendo levado do continente asiático para a África e posteriormente à Europa e América (BARUSELLI, 1993).

Os búfalos são criados atualmente em várias regiões do mundo. Na América, estão presentes em todos os países com exceção do Chile e Canadá tendo grande destaque para o Brasil. Em se tratando de Brasil, os búfalos foram importados da Índia, Egito e Itália e introduzidos na ilha de Marajó em 1895 encontrando ótimas condições para adaptação (BARUSELLI, 1993; MARQUES & CARDOSO, 1997).

Apesar da região marajoara apresentar ótimas condições para a adaptação do bubalino que, por sua vez, é um animal rústico mas este não se viu livre de endoparasitos, uma vez que, quando presente em grande número no hospedeiro, pode acarretar danos à saúde do animal bem como perdas econômicas para os criadores. Um dos exemplos que temos ainda pouco relatada na literatura científica é a família Paramphistomidae presente no rúmen e retículo de bovídeos. (HORAK, 1971).

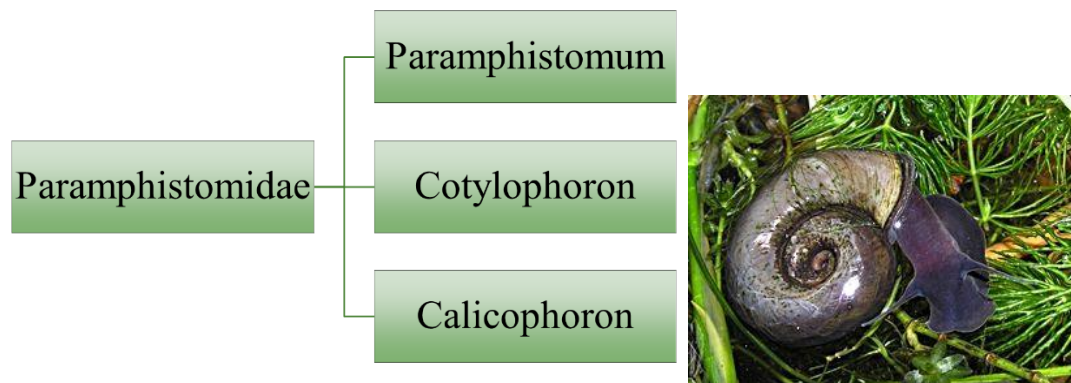
É de extrema importância realizar um manejo adequado desses animais uma vez que perdas econômicas ocorridas em virtude de ações parasitárias têm sido constatadas na literatura científica (GIRÃO; GIRÃO, MEDEIROS, 1992). Desta maneira, é de extrema importância identificar os helmintos responsáveis por parasitoses dos bovídeos e, assim, promover o controle destes para reduzir os riscos na saúde dos animais, dos consumidores e as perdas econômicas.

Sabe-se que trematódeos Paramphistomidae são importantes parasitos de animais e que apresentam ampla distribuição mundial, sendo relatados na África, Ásia, Oceania, América e Países do mediterrâneo. Regiões tropicais e subtropicais apresentam melhores características climáticas para o bom desenvolvimento destes parasitos. Portanto, a maior ocorrência deste ocorre nas referidas regiões. (HORAK, 1971). No Brasil, podem ocorrer em diversas regiões do país como na região Sul (ROCKETT et al, 1965), central-oeste (COSTA et al, 1985), nordeste (GIRÃO et al, 1992) e norte (MATTOS JR., 1989).

As formas adultas do parasito são, geralmente, consideradas assintomáticas. Tais formas possuem como sítio de infecção as porções do rúmen e retículo dos ruminantes. De maneira oposta, as formas imaturas, tem como local de predileção o intestino delgado e são responsáveis pela paramphistomose, doença de reação inflamatória que culmina em diarreia, causando graves prejuízos ao animal (MATOS & UENO, 1996).

A família tem como principais gêneros *Paramphistomum*, *Cotylophoron* e *Calicophoron* (ROMERO, 1999). Estes endoparasitos detêm como hospedeiro intermediário para o desenvolvimento sendo moluscos da família Planorbidae e Lymnacididae os principais para esses helmintos. O desenvolvimento deles se assemelha aos da família *Fasciolidae* e o ciclo pode se completar em até 4 semanas, se em condições favoráveis (Figura 1).

**Figura 1:** Gêneros da família Paramphistomidae e o hospedeiro intermediário



**Fonte:** Adaptado pela autora.

O desenvolvimento no hospedeiro definitivo ocorre no trato digestório após a ingestão de metacercárias encistadas junto com a grama. No duodeno há um excitamento e os trematódeos imaturos fixam-se à mucosa passando a se alimentar por um período de seis semanas antes de migrarem para os pré-estômagos e atingirem a forma adulta. O período pré-patente é de 7 a 10 semanas (MÜLLER et al, 1992).

No rúmen e retículo a presença deste parasito é bem tolerada e não há demonstração de sinais clínicos apenas algumas papilas atrofiadas (DUTRA, 2010). Diferente de suas larvas responsáveis pelos efeitos patogênicos em que há sinais clínicos que vão de anorexia e sede intensa à hemorragia retal com mortalidade em surtos agudos (TAYLOR et al, 2007).

O número de espécies de helmintos que parasitam o trato digestório de ruminantes é grande, podendo ocorrer infecções multiespecíficas com achados patológicos diversos, assim como podem ser diversas as sensibilidades a drogas antiparasitárias dentre estas espécies. Este fato torna-se mais claro nos dias de hoje, com a perda da eficácia de todos os compostos de ação antiparasitária, invocando a realização de novos estudos em diferentes regiões biogeográficas, para mapeamento de ocorrência e caracterização ampla de espécies helmínticas, identificação de fatores de distribuição e dispersão, e resposta a tratamentos de prevenção e controle, para auxiliar na organização de novas ações no campo da biologia parasitária (DUTRA, 2010).

Doenças parasitárias produzem fortes impactos sobre os animais de produção impactos esses que dependem da espécie parasitada, da espécie do parasito e do seu grau de infecção. Além dos aspectos mencionados fatores como as condições climáticas, o solo, a vegetação, o tipo de exploração raça e idade o hospedeiro também são de grande importância na dinâmica das doenças produzidas por helmintos. Assim, o conhecimento taxonômico e epidemiológico

dos parasitos é fundamental para o estabelecimento das práticas de profilaxia e controle de helmintos (DELGADO et al., 2009).

O presente trabalho justifica-se por ser relevante na identificação dos helmintos responsáveis pela referida parasitose tendo em vista a carência de identificações taxonômicas recentes de Paramphistomidae bem como sugerir o controle deles. Estas são, pois, ações relevantes para que não se tenha quedas na produção, além de se evitar a transmissão desses patógenos para outros animais (DELGADO et al., 2009).

Além disso, poucos são os dados relacionados aos aspectos morfológicos e biológicos desses helmintos na região Norte, bem como a interação deste com o hospedeiro. Neste sentido, faz-se necessário a busca por informações que possam somar-se às já existentes com a finalidade de ampliar o conhecimento sobre as características do parasitismo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Investigar a ocorrência de Trematoda Digenea da família Paramphistomidae em bovídeos oriundos de municípios do estado do Pará.

### **Objetivos Específicos**

- Investigar a ocorrência de ovos e adultos de trematódeos pertencentes à família Paramphistomidae em bovídeos oriundos do nordeste paraense bem como, descrever os índices ecológicos do parasitismo nas espécies definidas;
- Ampliar dados taxonômicos e histopatológico dos helmintos da família Paramphistomidae que ocorrem no nordeste do Pará;
- Realizar um mapeamento genético de possíveis espécies por meio de sequenciamento genético.

## REFERÊNCIAS

- BARUSELLI, P.S. **Manejo reprodutivo de bubalinos**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1993. 46p. (Manual Técnico).
- COSTA, H. M. A.; GUIMARÃES, M. P.; LEITE, A. C. LIMA, W. S. Distribuição de helmintos parasitas de animais domésticos no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 465-579, 1985.
- DELGADO, F. E. F.; et al. Verminose dos bovinos: Percepção de pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 29-33, 2009.
- DUTRA, F. Paramphistomiasis aguda em novillitosa. **Archivo Veterina Rio Del Este**, v. 7, p. 1-2. 2010.
- MARIN, R. E. A. et al. **Povos Tradicionais no Arquipélago do Marajó e Políticas de Ordenamento Territorial e Ambiental**. Rio de Janeiro: Casa 8, 2015.
- MARQUES, J. R. F.; CARDOSO, L. S. A bubalinocultura no Brasil e no Mundo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1., 1997, Cruz das Almas. **Anais**. Cruz das Almas: Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, p.10-221, 1997.
- MATOS, M. J. T.; UENO, H. Prevalência de Paramphistomum no rúmen e retículo de bovinos no estado do Rio Grande do Sul – Brasil. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 273-176, 1996.
- MATTOS, Jr.. Prevalência de Paramphistomum de bovinos (bos tauros), no município de Oriximiná – Pará. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 11, Rio de Janeiro, 1989, **Resumos...**, Rio de Janeiro, p. 17. 1989.
- MÜLLER, G.; LARA, S. I. M.; RIBEIRO, P. B. Infecção Natural e experimental de Drepanotremakermatoides (Planorbidae) com Paramphistomum sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 23-26, 1992.
- GIRÃO, E. S.; GIRÃO, R. N.; MEDEIROS, L. P. Prevalência, intensidade de infecção e variação estacional de helmintos em bovinos no estado do Piauí. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 8, p. 889-897, 1992.
- HORAK, I. G. Paramphistomiasis of domestic ruminants. **Advances in parasitology**, v. 9, p. 33-72, 1971.
- ROCKETT, N.; FREIRE, J. J.; DI PRIMIO, R. A. Nota previa sobre a presença de Paramphistomum cervi (Schurank, 1970) no estado do Rio Grande do Sul. In: FREIRE, J. J. Fauna parasitaria Riograndense. I – Introdução, boi, ovelha e cabra. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 40-55, 1965.
- ROMERO, Héctor Quiroz. **Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos**. Editorial Limusa, 1999.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology**. 3ªed. Blacwell, Oxford.

874p. 2007.

Vale, B. P. et al. The Expansion of Intensive Beef Farming to the Brazilian Amazon. **Global Environmental Change**, 57 (2019) 101922, 2019.

## 1.1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.1 O parasito e seu ciclo de vida

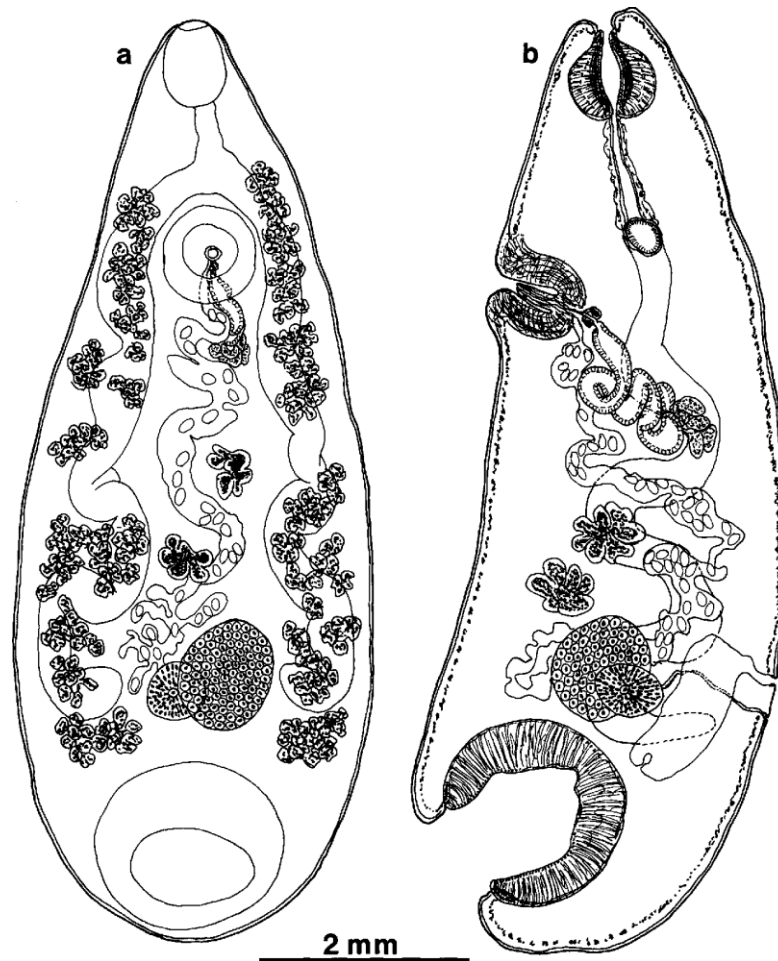
A classe Trematoda apresenta duas subclasses: Monogenea, que são parasitos monoxenos, e Digenea, que precisam de um hospedeiro intermediário sendo, portanto, heteroxenos. Os indivíduos da subclasse Digenea, que inclui o objeto de estudo deste trabalho, são encontrados exclusivamente em vertebrados e são de grande importância na medicina veterinária. Os helmintos adultos, como citado anteriormente, ocorrem no rúmen e retículo de hospedeiros ruminantes (HORAK, 1971; MÜLLER et al, 1992; MATOS & UENO, 1996; ROMERO, 1999).

