

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE ANIMAL

Jéssyca Bressan Schwantes

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE
FASCIOLA HEPATICA (LINNAEUS, 1758): O PAPEL DOS
HOSPEDEIROS DEFINITIVOS**

Santa Maria, RS

Jéssyca Bressan Schwantes

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *FASCIOLA*
HEPÁTICA (LINNAEUS, 1758): O PAPEL DOS HOSPEDEIROS DEFINITIVOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, área de concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Schwantes, Jéssyca Bressan
DIVERSIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA DE FASCIOLA
HEPÁTICA (LINNAEUS, 1758): O PAPEL DOS HOSPEDEIROS
DEFINITIVOS / Jéssyca Bressan Schwantes.- 2020.
94 p.; 30 cm

Orientador: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2020

1. Parasito 2. Diversidade genética 3. Brasil I.
Sganzerla Graichen, Daniel Ângelo II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

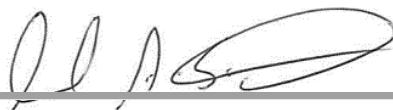
Declaro, JÉSSYCA BRESSAN SCHWANTES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Jéssyca Bressan Schwantes

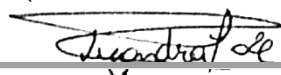
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *FASCIOLA HEPATICA* (LINNAEUS, 1758): O PAPEL DOS HOSPEDEIROS DEFINITIVOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, área de concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

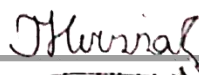
Aprovada em 21 de fevereiro de 2020



Daniel Ângelo Sganzerla Graichen, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Lizandra Jaqueline Robe, Dra (UFSM)
(Examinadora)



Thirssa Helena Grando (IFF/FW)
(Examinadora)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

A todos os grupos de fomento que financiaram esse estudo, PPGBA, CAPES e FAPERGS. Além é claro, da mais importante, a Fundação Graichen.

Ao meu Orientador, professor Daniel, meu querido professor, não há como lhe agradecer pelo amparo ao longo desses 5 longos anos de trabalho, hoje colhemos os frutos de muita dedicação, conversas e por muitas vezes decepções que passamos juntos, que a nossa parceria acadêmica seja pra vida toda. A sua paciência, humor, carinho e cuidado com todos ao seu redor, mostra o grande homem que o senhor é, e com certeza fez com que esse mestrado, que iniciou muito antes desses dois últimos anos, terminasse com essa reciprocidade que temos. Tu és o cara, me espelho em ti sempre!

Mari, minha grande mentora, a camisa 7, tenho um orgulho tão grande por ter convivido com essa mulher forte, inteligente e cientista. Tu me ensinaste de forma as vezes dolorosas, o quanto a vida de laboratório deve ser séria, e o quanto a pesquisa é importante e mais ainda, o valor da mulher na ciência. Mas você sabe, tu me ensinaste muito mais que isso, tu foste amparo, alegria, e amizade, me ensinou a ser grande e a acreditar em mim. Obrigado de todo o meu coração a cada minuto que tu se dedicaste a mim.

Adriano, como já te disse outras vezes, agradeço cada segundo que tu se dedicaste a minha pesquisa, e todo o teu empenho para que as coisas ocorressem sem o caos. Sou imensamente grata pela parceria que criamos.

Pedro, obrigada por ter me ensinado com tanto entusiasmo esse mundo da parasitologia, e a tua dedicação sempre exemplar em todos os nossos trabalhos e também por cada risada, grande parte desse trabalho é fruto do teu empenho!

Ao professor Marcelo Molento e os membros do Laboratório de Parasitologia, especialmente a Úrsula, pela incansável ajuda no laboratório, deixo meu agradecimento.

Ly e Jai, minhas parceiras de início de pesquisa jamais esquecerei de cada fígado, rim e intestino, e muito menos do primeiro "*habemus Fasciola*", obrigado por terem compartilhado comigo tantos momentos, esse trabalho é fruto do que iniciamos juntas!

Sofi, querida, obrigada por toda a ajuda em campo e também em laboratório, além é claro das bolachas e cucas que sempre animaram as manhãs e tardes no GenEvo, você vai ser grandona!

Binho, meu querido amigo, é com carinho que agradeço a ti por toda ajuda e tempo que tu dedicaste para "abrir" capivaras, graxains, veados, e dentre outros animais com odores peculiares junto comigo. E mais do que isso, te agradeço por entrar na loucura de ser meu socio, e sonhar junto comigo projetos enormes! Você vale ouro meu brother! E Fifa, obrigada pela força em todos os nossos dias de trabalho na Bioarte, por ser o nosso braço direito e esquerdo e pelo apoio que você sempre deu pela pesquisa, mais do que isso, pela amizade que criamos!

Bina, Mabel, Bida e Douglas, e todos os amigos e colegas do Laboratório de Genética Evolutiva, a vida sempre se torna mais fácil quando há amigos para compartilhar alegrias e tristezas, e claro um copo de cerveja sempre que preciso. Para vocês deixo o meu muito obrigada, por todo o apoio e presença.

Thuthu, Thuisa, Thuani, minha amiga, obrigada por me ouvir tantas, e tantas vezes, por surtar comigo conscientemente, por me mostrar que a gente sempre consegue ir além, e que a gente sempre vai merecer o que há de melhor no mundo, grl pwr!

Vacão, obrigada por ter estado do meu lado em todas as etapas desse mestrado, e agora por todo apoio durante a seleção do doutorado, e como já dissemos inúmeras vezes, somos os nossos amuletos da sorte. Você é um carinho ímpar, obrigada mais uma vez por essa parceria incrível!

A ti Manu, por todos os dias, horas, segundos, que sei muitos não foram fáceis, mas tu me trouxeste alegria, até mesmo nos dias mais improváveis. Obrigada pelo apoio incondicional, e por sempre estar do meu lado, seja na pesquisa ou na vida, independente da circunstância, a minha dupla foi e é você. Eu não teria conseguido sem ti, tu foste o meu sol. Enorme gratidão (clichê eu sei) ao universo por ter colocado você na minha vida.

A minha família, pai, mãe, irmã e meu pequeno sobrinho, obrigada por entenderem a ausência, por todo minuto de preocupação e todo o suporte financeiro, para fazer com que eu conseguisse alcançar todos os meus sonhos, mas além de meus, eu sei que são seus também, e é para vocês que dedico toda essa dissertação.

Para os meus filhos quadrupedes que jamais lerão isso, Ateles, Bellatrix e Cinzenta, meus amores, vocês foram essenciais em todo o processo, foram todas as válvulas de escape que precisei. Mamãe ama vocês.

“Pode se dizer que a seleção natural esquadrinha todos os dias e todas as horas, em todo mundo, todas as variações, mesmo as mais insignificantes, rejeita o que é ruim, preserva e incorpora o que é bom e ocorre de maneira silenciosa e insensível, em todo momento e lugar nos quais a oportunidade se apresenta.”

Charles Darwin

RESUMO

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *FASCIOLA HEPATICA* (LINNAEUS, 1758): O PAPEL DOS HOSPEDEIROS DEFINITIVOS

Autora: Jéssyca Bressan Schwantes
Orientador: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

Fasciola hepatica é um platelminto da classe Trematoda responsável pela doença chamada fasciolose. Este parasito é cosmopolita e de ciclo heteroxênico, ou seja, dependente de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida: um intermediário, molusco da família Lymnaeida; e hospedeiros definitivos, sejam eles animais domésticos (bovinos, ovinos, caprinos) ou animais silvestres. No continente Americano, *Fasciola hepatica* foi introduzida juntamente com animais domésticos no início da colonização Europeia, e desde então, há a descrição de 14 espécies nativas da América do Sul sendo infectadas. Uma dessas é a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), que devido ao seu habito de vida semiaquático tornou-se um importante reservatório do parasito. Esse trabalho tem o objetivo de caracterizar geneticamente diferentes populações de *Fasciola hepatica* no Brasil em diferentes hospedeiros (bovino e capivara). Para isso, foram coletadas amostras de parasitos adultos e fezes de animais infectados para a coleta de ovos nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, e utilizamos dois fragmentos de genes mitocondriais *COI* e *NAD1* para as análises genéticas. Foram avaliados índices de diversidade nucleotídica, haplotípica e número de haplótipos. A relação haplotípica e a frequência dos haplótipos foram calculadas e redes de haplótipos foram construídas por *Median-joining*. Para entender se há estrutura populacional, realizamos o teste de AMOVA, e calculamos o índice de fixação (F_{ST}). A distância genética entre parasitos de diferentes hospedeiros foi calculada dentro de cada grupo amostrado e entre os grupos. Os nossos resultados mostraram que a estrutura genética das populações de *Fasciola hepatica*, sejam elas de animais domésticos ou silvestres dependem mais de aspectos geográficos do que do hospedeiro em questão, de uma forma que os parasitos dos animais silvestres compartilham do mesmo pool gênico dos parasitos de animais domésticos mais próximos geograficamente. No entanto, o alto trânsito de animais domésticos dentro dos estados brasileiros e as barreiras alfandegárias entre os estados faz com que ocorra homogeneidade genética entre as populações dentro dos estados e estruturação genética entre os estados. Da mesma forma, que ao compararmos os parasitos de diferentes hospedeiros, os parasitos de animais silvestres da América do Sul são semelhantes entre si, e distantes geneticamente dos parasitos de animais silvestres do Velho Mundo. Portanto, para que ocorra controle da epidemiológico de *Fasciola hepatica* dentro dos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, deve ser realizado a implementação de planos de manejo entre hospedeiros domésticos e silvestres, e também o controle de hospedeiros intermediários, principalmente nas regiões de alta potencialidade da doença e de possibilidade de novos hospedeiros definitivos.