Em geral, estes trematódeos podem ser morfológicamente descritos como sendo achatados dorsoventralmente, com duas ventosas para fixação: a ventosa oral e o acetábulo (ventosa ventral). O trato digestivo é do tipo incompleto, a cavidade oral conduz à uma faringe, esôfago e ao ceco, o qual é dividido em duas ramificações que, por sua vez, não apresentam abertura terminal, i.e., terminam em forma de “saco cego” (QUIROZ, 2005).

Uma vez que estes vermes não possuem ânus, presume-se que o material não digerido é regurgitado. A alimentação destes animais é geralmente constituída de sangue e resquícios de tecido do hospedeiro. A ingesta é digerida e absorvida no ceco. O sistema excretor consiste em um grande número de solenócitos que impelem os resíduos metabólicos através de uma rede de túbulos que eventualmente se juntam e desembocam para o meio externo ou para uma vesícula excretora, a depender da espécie. O sistema nervoso é composto por um par de troncos longitudinais que se conectam (TAYLOR et al., 2007).

Os trematódeos da subclasse Digenea normalmente são hermafroditas e tanto a fertilização sexuada quanto a assexuada podem ocorrer. O trato reprodutivo masculino é composto por um par de testículos, podendo ser simples ou ramificados, cada um levando a um ducto deferente próprio que, por sua vez, juntam-se na bolsa do cirro, na qual encontram-se as vesículas seminais, a glândula prostática e o cirro propriamente dito, que termina em um poro genital comum (TAYLOR et al., 2007) (Figura 2).

**Figura 2:** Morfologia do helminto.



**Fonte:** CORDERO DEL CAMPILLO et al., 1999

O sistema reprodutor feminino apresenta um único ovário conectado a um oviduto, o qual se expande em sua porção distal para formar o oótipo. É no oótipo que o ovo adquire o vitelo produzido por glândulas especializadas que também contribuem para secretar a casca, que ganha rigidez à medida com que o ovo atravessa o útero. O ovo é, então, extrudido pela abertura genital comum, adjacente ao acetábulo. Os ovos dos Digenea são operculados (CORDERO DEL CAMPILLO et al., 1999).

Em relação aos indivíduos da família Paramphistomatidae e do gênero *Paramphistomum*, também conhecidos como “vermes do rúmen”, sua morfologia condiz em grande parte com a descrição geral da sua subclasse, porém com algumas características importantes a serem observadas: os indivíduos adultos são pequenos, cônicos e larviformes, forma incomum dentre os trematódeos, com cerca de 1 centímetro de comprimento e de 3 a 5 milímetros de largura e coloração avermelhada. Diferentemente dos outros helmintos digenéticos, o acetábulo dos *Paramphistomum* localiza-se na extremidade posterior do corpo e



é bem desenvolvido (PAUCAR, 2008).

A taxonomia dos Paramphistomum é complexa e possui algumas lacunas na classificação taxonômica, uma vez que muitas espécies descritas podem ser sinônimas, diferenciando-se apenas por tamanho e forma das ventosas.

A seguir tem-se a classificação taxonômica de *Paramphitomidae* sp. segundo Paucar (2008):

Filo: Platyhelminthes (Schneider, 1872)

Subfilo: Cercomeria (Brooks, 1982)

Superclasse: Cercomeridea (Brooks, Grady & Glen, 1985)

Classe: Trematoda (Rudolphi, 1808)

Subclasse: Digenea (Van Beneden, 1858)

Ordem: Amphistomoida (Cordero del Campillo, et al., 1999)

Subordem: Paramphistomata (Cordero del Campillo, et al., 1999)

Superfamília: Paramphistomoidea (Stiles & Goldberger, 1910)

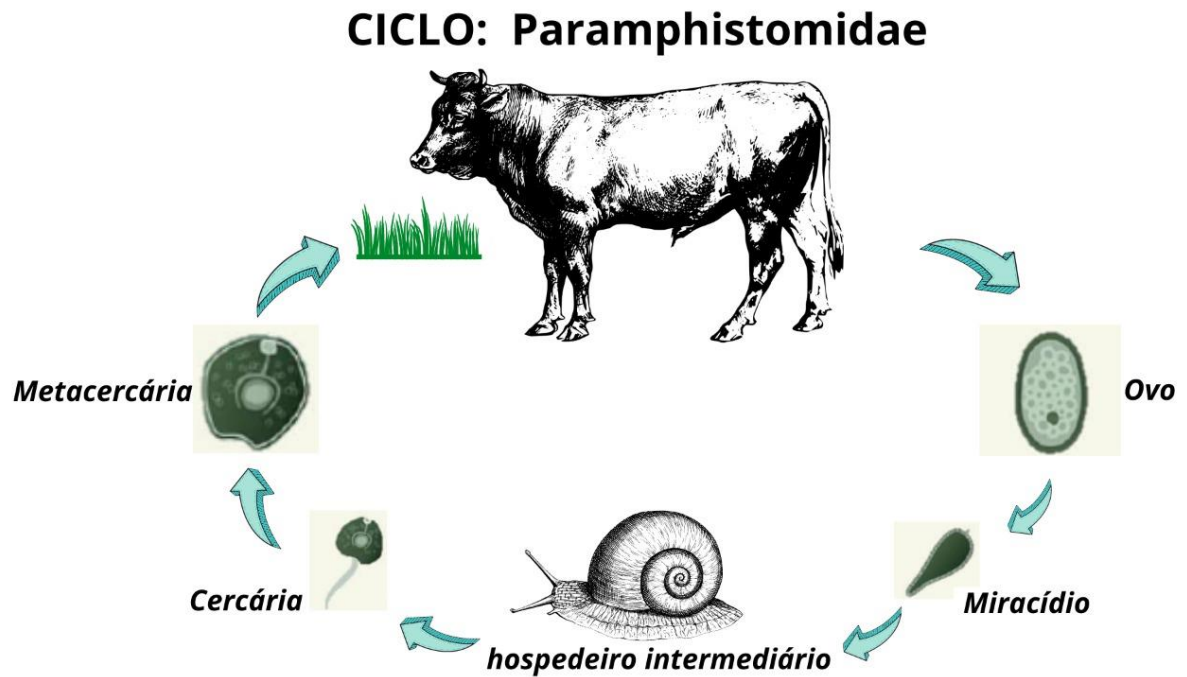
Família: Paramphistomidae (Fischöeder, 1901)

O ciclo e epidemiologia da família Paramphistomidae são semelhantes a dos trematódeos que parasitam fígado, sendo sempre indireto e necessitando de hospedeiro intermediários (molusco). Podem se reproduzir de forma assexuada permitindo que um único miracídio possa originar um grande número de cercarias no hospedeiro intermediário, diferentemente dos helmintos adultos, que se reproduzem de forma sexuada no hospedeiro definitivo (CORDERO DEL CAMPILLO et al., 1999) (Figura 3).

Os parasitos adultos produzem ovos não embrionados no rúmen, os quais por sua vez são evacuados com as fezes e chegam à ambientes úmidos. Em condições de umidade e temperatura adequados, os ovos dão origem ao miracídio ainda dentro do ovo (QUIROZ, 2005). Dezesete dias após chegar ao ambiente, o miracídio deixa o ovo e permanece ativo por mais quatro horas em ambiente úmido. O miracídio penetra na cavidade respiratória dos hospedeiros intermediários, podendo permanecer neste por 12 ou até 21 dias (SOULSBY, 1987). Após esta fase, os miracídios dão origem a cercarias em duas semanas, e em aproximadamente dois meses a cercaria completa seu desenvolvimento (BORCHERT, 1975).

As cercarias abandonam os moluscos, nadam e fixam-se em plantas que serão ingeridas pelos animais ao pasto. As cercarias mudam para o estágio seguinte, metacercária, as quais encontram-se envolvidas por duas membranas resistentes, uma externa fibrosa e outra mais interna (BORCHERT, 1975). Estas metacercárias sobrevivem por mais 12 semanas no hospedeiro (Figura 1) (BORCHERT, 1975).

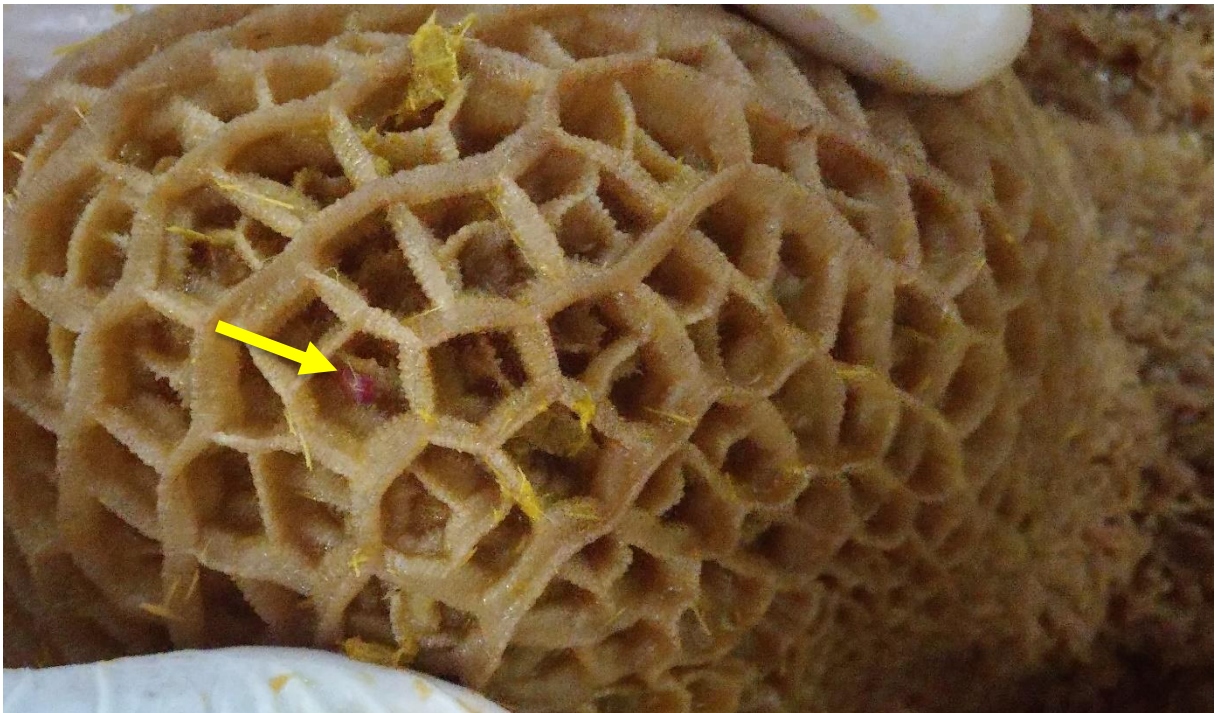
**Figura 3:** Ciclo de vida do helminto



Fonte: Adaptado pela autora

Após a ingestão por parte do hospedeiro definitivo, as metacercárias se fixam nos primeiros metros do intestino delgado. As formas jovens do helminto se fixam nos primeiros metros do intestino delgado (QUIROZ, 2005). Em 6 a 8 semanas, os helmintos regressam ao abomaso e em seguida para o rúmen e retículo, onde se tornam adultas e, portanto, sexualmente ativas (CORDERO DEL CAMPILLO, et al., 1999) (Figura 4).

**Figura 4** – Helminto parasitando retículo de bovino. Na seta é possível perceber a forma adulta fixada ao retículo do hospedeiro.



**Fonte:** Laboratório de Histologia e Embriologia Animal, 2017.

### 1.1.2 Importância econômica

Perdas econômicas induzidas por infecções parasitárias em animais de produção têm sido constatadas por diversos autores (GIRÃO; GIRÃO, MEDEIROS, 1992; JONES et al., 2000; FORBES et al., 2002, CHAGAS et al., 2005). O Brasil é detentor de um relevante rebanho comercial de bubalinos e bovinos, os quais paulatinamente vem ganhando espaço no mercado nacional e internacional (BERNARDES, 2007). Cuidados no manejo sanitário de bovídeo são de fundamental importância para a prevenção e controle de parasitos intestinais e, consequentemente, para o incremento da produtividade no Brasil.

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2018 o rebanho de bovino e bubalino no Brasil foi de 213.523.056 e 1.390.066 cabeças respectivamente. No estado do Pará o rebanho foi de 20.628.651 bovinos e 519.072 bubalinos. (BRASIL, 2020). O rebanho no contexto brasileiro e, mais particularmente da região Norte, vem crescendo ano após ano, resultado da alta demanda do mercado consumidor de carne e leite associada à aceitação por parte dos consumidores, os quais estão cada vez mais exigentes quanto à qualidade dos alimentos consumidos (BERNARDES, 2007; BOLLIGER, 2011).

Em se tratando do Arquipélago do Marajó, o rebanho bubalino é criado de maneira extensiva, ou seja, os animais ficam soltos a pastos desprovidos de cercas ou com cercas

rudimentares (Figura 5). O arquipélago tem como um dos problemas na bubalinocultura a precariedade de infraestrutura, baixo desenvolvimento tecnológico, mão de obra pouco qualificada, dentre outras problemáticas para a criação destes animais.

**Figura 5** – Bubalinos em criação extensiva na Ilha do Marajó



**Fonte:** Laboratório de Histologia e Embriologia Animal, 2018

Nesse sentido, é de fundamental relevância identificar quais os helmintos responsáveis por parasitoses em bovídeos, bem como promover o controle das mesmas para que não se tenha quedas na produção, além de se evitar a transmissão desses patógenos para outros animais (DELGADO et al., 2009).

Em relação ao parasito, poucos são os dados relacionados aos aspectos biológicos dos helmintos trematódeos na região Norte, bem como deste com o possível ao seu hospedeiro. Nesse sentido faz-se necessário a busca por maiores informações que possam somar-se às já existentes, no sentido de ampliar o conhecimento sobre as características do parasitismo por Paramphistomidae.

Segundo Bowman, (2003), a Clorsulona na dose de 2 mg/kg, em combinação com Ivermectina na dose de 0,2 mg/kg, demonstrou ser ineficaz no tratamento de formas adultas. Por outro lado, o protocolo anti-helmíntico de Hexaclorofeno, em uma única dose de 20 mg/kg por via oral, e a Oxiclozanida em duas doses de 19 mg/kg por via oral, foram altamente eficazes contra adultos e formas imaturas.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Obtenção das amostras

As coletas dos helmintos foram realizadas de maneira aleatória após abate de bovinos e bubalinos no Abatedouro Frigorífico do Tapanã (SOCIPE) em Belém-PA e no Abatedouro Frigorífico de Soure sendo que no primeiro as coletas ocorreram entre os meses de julho de 2017 a março de 2019 e no segundo as coletas foram nos meses de julho de 2017 e setembro de 2018. No entanto, ocorrência dos helmintos se deu principalmente na SOCIPE e em bubalinos.

Os órgãos analisados foram rúmen e retículo, para investigação das formas adultas uma vez que estas, quando em fase adulta, encontra-se parasitando estas duas cavidades do estômago de bovídeos. Além disto, foi realizada também a procura de qualquer alteração que possa sugerir a presença dos mesmos, além de exames de fezes para confirmação de diagnóstico.

Os parasitos encontrados foram mantidos em solução salina tampão, sendo os espécimes a serem utilizados para estudos morfológicos, fixados com solução A.F.A. (ácido acético glacial a 2%, formaldeído a 3% e 95% de etanol 70% GL) durante 24 horas de acordo com técnicas rotineiras de processamento. Já para análise genética, os helmintos foram fixados em álcool absoluto. Dados referentes ao hospedeiro, assim como número de nematódeos encontrados e a localização destes no hospedeiro, foram registrados em uma ficha de colheita apropriada, criada para o laboratório.

### 1.2.2 Microscopia de luz

Para análise em microscopia de luz os helmintos foram comprimidos, lavados em álcool 70% por 5 minutos, corados em Carmin alcóolico por duas horas, lavados novamente em álcool 70% por 5 minutos, sendo depois clarificados em Álcool ácido (álcool absoluto - 70 ml, ácido clorídrico - 30 ml) por tempo variado, desidratados em uma série alcoólica (70%, 80%, 90%, ABS 1, ABS 2) em torno de 10 minutos cada e diferenciados em Salicilato de Metila por tempo variado. As lâminas histológicas foram analisadas e fotografadas com o auxílio de fotomicroscópio LEICA E – 400 no Laboratório de Histologia e Embriologia Animal (LHEA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

### 1.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para microscopia eletrônica de varredura os helmintos foram fixados em A.F.A. e pós-fixados em tetroxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% por 2 horas, desidratado em série de etanoica por

1 hora em cada banho, secos ao ponto crítico de CO<sub>2</sub>, montados em suportes (*stubs*) e metalizados com ouro-paládio. Depois da preparação, os *stubs* foram mantidos em dessecador para análise posterior ao Microscopia Eletrônico de Varredura (MEV). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, sediado na UFRA.

#### 1.2.4 Extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR)

Os dados moleculares foram obtidos através de extração de DNA total dos trematodeos adultos e executados segundo o protocolo indicado pelo método de extração por fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. O gene 18S rDNA foi amplificado parcialmente por reação em cadeia da polimerase (PCR) em dois fragmentos parcialmente sobrepostos, utilizando os primers cc18sf (5'-CGGTGAAACCGCGAATGGCTC-3') e cc18sr (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAAGG-3') que amplificam um fragmento de aproximadamente 660 bp.

Deste modo, as reações em cadeia da polimerase da porção 18S foram realizadas utilizando 12,5 µL de MASTER MIX, 30 µL de DNA, 1,5 µL de primer cc18sf, 1,5 µL de primer cc18rf e 6,5 µL de H<sub>2</sub>O completando o volume final de 25 µL. A PCR da porção 28S consistiu em desnaturação a 95°C durante 5 min e 35 ciclos de desnaturação (1 min a 95°C), anelamento (1 min a 67 °C), extensão (1,30 min a 72 °C) e uma extensão final (10 min a 72 °C). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1.5%, revelados por coloração com Brometo de Etídio (EtBr) e visualizados sob luz ultravioleta.



## REFERÊNCIAS

- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 292-298, 2007.
- BOLLIGER, F. P. **Produção da Pecuária Municipal**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, v. 39. 2011. 60p.
- BORCHERT, A. **Parasitología Veterinaria**. Editorial Acribia, Zaragoza-España. p. 84-8. 1975.
- BOWMAN, D. D. Georgi. **Parasitology for Veterinarians**. ed. 8. Elsevier, 2003.
- CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; MARTINS, L. A. Controle de verminose em pequenos ruminantes adaptado para a região da zona da Mata/MG e região serrana do Rio de Janeiro. **Circular Técnica, versão online**. Sobral, CE, n. 30, p. 4, 2005.
- CORDERO DEL CAMPILLO et al. **Parasitología Veterinaria**. Mc. Graw Hill. Madrid España. p. 87-89, 160, 225-228, 1999.
- DELGADO, F. E. F.; et al. Verminose dos bovinos: Percepção de pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 29-33, 2009.
- FORBES, A.B. et al. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, v.104, p.339-344, 2002.
- GIRÃO, E. S.; GIRÃO, R. N.; MEDEIROS, L. P. Prevalência, intensidade de infecção e variação estacional de helmintos em bovinos no estado do Piauí. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 8, p. 889-897, 1992.
- HORAK, I. G. Paramphistomiasis of domestic ruminants. **Advances in parasitology**, v. 9, p. 33-72, 1971.
- JONES, Arlene; BRAY, Rodney A.; GIBSON, David I. (Ed.). **Keys to the Trematoda**. Cambridge: CABI Publishing and The Natural History Museum, 2005.
- MATOS, M. J. T.; UENO, H. Prevalência de Paramphistomum no rúmen e retículo de bovinos no estado do Rio Grande do Sul – Brasil. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 273-176, 1996.
- MÜLLER, G.; LARA, S. I. M.; RIBEIRO, P. B. Infecção Natural e experimental de Drepanotremakermatoides (Planorbidae) com Paramphistomum sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 23-26, 1992.
- PAUCAR, S. **Prevalencia de fasciolosis y paramphistomosis en el ganado lechero de tres distritos de la provincia de Oxapampa, Pasco**. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina Veterinaria E. A. P. de Medicina Veterinaria. Lima, Perú. Pp. 22-34. 2008.
- QUIROZ, H. **Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos**. Editorial



Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. México, D.F. pp. 273-274. 2005.

ROMERO, Héctor Quiroz. **Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos**. Editorial Limusa, 1999.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los animales domésticos**. 7 Ed. Interamericana. México, D.F.P p. 8-13, 63-68, 1987.

TAYLOR, M. A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology**. 3<sup>a</sup>ed. Blacwell, Oxford. 874p. 2007.

**2 COTYLOPHORON MARAJOENSIS N. SP. (DIGENEA: PARAMPHISTOMIDAE) A PARASITE OF BUBALUS BUBALIS ON MARAJÓ ISLAND, PARÁ, BRAZILIAN AMAZON <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020101>**

**COTYLOPHORON MARAJOENSIS N. SP. (DIGENEA: PARAMPHISTOMIDAE) PARASITE DE BUBALUS BUBALIS NA ILHA DO MARAJÓ, PARÁ, BRASIL, AMAZÔNIA BRASILEIRA**

**RUNNING TITLE: New Cotylophoron in Brazil**

Vanessa Silva do Amaral<sup>1,2</sup>: <https://orcid.org/0000-0001-5028-3596>

Diego Ferreira de Sousa<sup>1</sup>: <https://orcid.org/0000-0002-4324-3761>

Raimundo Nonato Moraes Benigno<sup>3</sup>: <https://orcid.org/0000-0002-6936-6321>

Raul Henrique da Silva Pinheiro<sup>1,4</sup>: <https://orcid.org/0000-0003-3221-5017>

Evonnildo Costa Gonçalves<sup>5</sup>: <https://orcid.org/0000-0003-2221-1995>

Elane Guerreiro Giese<sup>1,2\*</sup>: <https://orcid.org/0000-0001-7833-1334>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal – UFRA, Belém, PA, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Histologia e Embriologia Animal, Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Parasitologia Animal – Instituto da Saúde e Produção Animal – Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil

<sup>4</sup> Programa de Pós-graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, PA, Brasil

<sup>5</sup> Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém, PA, Brasil

\*Corresponding author: Laboratório de Histologia e Embriologia Animal, Instituto da Saúde e Produção Animal – Universidade Federal Rural da Amazônia, Avenida Presidente Tancredo Neves, Nº 2501 Bairro: Terra Firme, CEP: 66.077-830 Cidade: Belém-Pará-Brasil. E-mail: [lheaufra@gmail.com](mailto:lheaufra@gmail.com)

**ABSTRACT:**

The genus *Cotylophoron* belongs to the Paramphistomidae family and its definitive hosts are ruminants in general. This work describes the presence of a new species of the gender, a parasite in the rumen and reticulum of *Bubalus bubalis*, on Marajó Island in the Eastern Brazilian Amazon, using of light microscopy, scanning electronic microscopy and molecular biology techniques. One hundred and ten animals were analyzed, of which 4.54% were parasitized by flukes in their adult forms. The helminths were found fixed to the ruminal mucosa and present *Liorchis*-type pharynx, *Cotylophoron*-type genital sucker, oblique testicles larger than the ovary, uterus in rings full of eggs and *Cotylophoron*-type acetabulum. These morphologic characters do not fit into any previously described species. Thus, it is proposed that this is a new species in the genus *Cotylophoron*. The present work expands the record of parasitism by helminths in *Bubalus bubalis*, this being the first record of trematoda from the genus *Cotylophoron* for this host in the Brazilian Amazon.