Palavras Chave: Parasito; diversidade genética; mtDNA; Brasil

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF *FASCIOLA HEPATICA* (LINNAEUS, 1758): THE ROLE OF THE DEFINITIVE HOSTS

Author: Jéssyca Bressan Schwantes
Advisor: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

Fasciola hepatica is a flatworm of the Trematoda Class, and is responsible for the disease called fasciolosis. This parasite is cosmopolitan and has heteroxenic cycle being dependent on two hosts to complete its life cycle: an mollusc of the Lymnaeidae family as intermediate host; and domestic (cattle, sheep, goats) or wild vertebrates as definitive hosts. In the American continent, *Fasciola hepatica* was introduced together with domestic animals at the beginning of European colonization, and since then, it was reported at least 14 South America native species to being infected, one of them is the capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), which due to its semi-aquatic life habits has become an important reservoir of the parasite. This work aims to genetically characterize different populations of *Fasciola hepatica* in Brazil in different hosts (bovine and capybara). For that, adult parasites and feces from infected animals were collected for egg isolation in the states of Rio Grande do Sul and Paraná, and we used two fragments of the mitochondrial genes *COI* and *NAD1* for genetic analysis. Nucleotide and haplotype diversity and number of haplotypes were evaluated. The haplotype relationship and the frequency of the haplotypes were calculated and haplotype networks were built by Median-joining. We performed the AMOVA test and calculated the fixation index (F_{ST}) to evaluate population structure. The genetic distance between parasites encountered on different hosts was calculated within each sampled host group and between host groups. Our results showed that the genetic structure of *Fasciola hepatica*, whether from domestic or wild animals, depends more on geographic aspects on than the host in question, in a way that the parasites of wild animals share the same gene pool as those from domestic animals from the same region. However, the high transit of domestic animals within the and the border control between Brazilian states lead to genetic homogeneity among populations within states and genetic structure between states. In the same way, when comparing the different hosts, wild animals from South America share the same population of parasites among them, and have parasites more genetically distant from those encountered in wild animals from the Old World. Therefore, the implementation of management plans on domestic and wild hosts must be carried out for the epidemiological control of *Fasciola hepatica* within the states of Rio Grande do Sul and Paraná, as well as the control of intermediate hosts, especially in the regions highly susceptible to the disease and with high potential to new definitive hosts.

Key words: Parasite; genetic diversity; mtDNA; Brazil

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	10
Parasitismo.....	11
Biologia, evolução e hospedeiros de <i>Fasciola</i>	13
Filogeografia de parasitos	16
OBJETIVOS	19
Objetivo geral:.....	19
Objetivos específicos:	19
CAPÍTULO II – ARTIGO 1	20
<i>Fasciola hepatica</i> in Brazil: genetic diversity provides insights of its origin and geographic dispersion	20
CAPITULO III – ARTIGO 2	28
Perfil genético de <i>Fasciola hepatica</i> em hospedeiros silvestres: o papel do hospedeiro definitivo.....	28
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
APÊNDICES	56
ANEXOS	80
Another piece on the puzzle: <i>Echinococcus oligarthrus</i> recorded for the first time in southern Brazil	80

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

Independente da forma de vida, todos os indivíduos nascem, envelhecem e morrem, as populações aumentam ou diminuem dependendo de variáveis internas e externas, fazendo com que as comunidades e ecossistemas estejam em constantes mudanças de composição. As atividades humanas interferem em todos os níveis de mudanças ecológicas de curto e longo prazo, em todo o mundo (Petney, 2001). O resultado desta complexa cadeia de mudanças ambientais não atinge somente a ecologia dos ecossistemas, mas também fatores sociais. Estes podem ser negativamente influenciados por doenças negligenciadas principalmente em regiões de baixo desenvolvimento econômico. Da mesma forma, há forte influência das morbidades causadas pelas doenças negligenciadas sobre a economia local (Gazzinelli, et al. 2014).