**Keywords:** Taxonomy, parasite, Trematoda, buffalo, Brazil.

## RESUMO:

O gênero *Cotylophoron* pertence à família Paramphistomidae e possui como hospedeiros definitivos ruminantes em geral. Este trabalho descreve a presença de uma espécie nova do gênero, parasito do rúmen e retículo de *Bubalus bubalis*, na Ilha de Marajó, Amazônia oriental brasileira, a partir das técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e biologia molecular. Foram analisados 110 animais, dos quais 4,54% estavam parasitados por trematódeos na sua forma adulta. Os helmintos foram encontrados fixados à mucosa ruminal, apresentando faringe do tipo *Liorchis*, ventosa genital do tipo *Cotylophoron*, testículos oblíquos maiores que o ovário, útero em alças repleto de ovos, e acetábulo do tipo *Cotylophoron*. Estes caracteres morfológicos não se enquadram em nenhuma espécie previamente descrita. Assim, propõe-se uma nova espécie ao gênero *Cotylophoron*. O presente trabalho amplia o registro do parasitismo por helmintos em *Bubalus bubalis*, sendo este o primeiro registro de trematódeos do gênero *Cotylophoron* nesse hospedeiro para a Amazônia brasileira.

**Palavras-chave:** Taxonomia, parasito, Trematoda, búfalo, Brasil.

## Introduction

The *Bubalus bubalis* species is known as the “buffalo” throughout Brazil and is bred in several regions of the world because of its sturdiness, milk and dairy products and good-quality meat, besides being used for work (Damasceno et al., 2010). In Brazil, buffalos have been imported from different countries such as Australia, Egypt, India, Italy, and Southwest Asia and were first introduced in the continent on Marajó Island in 1895, where the natural conditions of this region were excellent for their development (Marques, 2000). And although it is a domestic and economically important animal, little is known about its parasitic interactions.

The genus *Cotylophoron* (Stiles & Goldberger, 1910) belongs to the Paramphistomidae family (Fischoeder 1901). In general, they have ruminants as definite hosts, the rumen and reticulum being their sites of infection when adults. The immature forms inhabit the small intestine, where they perform the backward movement in their development process in the digestive tract, traveling from the small intestine to the rumen/reticulum (Forlano et al., 2001). This behavior is due to parasitic ability of genetic expression that allows migration through host's tissues while triggering its immune responses (Pérez-Ponce de León & Hernández-Mena, 2019).

Currently, the genus *Cotylophoron* comprises eight species: *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder 1901); *Cotylophoron jacksoni* Nasmak 1937; *Cotylophoron fulleborni* Nasmak, 1938; *Cotylophoron panamensis* Prince & McIntosh 1953; *Cotylophoron bareilliense*

Mukherjee & Chauhan 1965; *Cotylophoron macrosphinetris* Sey & Graber 1979; *Cotylophoron xiangjiangense* Wang 1979; and *Cotylophoron travassosi* (Martins & Pezzi, 1992).

This genus includes trematode parasites of rumen and reticulum in ruminants worldwide (Martínez & Velásquez, 2012). Alarcón & Velásquez (2009) described the *C. cotylophorum* species as also present in the rumen of *Bos taurus* in the region of Rio Negro, Colombia. Sánchez et al. (2009) described the same species as parasitizing the rumen of bovines in Loreto in Peru. Morales et al. (2015) reported the presence of *C. fulleborni* in the ruminal mucosa of bovines in Venezuela.

In Brazil, the genus *Cotylophoron* is reported as parasitizing different ruminants in different locations. Costa & Guimarães (1990) mention the first occurrence of *C. bareilliensis* parasitizing the rumen of sheep in the state of Pará and Costa & Guimarães (1992) describe the *C. travassosi* species in bovines in the state of Maranhão. Miranda & Costa (1999) report the incidence of *C. panamensis* parasitizing bovines of the state of Rondônia and *C. fulleborni* in bovines and goats in the states of Roraima, Pará and Maranhão and *C. jacksoni* also in bovines in the states of Pará, Roraima and Rondônia.

With this in mind, the present work describes the morphology, prevalence and molecular data of new species of Paramphistomidae that was found as a parasite of *B. bubalis* on Marajó Island, Brazil.

## **Material and Methods**

### **Study area and collection**

The sampling was composed of hosts deriving from the island of Marajó, from the municipality of Soure (00°4'00"S, 48°31'24"W), Breves (01°40'56"S, 50°28'49"W) and Cachoeira do Arari (01°00'41"S, 48°57'48"W), totaling 110, all rumens and reticula of the examined buffalos obtained from slaughter in the Abatedouro Frigorífico, in Tapanã, at Cooperativa da Indústria Agropecuária do Pará (SOCIPE), in Belém and in the Matadouro Frigorífico Municipal de Soure, Pará. Each animal had its locality confirmed through its Animal Transport Guide (GTA). Fragments of rumen and reticulum were collected and transported cooled to the Laboratório de Histologia e Embriologia Animal (LHEA), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

### **Preparation of parasites for light microscopy**

The trematodes found were fixed and processed according to Giese et al. (2015). Ten trematodes were used for morphologic and morphometric analysis. The measures were obtained

in millimeters and are presented in the form of average and amplitude between parentheses. The images in light microscopy were obtained by photomicroscope with connected clear vision camera (LEICA DM2500). For scanning electron microscopy, the helminths specimens were washed in distilled water, post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated to the critical point of CO<sub>2</sub>, metallized with gold+palladium, and analyzed using a TESCAN scanning electron microscope (VEGA 3) in the Scanning Electron Microscopy Laboratory, Universidade Federal Rural da Amazônia.

### **Molecular analysis**

Molecular characterization was based on partial 18S small subunit ribosomal rRNA gene (18S SSU), which after DNA extraction through the Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Stratec Molecular), was amplified using the primers cc18sf (5'-cggtgaaaccgcaatgctc-3') and cc18sr (5'-gacgggcggtgtgtacaaagg-3'). The polymerase chain reactions (PCRs) were carried out in 25 µL final volume, containing 5-10 ng of DNA, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 50 µM of each DNTP, 0.5 µM of each oligonucleotide and one unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen). The amplification reaction consisted of 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 67 °C, and 1 min 30 sec at 72 °C, preceded by 5 min at 95 °C and followed by 10 min at 72 °C. Amplicons were enzymatically purified with Illustra ExoProStar (GE Healthcare). Nucleotide sequencing was performed in an ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's specifications. BioEdit software (Hall, 1999) was used to align forward and reverse sequences.

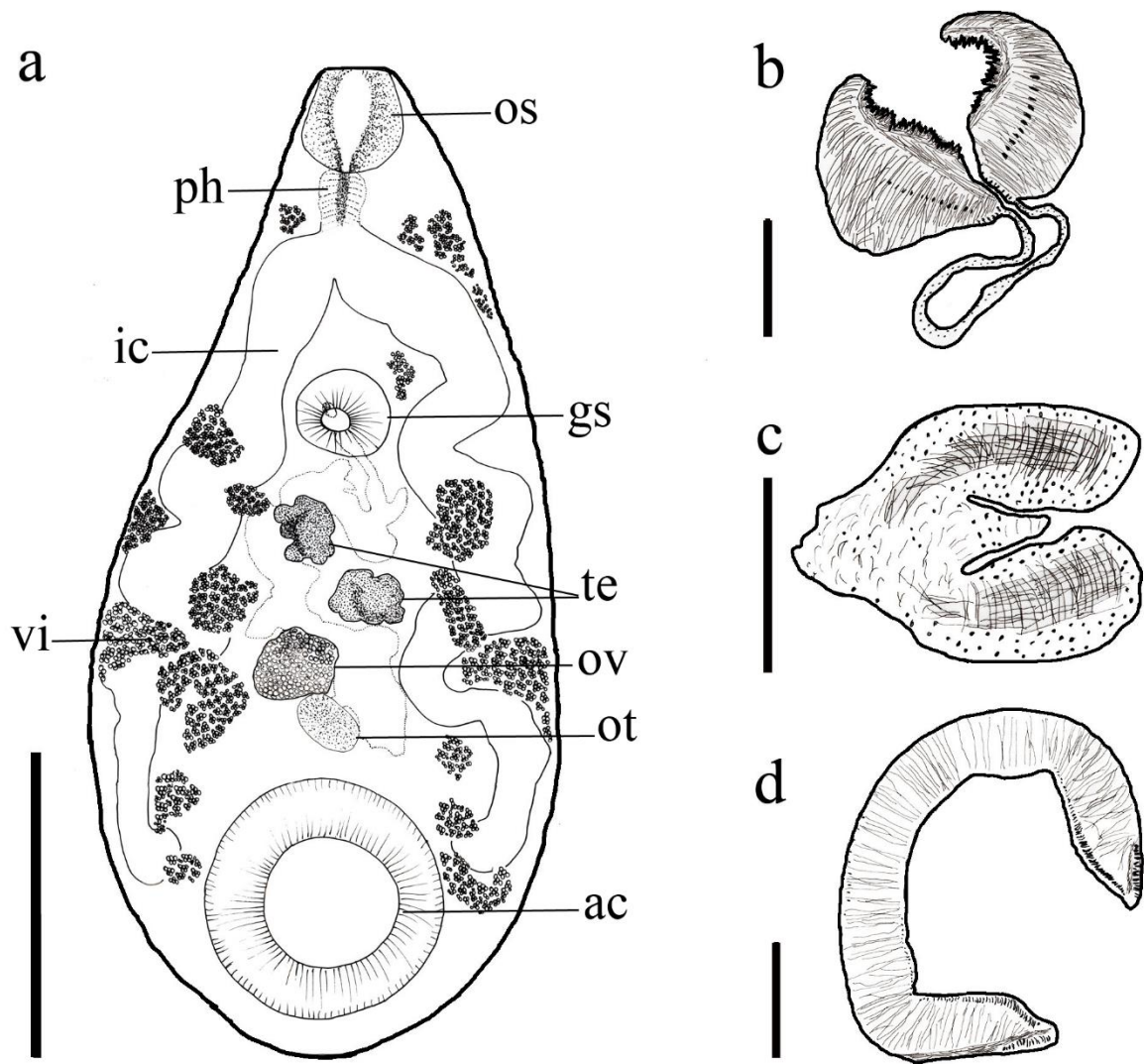
### **Results**

Paramphistomidae (Fischoeder 1901)

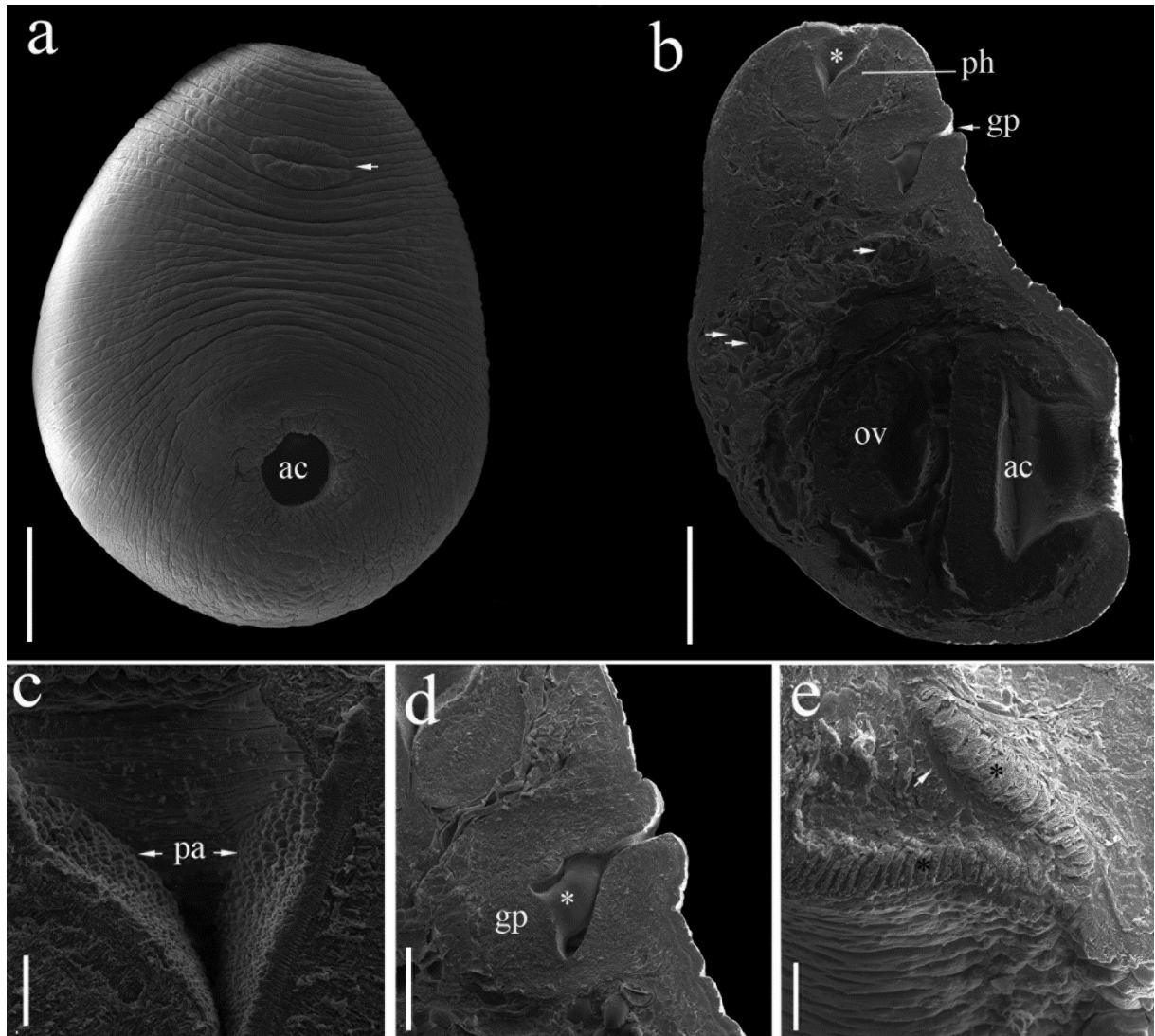
Genus *Cotylophoron* (Stiles & Goldberger 1910)

*Cotylophoron marajoensis* n. sp.

Description ([Figures 1, 2](#))



**Figure 1.** Morphology of *Cotylophoron marajoensis* n. sp.: (a) entire helminth, ventral view with oral sucker (os), pharynx (ph) of *Liorchis* type, intestinal cecum (ic), genital sucker (gs); ootype (ot), acetabulum (ac), ovary (ov), testicles (te) and vitellaria (vi); (b) pharynx of *Liorchis* type; (c) genital pore of *Cotylophoron* type; (d) acetabulum of *Cotylophoron* type. Scale-bars: **A** 200 µm, **B** 50 µm, **C** 100 µm, **D** 50 µm.



**Figure 2.** Scanning electron micrographs of *Cotylophoron marajoensis* n. sp.: (a) external morphology with genital pore (arrow) in the anterior portion of the helminth and acetabulum (ac) in the posterior portion of the helminth; (b) internal morphology with pharynx (ph) along with oral sucker (\*), genital papillae along with genital pore (gp), uterus in handles full of eggs (arrow), and ovary (ov) central, acetabulum (ac) in the posterior portion of the helminth; (c) detail of the pharynx's papillae (pa); (d) detail of the genital papillae (\*) around the genital pore (gp); (e) detail of the muscular bands from acetabulum (\*) and oblique muscular band (arrow). *Scale-bars:* A 500  $\mu$ m, B 500  $\mu$ m, C 50  $\mu$ m, D 200  $\mu$ m, E 50  $\mu$ m.

[Based on 10 adult specimens: metrical data in [Table 1](#)]. Pear-shaped, smooth body, slightly recurved in the ventral direction, measuring 6.30 (3.42-754)  $\times$  2.98 (2.62-3.42) mm, maximum width to the testis level. Oral sucker, adorned with innumerable ciliate papillae in the anterior extremity of the trematode. Pharynx with well-defined muscular portion and evidencing papillae of varied sizes in its mucosa, characteristic of pharynx of *Liorchis* genus, measuring 0.56 (0.43-0.65)  $\times$  0.63 (0.33-0.80) mm. Muscular oesophagus 0.58 (0.42-0.79)  $\times$  0.68 (0.15-0.45) mm, with muscular streaks in an uniformly thin layer, absent bulb. Caeca with undulations, finishing to the level of the anterior edge of the acetabulum. Acetabulum in the posterior fraction of the body, subterminal adorned with numerous ciliate papillae in a well-

developed concentric arrangement, demonstrating definite transversal muscular bands, as well as external oblique muscular band, characterizing it as a *Cotylophoron* acetabulum, measuring  $1.40 (0.74-1.77) \times 1.15 (0.43-1.67)$  mm. Genital sucker, located in the anterior fraction of the body, the genital papillae and sucker below the oral sucker, with conspicuous genital papilla, characteristic of *Cotylophoron*, measuring  $0.59 (0.43-0.78) \times 0.74 (0.46-1.66)$  mm. Oblique, lobe-segmented testes, smaller in relation to the ovary, located in the middle fraction of the body, anterior measuring  $0.38 (0.29-0.56) \times 0.39 (0.32-0.55)$ , posterior measuring  $0.36 (0.26-0.50) \times 0.42 (0.31-0.74)$  mm, Ovary located after the testes in the middle fraction of the body with  $0.76 (0.32-0.95) \times 0.49 (0.37-0.63)$  mm. Uterine loops packed with ascending eggs, located in the middle fraction, in the middle of the parasite. Mehlis' gland (Ootype) measuring  $0.46 (0.33-0.59) \times 0.38 (0.27-0.43)$  mm. Vitellogenic glands, situated in the lateral parts from the anterior fraction going until the posterior fraction, sometimes invade the intracaecal area. Eggs operculate  $0.130 (0.08-0.14) \times 0.05 (0.04-0.06)$  mm.

Excluding primers, 1712 base pairs were obtained for 18S SSU rRNA gene (Genbank accession number: SUB8164216 *Cotylophoron* MW024900). In comparison to *Cotylophoron cotylophorum* (JX678230) a BLAST search resulted in maximum score = 3068, query coverage = 95% and percent identity = 99.88%.

**Table 1.** Morphological and morphometric comparison of *Cotylophoron marajoensis* n. sp. collected from *Bubalus bubalis* commercialized in the state of Pará and compared with other authors.

Character	<i>Cotylophoron</i> spp.				
	<i>Cotylophoron marajoensis</i>	<i>C. cotylophorum</i>	<i>C. panamensis</i>	<i>C. macrosphinctris</i>	<i>C. xiangjiangense</i>
Host	<i>Bubalus bubalis</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Bos indicus</i>	<i>Syncerus caffer</i>	<i>Bubalus bubalis</i>
Locality	Brazil	Colombia	Colombia	Uganda	China
Author	-	(Fischöeder, 1901)	Price & McIntosh, 1953	Sey & Graber, 1979	Wang, 1979
Length	3.43–7.54	5.58–7.31	6.63–8.84	5.41–7.82	3.85–5.60
Width	2.63–3.43	2.01–2.19	2.31–3.25	2.30–3.05	1.93–3.05
Type of pharynx	<i>Liorchis</i>	<i>Calicophoron</i>	<i>Calicophoron</i>	<i>Calicophoron</i>	<i>Liorchis</i>
Pharynx, <sup>L</sup>	0.43–0.65	0.23–0.62	0.72–0.96	0.78–1.23	0.43–0.78
pharynx, <sup>W</sup>	0.33–0.80	0.43–0.73	0.64–0.86	0.57–1.03	0.56–0.78
Esophageal bulb	Absent	Present	Absent	Present	Present
Esophagus, <sup>L</sup>	0.42–0.79	0.70–0.80	0.42–0.86	1.15–1.52	-
Esophagus, <sup>W</sup>	0.15–0.45	0.20–0.30	0.18–0.28	-	-
Type of Ventosa Genital	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Schistocotyle</i>	<i>Cotylophoron</i>
Ventosa Genital, <sup>L</sup>	0.43–0.78	0.50–0.70	0.74–1.02	-	0.52–0.61
Ventosa Genital, <sup>W</sup>	0.46–1.66	0.30–0.60	0.58–0.98	-	0.52–0.64
Ovary, <sup>L</sup>	0.32–0.95	0.34–0.60	0.56–0.80	0.28–0.68	0.37–0.40
Ovary, <sup>W</sup>	0.37–0.63	0.46–0.80	0.54–0.92	0.76–0.96	-
Ootype, <sup>L</sup>	0.33–0.59	0.18–0.32	0.40–0.70	0.57–0.66	-
Ootype, <sup>W</sup>	0.27–0.43	0.20–0.40	0.44–0.98	0.50–0.55	-
Anterior testis, <sup>L</sup>	0.29–0.56	1.24–2.24	0.70–1.43	0.41–1.82	-
Anterior testis, <sup>W</sup>	0.32–0.55	2.55–1.38	1.63–2.63	1.23–1.62	-
Posterior testis, <sup>L</sup>	0.26–0.50	1.30–2.34	0.94–1.75	0.52–1.85	-
Posterior testis, <sup>W</sup>	0.31–0.74	1.74–2.55	0.94–2.27	1.10–1.92	-
Type of Acetabulum	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Paramphistomum</i>
Acetabulum, <sup>L</sup>	0.74–1.77	1.10–1.60	1.37–2.25	-	1.23–1.72
Acetabulum, <sup>W</sup>	0.43–1.67	1.35–1.80	1.22–1.87	-	1.23–1.58
Egg, <sup>L</sup>	0.08–0.14	0.102–0.108	0.057–0.083	0.100–0.151	0.115–0.040
Egg, <sup>W</sup>	0.04–0.06	0.062–0.070	0.057–0.083	0.063–0.073	0.063–0.080
References	From this study	Alarcón, 2009	López & Velásquez, 2012	Eduardo, 1985	Eduardo, 1985



Character	<i>Cotylophoron</i> spp.				
	<i>Cotylophoron marajoensis</i>	<i>C. jacksoni</i>	<i>C. fuelleborni</i>	<i>C. bareilliensi</i>	<i>C. travassosi</i>
Host	<i>Bubalus bubalis</i>	<i>Bos indicus</i>	<i>Bos indicus</i> and <i>Capra hircus</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Bos indicus</i>
Locality	Brazil	Brazil	Brazil	Brazil	Brazil
Author	-	Nasmark, 1937	Nasmark, 1937	Mukherjee & Chauhan, 1965	(Costa & Guimarães, 1992)
Length	3.43–7.54	6.04–7.50	5.10–6.22	5.26–7.38	4.70–5.51
Width	2.63–3.43	2.13–3.14	1.90–2.43	1.90–2.43	2.67–3.30
Type of pharynx	<i>Liorchis</i>	<i>Calicophoron</i>	<i>Calicophoron</i>	<i>Calicophoron</i>	<i>Calicophoron</i>
Pharynx, <sup>L</sup>	0.43–0.65	0.76–1.56	0.49–0.69	0.64–1.02	0.57–0.74
pharynx, <sup>W</sup>	0.33–0.80	0.76–0.96	0.61–0.69	0.63–0.91	0.77–0.88
Esophageal bulb	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Esophagus, <sup>L</sup>	0.42–0.79	0.40–0.70	0.47–0.66	0.25–0.30	0.40–0.72
Esophagus, <sup>W</sup>	0.15–0.45	0.24–0.34	0.18–0.23	0.17–0.31	0.27–0.36
Type of Ventosa Genital	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>
Ventosa Genital, <sup>L</sup>	0.43–0.78	0.27–0.39	0.46–0.69	0.24–0.38	0.60–0.93
Ventosa Genital, <sup>W</sup>	0.46–1.66	-	0.49–0.62	-	0.75–0.92
Ovary, <sup>L</sup>	0.32–0.95	0.70–0.93	0.33–0.47	0.61–0.86	0.73–1.05
Ovary, <sup>W</sup>	0.37–0.63	0.56–0.79	0.36–0.52	0.49–0.88	0.88–1.14
Ootype, <sup>L</sup>	0.33–0.59	0.44–0.64	0.19–0.47	0.44–0.58	0.40–0.64
Ootype, <sup>W</sup>	0.27–0.43	0.40–0.78	0.23–0.52	0.47–0.72	0.51–0.76
Anterior testis, <sup>L</sup>	0.29–0.56	0.46–1.00	0.64–0.77	0.32–0.51	0.48–0.59
Anterior testis, <sup>W</sup>	0.32–0.55	0.70–1.08	0.61–0.84	0.45–0.71	0.64–0.90
Posterior testis, <sup>L</sup>	0.26–0.50	0.48–1.18	0.53–0.81	0.33–0.53	0.35–0.63
Posterior testis, <sup>W</sup>	0.31–0.74	0.54–1.22	0.56–0.87	0.51–0.76	0.73–0.94
Type of Acetabulum	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>	<i>Cotylophoron</i>
Acetabulum, <sup>L</sup>	0.74–1.77	1.39–1.90	1.18–1.36	1.39–1.84	1.29–1.53
Acetabulum, <sup>W</sup>	0.43–1.67	1.17–1.88	1.16–1.33	1.42–1.93	1.70–1.90
Egg, <sup>L</sup>	0.08–0.14	0.120–0.140	0.130–0.150	0.130–0.161	0.120–0.150
Egg, <sup>W</sup>	0.04–0.06	0.070–0.080	0.060–0.070	0.061–0.081	0.060–0.080
References	From this study	Miranda & Costa, 1999	Miranda & Costa, 1999	Miranda & Costa, 1999	Miranda & costa, 1999

Abbreviations: L= length, W= width.

## Taxonomy Summary:

*Cotylophoron marajoensis* n. sp.

**Type-host:** *Bubalus bubalis* (Linnaeus 1758). Common name: Water Buffalo

**Site of infection:** rumen and reticulum.

**Location type:** Soure (00°4'00"S, 48°31'24"W), Breves (01°40'56"S, 50°28'49"W) and Cachoeira do Arari (01° 00' 41" S, 48° 57' 48" W), Marajó Island, Pará, Brazil.

**Prevalence:** 4.54% (5 infected hosts of 110 analyzed).

ZooBank registration: SUB8164216 *Cotylophoron* MW024900

**Etymology:** The specific name *marajoensis* refers to the geographical region of the distribution (i.e., Marajó Island, state of Pará, Amazon, Brazil).

Deposit of Specimens: Holotype MPE 000261 and paratype MPEG 00262 a 00265, were deposited in an invertebrate collection at Museu Paranse Emílio Goeldi (MPEG), Belém, Pará, Brazil.

## Discussion

### Morphological delimitation

The characteristics presented for the taxon studied here such as pear-shaped body, smooth turgent without papillae, oral sucker in the anterior extremity of the body, genital sucker with

genital papilla in the anterior fraction of the body and sub-ventral acetabulum of average size, fit it into the *Cotylophoron* genus in accordance with the keys and descriptions of the genus (Eduardo, 1985). The morphologic characteristics of *Cotylophoron*, in the present work, are similar to those of the of genus *Paramphistomum* (Fischoeder 1901) and genus *Balanorchis* (Fischoeder 1901), but they are distinguished mainly in relation to the *Paramphistomum* because of the presence of genital papilla and, in relation to the *Balanorchis*, because of the absence of long papillae in the oral sucker (Jones et al., 2005).

*Cotylophoron marajoensis* n. sp. differs from *C. cotylophorum* in possessing a *Liorchis* pharynx, whereas in *C. cotylophorum* it is *Calicophoron*; still, absence of esophageal bulb in *C. cotylophorum*. Oblique and smaller testes in relation to the ovary presented by *Cotylophoron marajoensis* n. sp. distinguish it from *C. cotylophorum*, which presents larger in tandem testes in relation to the ovary (Alarcón & Velásquez, 2009). Associated to these morphologic characteristics, *C. cotylophorum* has not been found in *B. bubalis* until now, nor in Brazilian territory.

In Brazil, *C. fulleborni* e *C. jacksoni* had been only described in *Bos indicus* e *Capra hircus* (Miranda & Costa, 1999), without occurrence in *B. bubalis*. These species differ from *Cotylophoron marajoensis* n. sp. in possessing *Calicophoron* pharynx and larger testes in relation to the ovary (Morales et al., 2015). Around the world, *C. panamensis* has been described only in *Bos indicus*. It is shorter in length than *Cotylophoron marajoensis* n. sp., although larger in width. It possesses *Calicophoron* pharynx and, differently from *Cotylophoron marajoensis* n. sp. (whose testes are oblique and smaller than the ovary), it possesses horizontally parallel and larger testes in relation to the ovary, with its vitellarium exceeding the edge of the caeca, also differing from *Cotylophoron marajoensis* n. sp. because these do not exceed the caecal edges (Martínez & Velásquez, 2012).

The species *Cotylophoron bareilliense* occurs in *B. bubalis* in the Phillipines. In Brazil, however, it is mentioned only as parasitizing *Bos indicus*, *Capra hircus* and *Ovis aries* (Miranda & Costa, 1999). Moreover, it is longer in length than *Cotylophoron marajoensis* n. sp., and it possesses a *Calicophoron* pharynx (Eduardo, 1985), differing from the *Liorchis* pharynx of the new species here being described.

*Cotylophoron macrosphinctris* is parasitic on buffalo, but of the species *Syncerus caffer*, the African buffalo; it has not been described in *B. bubalis*, nor in the Brazilian territory it is differentiated from the *Cotylophoron marajoensis* n. sp. by its *Calicophoron* pharynx, larger esophageal bulb and testicles in relation to the ovary. Furthermore, it possesses a *Schistocotyle*

genital sucker, whereas *Cotylophoron marajoensis* n. sp. possesses a *Cotylophoron* genital sucker (Eduardo, 1985).

Besides having *B. bubalis* as host and the same type of pharynx (*Liorchis*) of the *C. xiangjiangense* species, *Cotylophoron marajoensis* n. sp. differs by the description of its biome, found in Amazon, while for *C. xiangjiangense* has only been described as occurring in China. In addition, *Cotylophoron marajoensis* n. sp. is longer in length and it does not possess an esophageal bulb, which present in the *C. xiangjiangense*. To strengthen this difference, the testis of *Cotylophoron marajoensis* n. sp. has a lobe format, whereas *C. xiangjiangense* possesses an oval testis format (Eduardo, 1985).

The *Cotylophoron travassosi* species has not been described in *B. bubalis* up until now, being found, in Brazil, only in *Bos indicus*, *Capra hircus* and *Ovis aries*. It is shorter in length than *Cotylophoron marajoensis* n. sp., and it possesses a *Paramphistomum* pharynx (Miranda & Costa, 1999). Additional morphometric comparisons between *Cotylophoron marajoensis* n. sp. and the other species of the genus *Cotylophoron* are presented in [Table 1](#).

When analyzed by the SEM, the external morphology of *Cotylophoron marajoensis* n. sp. disclosed a smooth body, presence of genital papilla, oral sucker and acetabulum, these structures being common to the *Cotylophoron* (Miranda & Costa, 1999). The internal morphology visualized by SEM has supplied data that have guaranteed diagnosis of the species, disclosing more details about the structures for type of pharynx and acetabulum.

## **Conclusion**

In view of the above, the morphological evidence presented here for the new species falls within the genus *Cotylophoron* and the absence of all its valid species. Thus, we have added a species to this genus, named *Cotylophoron marajoensis* n. sp. Additionally we present its partial 18S small subunit ribosomal rRNA gene sequence which may contribute to future phylogenetics studies.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

The authors are grateful the Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – ISPA – UFRA, Pará, Brazil for the use of the scanning electron microscope. This study is part of the Ph.D. of Vanessa Silva do Amaral, developed for the Programa de Pós-Graduação Saúde e Produção Animal na Amazônia (PPGSPAA), Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – BRASIL) – Finance Code 001 and Project Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade (Edital N° 047/ 2012 – Ministério da Educação do Brasil). Raul Henrique da Silva Pinheiro was supported by a

research fellowship from the “Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento (PPGSND), Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA/ CAPES/ BRASIL) – Finance Code 001”.

## References

- Alarcón EP, Velásquez LE. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (Digenea: Paramphistomidae) hallado en bovinos de Rio Negro, Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009; 22(2): 168-177.
- Costa HMA, Guimarães MP. *Cotylophoron bareilliense* Mukherjee e Chauhan, 1965 (Trematoda-Paramphistomidae). *Arq Bras Med Vet Zootec* 1990; 42(1): 183-186.
- Costa HMA, Guimarães MP. *Cotylophoron travassosi* sp. n. (Trematoda-Paramphistomidae) from cattle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87(Suppl. 1): 69-72. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761992000500013>. PMID:1343800.
- Damasceno FA, Viana JM, Tinôco IFF, Gomes RCC, Schiassi L. Adaptação de bubalinos ao ambiente tropical. *Rev Eletrônica Nutritime* 2010; 7(5): 1370-1381.
- Eduardo SL. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. V. Revision of the genus *Cotylophoron* Stiles & Goldberger, 1910. *Syst Parasitol* 1985; 7(1): 3-26. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00010157>.
- Forlano MD, Henríquez HR, Meléndez RD. Incidencia y prevalencia de *Cotylophoron* spp. (Trematoda: Digenea) en bovinos del Asentamiento Campesino” Las Majaguas”. Portuguesa-Venezuela 1996-1997. *Gaceta Cienc Vet* 2001; 7(1): 15-23.
- Giese EG, Silva MVO, Videira MN, Furtado AP, Matos ER, Gonçalves EC, et al. *Rohdella amazonica* n. sp. (Aspidogastrea: Aspidogastridae) from the Amazonian banded puffer fish *Colomesus psittacus* (Bloch & Schneider, 1801). *J Helminthol* 2015; 89(3): 288-293. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X14000054>. PMID:24572176.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-98.
- Jones A, Bray RA, Gibson DI. *Keys to the Trematoda*. 1st ed. London: CABI Publishing and The Natural History Museum; 2005. (vol. 2). <http://dx.doi.org/10.1079/9780851995878.0000>.
- Marques JRF. *Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Belém: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; 2000.
- Martínez JL, Velásquez LET. *Cotylophoron panamensis* (Digenea: Paramphistomidae) en bovinos del Meta y del Guaviare, Colombia. *Acta Biol Colomb* 2012; 17(2): 419-428.
- Miranda MA, Costa HMA. Report and redescription of some species of *Cotylophoron* (Trematoda: Paramphistomidae) in domestic ruminants of Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 1999; 8(1): 1-15. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01802003>.
- Morales G, Pino LA, Moreno L. *Cotylophoron fulleborni* Nasmak, 1937 (Trematoda: Paramphistomidae). Primer Reporte Para Venezuela. *ACI Av Cienc Ing* 2015; 7(2): 20-23. <http://dx.doi.org/10.18272/aci.v7i2.253>.
- Pérez-Ponce de León G, Hernández-Mena D. 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. *J Helminthol* 2019; 93(3): 260-276. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X19000191>. PMID:30973318.
- Sánchez P, Tantalean VM, Chávez A, Soto AO. Presencia de *Cotylophoron cotylophorum* (Trematoda, Paramphistomidae) en bovinos de Loreto, Perú. *Rev Peru Biol* 2009; 16(1): 141-142.

**3 PROPOSTA DE MANUSCRITO – COMUNICAÇÃO BREVE (PERIÓDICO BIOTEMAS)**

***COTYLOPHORON*. SP. (DIGENEA: PARAMPHISTOMIDAE) PARASITO DE BOVÍDEOS (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e *Bubalus bubalis*) ORIUNDOS DO MUNICÍPIO DE CASTANHAL, PARÁ**

**Vanessa Silva do Amaral <sup>1,2</sup>**

**Diego Ferreira de Sousa <sup>1</sup>**

**Rogério Antônio Ribeiro Rodrigues <sup>1</sup>**

**Elane Guerreiro Giese <sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Histologia e Embriologia Animal, Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia –

UFRA, Belém, PA, Brasil

\* Autor para correspondência

lheaufra@gmail.com

Submetido em...

Aceito para publicação em...

***COTYLOPHORON* SP. (DIGENEA: PARAMPHISTOMIDAE) PARASITO DE BOVÍDEOS (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e *Bubalus bubalis*) ORIUNDOS DO MUNICÍPIO DE CASTANHAL, PARÁ**

**Resumo**

O parasitismo por trematódeos da família Paramphistomidae tem sido um dos grandes problemas em rebanho de bovídeos, tendo em vista que há uma grande prevalência desses parasitos encontradas no rúmen e retículo desses hospedeiros quando em fase adulta. Esses endoparasitas provocam alguns distúrbios no trato gastrointestinal e isso tem como consequência o emagrecimento do animal bem como perdas econômicas aos criadores. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a ocorrência de trematódeos em bovídeos oriundos do município de Castanhal, no estado do Pará.

**Palavras-chave:** *Cotylophoron*; Helminologia; Microscopia

***COTYLOPHORON* SP. (DIGENEA: PARAMPHISTOMIDAE) A PARASITE OF CATTLE (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e *Bubalus bubalis*) ON CASTANHAL, Pará**

**Abstract**

Paramphistomidae family has been one of the major problems in cattle, considering that there is a high prevalence of these parasites found in the rumen and reticulum of these hosts when they are adults. These endoparasites cause some disorders in the gastrointestinal tract and this results in the weight loss of the animal as well as economic losses. The objective of this work was to investigate the occurrence of trematodes in bovines from the municipality of Castanhal, in the state of Pará.

**Key words:** *Cotylophorom*; Helminthology; Microscopy

**Título resumido: *COTYLOPHORON* SP. EM CASTANHAL, PARÁ**

**Introdução**

O município de Castanhal é um dos mais populosos do Estado do Pará. Está localizado a 68 Km da capital Belém é uma região com grande destaque para a bovinocultura. No entanto, o parasitismo por trematódeos da família Paramphistomidae tem grande importância e impacto econômico e na saúde do rebanho uma vez que há uma grande prevalência desses parasitos

encontradas no rúmen e retículo desses hospedeiros quando em fase adulta (MATTOS JR., 1989).

A família Paramphistomidae é constituída por trematódeos de ampla distribuição mundial, sendo relatada sua maior ocorrência em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil ocorrem em todas as regiões do país. As formas adultas podem ser encontradas em rúmen e retículo de ruminantes, e são consideradas apatogênicas. As formas imaturas ocorrem no intestino delgado e são responsáveis pela paramphistomatose (DUTRA, 2010).

Esses endoparasitas provocam danos no trato gastrointestinal dos hospedeiros, causando distúrbios como diarreia e emagrecimento do animal e, conseqüentemente, perda econômica aos criadores. O desenvolvimento desses helmintos ocorre no trato digestório do hospedeiro definitivo quando este ingere metacercárias encistadas no pasto. No rúmen e retículo a presença do parasito é tolerada não ocorrendo sinais clínicos significativos, apenas ocorre a atrofia de papilas. Em contrapartida, a forma larval é responsável pelos efeitos patogênicos (TAYLOR et al, 2007).

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a ocorrência de trematódeos em bovídeos oriundos de Castanhal-Pará uma vez que a ocorrência destes parasitos pode trazer grandes perdas econômicas bem como acarretar danos para a saúde do hospedeiro.

## **Material e Métodos**

As coletas dos helmintos foram realizadas de maneira aleatória após abate de bovinos no Abatedouro Frigorífico do Tapanã (SOCIPE) em Belém-PA em dezembro de 2017. Foram examinados rumens e retículos de 52 animais abatidos sendo 50 bovinos e dois bubalinos.

Os parasitos encontrados foram mantidos em solução salina tampão, sendo os espécimes a serem utilizados para estudos morfológicos, fixados com solução A.F.A. (ácido acético glacial a 2%, formaldeído a 3% e 95% de etanol 70% GL) durante 24 horas de acordo com técnicas rotineiras de processamento. Já para análise genética, os helmintos foram fixados em álcool absoluto. Dados referentes ao hospedeiro, assim como número de nematódeos encontrados e a localização destes no hospedeiro, foram registrados em uma ficha de colheita apropriada para o laboratório.

### **1.2.2 Microscopia de luz**

Para análise em microscopia de luz os helmintos foram comprimidos, lavados em álcool 70% por 5 minutos, corados em Carmim alcóolico por duas horas, lavados novamente em álcool

70% por 5 minutos, sendo depois clarificados em Álcool ácido (álcool absoluto - 70 ml, ácido clorídrico - 30 ml) por tempo variado, desidratados em uma série alcoólica (70%, 80%, 90%, ABS 1, ABS 2) em torno de 10 minutos cada e diferenciados em Salicilato de Metila por tempo variado. As lâminas histológicas foram analisadas e fotografadas com o auxílio de fotomicroscópio LEICA E – 400 no Laboratório de Histologia e Embriologia Animal (LHEA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

### 1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Para microscopia eletrônica de varredura os helmintos foram fixados em A.F.A. e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% por 2 horas, desidratado em série de etanoica por 1 hora em cada banho, secos ao ponto crítico de CO<sub>2</sub>, montados em suportes (*stubs*) e metalizados com ouro-paládio. Depois da preparação, os *stubs* foram mantidos em dessecador para análise posterior ao Microscopia Eletrônico de Varredura (MEV). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, sediado na UFRA.

## Resultados

Dentre os 52 animais, 10 (19,23%) bovinos estavam parasitados. Os helmintos encontrados nos 10 hospedeiros foram analisados na microscopia de luz, exemplares coletados dos dez hospedeiros. foi possível observar ao corte lateral, algumas estruturas dos helmintos como ovário, oótipo, útero com ovos, ventosa genital bem desenvolvida localizada ventralmente, testículos em oposição. Na região anterior verificou-se a presença papilas no entorno da ventosa oral, bem como a exposição do cirro e a presença de ovo, na ventosa genital. Tais estruturas são características do gênero *Cotylophoron*.

As características observadas assemelham-se ao do gênero *Cotylophoron*. O gênero *Cotylophoron*, pertencente à família Paramphistomidae engloba algumas espécies já descritas na literatura. São elas: *C. cotylophorum*, *C. panamensis*, *C. macrosphinctris*, *C. xiangjiangense*, *C. jacksoni*, *C. fuelleborni*, *C. bareilliensi*, *C. travassosi* e *C. marajoensis*. Para fazer a diferenciação entre as espécies é necessário fazer análise de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e análise molecular (AMARAL et al., 2020).

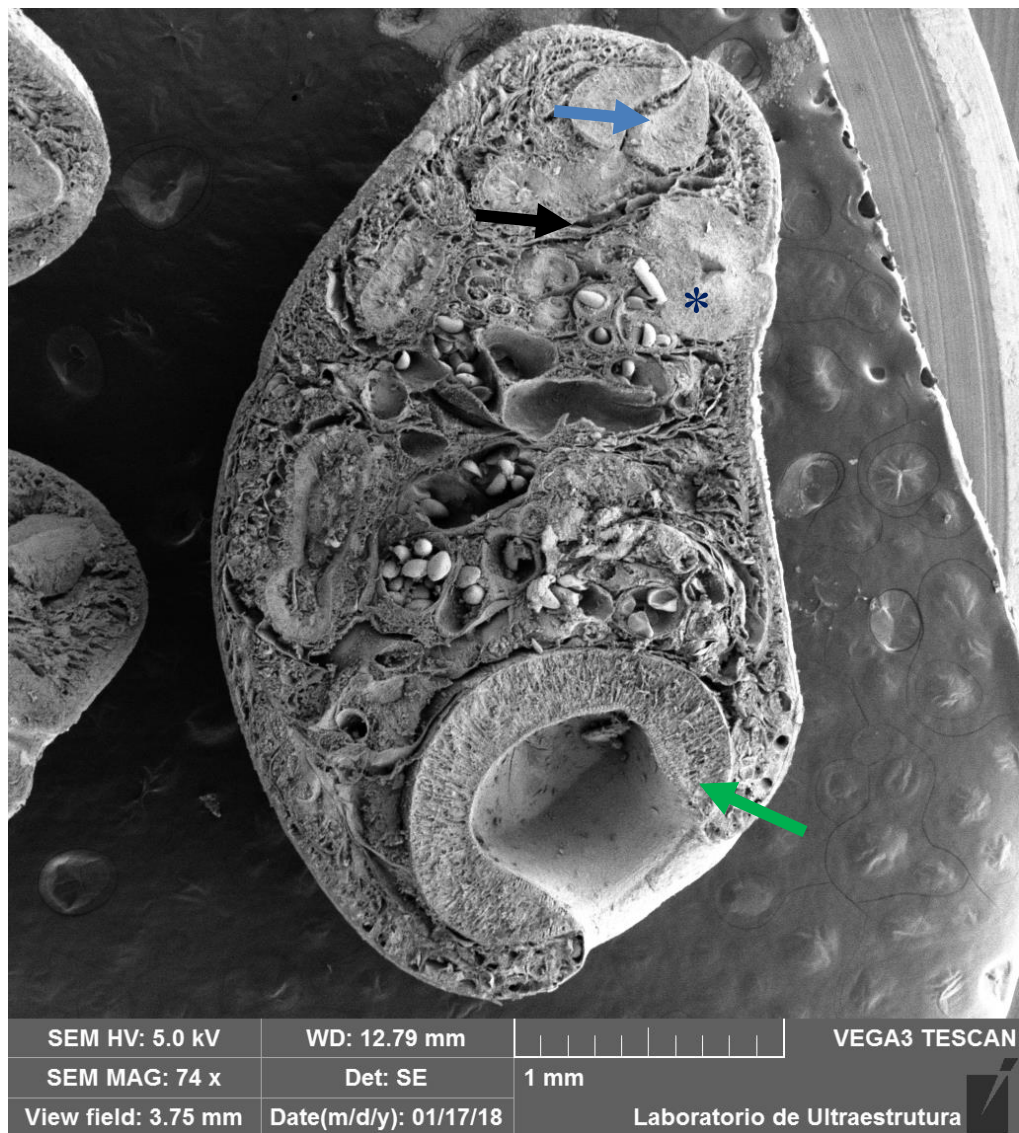
Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível observar, ao corte lateral, algumas estruturas dos helmintos como ovário, oótipo, útero com ovos, ventosa genital bem



desenvolvida localizada ventralmente, testículos *in tandem* (Figura 1). Na região anterior verificou-se a presença papilas no entorno da ventosa oral, bem como a exposição do cirro e a presença de ovo, na ventosa genital. As características observadas assemelham-se ao do gênero *Cotylophoron*.

As características encontradas nos helmintos coletados em bovídeos oriundos do município de Castanhal assemelham-se com o gênero *Cotylophoron* por apresentar características morfológicas inerentes a estes tais como corpo em forma de pera, tegumento liso e sem papilas; ventosa oral na extremidade anterior do corpo; ventosa genital com papila genital na porção anterior e acetábulo de tamanho médio para o gênero de acordo com as chaves de descrições do gênero propostas por Eduardo (1985).

Figura 1: Eletromicrografia do Trematoda do gênero *Cotylophoron*



Na figura 1 é possível observar o acetábulo (seta verde) bem delimitado bem como a presença

de ovos no útero. É possível observar, ainda, a faringe (seta azul) evidenciando a camada muscular do esôfago (seta preta). Além disto, ventosa genital com presença de ovos (\*).

### Comentários

A constatação da presença de parasitos do gênero *Cotylophoron* em bovídeos provenientes do município de Castanhal no presente trabalho amplia a área de ocorrência da família Paramphistomidae na região amazônica tendo em vista que há relatos do gênero ocorrendo em vários hospedeiros e em diferentes países e, inclusive, tendo sido relatada uma nova espécie ocorrendo no arquipélago do Marajó (AMARAL et. Al., 2020).

Atualmente o gênero *Cotylophoron* constitui nove espécies *C. cotylophorum*, *C. panamensis*, *C. macrosphinctris*, *C. xiangjiangense*, *C. jacksoni*, *C. fuelleborni*, *C. bareilliensi*, *C. travassosi* e *C. marajoensis* de ampla distribuição mundial e com características que as diferem entre si sendo as principais o tipo de faringe, o tamanho dos testículos e ovários, se há a presença do bulbo esofágico, o tipo de acetábulo dentre outros dados morfométricos que permitem, com o auxílio da biologia molecular chegar à espécie do helminto estudado.

### Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia (PPGSPAA), Instituto Saúde e Produção Animal (ISPA) e Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). Ao Projeto Pró-Amazônia Biodiversidade e Sustentabilidade pelos recursos bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por terem financiado o trabalho de doutorado.

### Referências

AMARAL, V. S.; SOUSA, D. F.; BENIGNO, R. N. M.; PINHEIRO, R. H. S., GONÇALVES, E. C.; GIESE, E. G. *Cotylophoron marajoensis* n. sp. (Digenea: Paramphistomidae) a parasite of *Bubalus bubalis* on Marajó Island, Pará, Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 4, 2020.

DUTRA, F. Paramphistomiasis aguda em novillitosa. **Archivo Veterinario del Este**, v. 7, p. 1-2. 2010.

EDUARDO, S. L. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with

special reference to the morphology of species occurring in ruminants. V. Revision of the genus *Cotylophoron* Stiles & Goldberger, 1910. **Systematic Parasitology**, v. 7, n. 1, p. 3-26, 1985.

MATTOS, Jr. Prevalência de *Paramphistomum* de bovinos (*Bos tauros*), no município de Oriximiná – Pará. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 11, Rio de Janeiro, 1989, **Resumos...**, Rio de Janeiro, p. 17. 1989.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary Parasitology**. 3ªed. Blacwell, Oxford. 874p. 2007.

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho mostra a importância de estudar a ocorrência de trematódeos da família Paramphistomidae, mais especificamente do gênero *Cotylophoron* em bovídeos oriundos de alguns municípios do estado do Pará;

O gênero é descrito em diferentes localidades, tendo ampla ocorrência, no entanto, ainda há uma carência de maiores estudos na região norte do Brasil tendo em vista o grande número de rebanhos e os possíveis impactos econômicos que estes helmintos podem acarretar;

Neste trabalho houve a descrição de uma nova espécie do gênero *Cotylophoron* a partir de análise de microscopia de luz com análises morfométricas, microscopia eletrônica de varredura e biologia molecular;

A nova espécie, *Cotylophoron marajoensis*, foi identificada e descrita neste trabalho bem como cadastrada no ZooBank: SUB8164216 *Cotylophoron* MW024900 e depositada na coleção de invertebrados no Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) com o holótipo MPE 000261 e paratipo MPEG 00262 a 00265.

## ANEXO I

### NORMAS PARA MANUSCRITO (COMUNICAÇÃO BREVE) DO PERIÓDICO BIOTEMAS – B4 MEDICINA VETERINÁRIA

#### Título do manuscrito

**João da Silva** <sup>1\*</sup>  
**José Carlos Pereira** <sup>2</sup>  
**Ana Maria Bragança** <sup>1</sup>  
**Roberta Carvalho** <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Endereço completo, por incluir o autor para correspondência, com instituição, endereço postal, cidade – UF, país: Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, CEP 88040-960, Florianópolis – SC, Brasil

<sup>2</sup> Endereço resumido, com instituição, cidade – UF, país: Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil

\* Autor para correspondência  
autor@email.com

Submetido em...  
Aceito para publicação em...

#### Título do manuscrito

#### Resumo

O resumo deve conter no máximo 200 palavras e cobrir todas as seções do artigo. Se o manuscrito for submetido em inglês, o título em português deverá ser colocado no início do resumo negrito.

**Palavras-chave:** Em ordem alfabética; Máximo de cinco; Primeira letra maiúscula; Separadas por ponto-e-vírgula; Termos não contidos no título

#### Abstract

**English title.** The abstract should have up to 200 words and cover all sections of the article. Se o manuscrito for submetido em inglês, não colocar o título em inglês no início do abstract.

**Key words:** First word capitalized; Five at maximum; Following alphabetic order; Separated by point-and-comma; Terms not contained in the title

**Título resumido: Com até 60 caracteres, incluindo espaços**

#### Introdução

O texto deve ser escrito em fonte Times New Roman, tamanho 12, com alinhamento

justificado e espaçamento de 1,5 linhas. Este arquivo possui a formatação correta e pode ser usado como base para a escrita do texto.

Quando as referências forem citadas dentro de parênteses, elas devem ser escritas em maiúsculas, os autores e referências separados por ponto-e-vírgula (ANDRADE; SILVA, 1945). A ordem cronológica deve ser respeitada (PEREIRA, 1987; OLIVEIRA, 1992; SMITH; JOHNSON, 2005). Quando houver dois artigos do(s) mesmo(s) autor(es) ou com o mesmo sobrenome, colocá-los em sequência (ROBERTS et al., 2001; 2010; SILVEIRA, 2005; 2006).

### Material e Métodos

Ao longo de todo o texto, as unidades devem ser separadas dos números, com exceção dos graus e do símbolo de percentagem, como no exemplo a seguir.

A altitude é de 200 m, a pluviosidade foi de 24 mm, a velocidade foi de 10 km.h<sup>-1</sup>, o volume foi de 10 mL, porém a temperatura foi de 37°C e a percentagem de 76%.

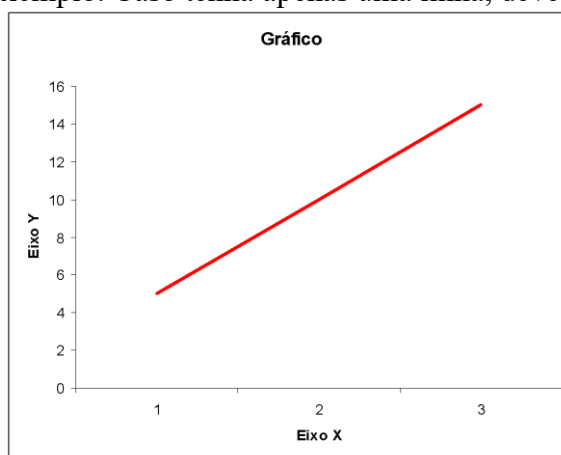
### Subseções

Quando houver subseções, separá-las como as seções, com o nome em negrito, alinhado à esquerda. Subseções podem ser criadas e nomeadas pelos autores conforme acharem adequado para organizar o texto, como Área de estudo, Procedimentos de campo/laboratório, Análises.

### Resultados

Tanto Tabelas quanto Figuras devem ter títulos formatados da mesma maneira, acima das mesmas e numeradas com algarismos arábicos. Suas citações ao longo do texto devem ser grafadas sempre com as iniciais maiúsculas, não importando se dentro ou fora de parênteses (Figura 1; Tabela 1).

FIGURA 1: Exemplo de Figura para a revista Biotemas. Se o título tiver mais de uma linha, deve ser justificado e com recuo, como neste exemplo. Caso tenha apenas uma linha, deve ser centralizado.



Não separar as Figuras e Tabelas de seu título e legenda, colocando-as no melhor local possível após terem sido citadas pela primeira vez, e centralizadas no documento. Quando for o caso, os autores podem “puxar” um parágrafo que seria colocado após a Figura ou a Tabela, para que não fiquem grandes espaços em branco separando os parágrafos. Em caso de espaços menores, apenas pular algumas linhas a mais é suficiente.

As Figuras devem ser colocadas no texto de modo a permitirem seu deslocamento sem perda de formatação. A fonte utilizada nas Tabelas pode ser de tamanho diferente, caso necessário para adequá-la ao tamanho da página. O espaçamento entre as linhas das Tabelas deve ser simples.

TABELA 1: Exemplo de Tabela para a revista Biotemas. Se o título tiver mais de uma linha, deve ser justificado e com recuo, como neste exemplo. Caso tenha apenas uma linha, deve ser centralizado.

Variável*	Amostra 1	Amostra 2
-----------	-----------	-----------

Variável 1	45 ± 2 g	90 ± 4 g
Variável 2	100 ± 10°C	200 ± 20°C

\* Coloque nas notas de rodapé informações adicionais necessárias à compreensão da tabela, que não constam na legenda.

### Discussão

Estas regras de formatação permitem que a revista mantenha um padrão em seus artigos, tanto ao serem enviados aos autores, quanto quando formatados para a publicação do pdf. Artigos fora do formato da revista serão rejeitados de imediato.

As comunicações breves seguem as mesmas regras, com a diferença de que o corpo do texto não precisa ser dividido em seções e subseções. Ou seja, não precisam ter Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão separados. As outras seções devem ser mantidas.

### Agradecimentos

Os agradecimentos são opcionais e serão removidos na versão a ser enviada aos avaliadores, para manter o anonimato dos autores.

### Referências

- ANDRADE, U. P.; SILVA, L. H. C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco. **Interciência**, Caracas, v. 2, n. 28, p. 336-346, 1995.
- MILLIKEN, W.; MILLER, R. P.; POLLARD, S. R.; WANDELLI, E. V. I. **Ethnobotany of the Waimiri atroari indians**. London: Royal Botanic Gardens Kew, 1992. 146 p.
- OLIVEIRA, L. Genetic basis of mental retardation. In: JONES, B. C.; MORMÈDE, P. (Eds). **Neurobehavioral Genetics – Methods and applications**. 2 ed. New York: CRC Press, 1992. p. 275-290.
- PEREIRA, P. E. P. **Uso de biomarcadores de estresse oxidativo no berbigão *Anomalocardia brasiliana* (GMELIN, 1971): uma avaliação de poluição aquática em dois sítios em Florianópolis - Santa Catarina – Brasil**. 1987. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1987.
- ROBERTS, A. M. S.; BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; BOZZI, A.; GÓES, A. M.; SERAKIDES, R. Anomalias da Triiodotironina (T7) na diferenciação cladogênicas de células da medula óssea de cobaias. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 69, 2010, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: SBPC, 2008. Versão eletrônica.
- ROBERTS, J. F.; BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; BOZZI, A.; GÓES, A. M.; SERAKIDES, R. Efeito dose-dependente da Triiodotironina (T3) na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 60, 2001, Campinas. **Resumos...** Campinas: SBPC, 2001. p. 254-279.
- SILVEIRA, R. **Invertebrate anatomy – *Daphnia magna***. 2005. Disponível em <<http://www.science.lander.edu/refox/daphnia.html>>. Acesso em: 22 maio 2009.