Os sucessos de inúmeras parasitoses se devem as condições que compõe o foco natural da doença, da qual é representada pelo biótopo (local) e pela biocenose (hospedeiros intermediários, vetores, hospedeiros definitivos) (Neves e Filippis, 2014). Assim, as parasitoses ocorrem com maior ou menor prevalência em uma determinada região devido as condições sanitárias e nutricionais naquela localidade. Como exemplo, podemos citar as infecções helmínticas que causam doenças como esquistossomose, filariose, hidatidose, oncocercose, teníases e trematódeos que são transmitidos por alimentos, e apresentam maior prevalência em regiões de poucos recursos e com políticas públicas inadequadas, juntamente com dificuldades de integração vertical de programas de saúde (Neves e Filippis, 2014).

Animais domésticos e silvestres podem ser reservatórios de diversas espécies de parasitos. Normalmente, as espécies domésticas são parasitadas por um menor número de espécies de parasitos, mas cada uma delas pode alcançar densidades elevadas, provocando a morte do animal. Já em animais silvestres, há um maior número de espécies de parasitos, porém em quantidades menores, e assim, raramente causam a morte dos animais (Neves e Filippis, 2014). A principal diferença entre as infecções nos dois tipos de hospedeiros é que os animais domésticos geralmente vivem em áreas restritas, por anos, e assim os ovos, larvas e as demais formas infectantes das doenças irão se concentrar, atingindo os hospedeiros com facilidade. Como os hospedeiros silvestres vivem dispersos, o contato com as fases infectantes é dificultado, resultando em cargas parasitárias menores.

Parasitismo

O parasitismo é o modo de vida mais comum, uma vez que cerca de 40% das espécies de animais são parasitos em pelo menos uma fase de vida, com parasitismo onipresente em alguns táxons e ausente ou raro em outros (Dobson, et al. 2008). O conceito de parasitismo é descrito como, associação íntima e duradoura de duas espécies, havendo dependência metabólica da espécie menor em relação a espécie maior, ocorrendo unilateralidade de benefícios. Assim define-se que um parasito é, um ser vivo que depende obrigatoriamente de um outro ser vivo de maior porte, para o seu abrigo, alimentação e reprodução (Neves e Filippis, 2014).

Esse fenômeno do parasitismo evoluiu cerca de 223 vezes em Metazoários, 143 em Arthropoda e 87 em Insecta (Weinstein e Kuris, 2016). Os parasitos estão presentes em 43% dos filos de animais descritos, e o número de origens independentes de parasitos correlaciona-se com o número de espécies (Weinstein e Kuris, 2016). No entanto, o número de transições para o parasitismo não é determinado apenas pelo número de espécies em um clado. Nesse sentido, embora besouros sejam a ordem mais diversa dentro de Arthropoda, a maioria das origens independentes do parasitismo ocorreu dentro de ácaros e moscas (Weinstein e Kuris, 2016).

Os parasitos além de terem diferentes grupos de hospedeiros, também podem infectar diferentes áreas e órgãos, desde o trato gastrointestinal até o seu sistema circulatório, além de poderem viver na superfície externa do corpo de seu hospedeiro. A competição entre parasitas e hospedeiros corrobora com a hipótese da Rainha Vermelha, onde interações co-evolutivas são mantidas devido às pressões seletivas do ambiente, de modo que o equilíbrio na relação parasito-hospedeiro é essencial para o sucesso de ambos os indivíduos (Rabajante, et al. 2015). E para que seu sucesso seja alcançado, a relação do parasito com o seu hospedeiro deve causar pouco dano ao hospedeiro, uma vez que se a infecção não for branda, o parasito pode matar o seu hospedeiro, e assim ele também morrerá. Desta forma, o equilíbrio desta relação deve ser estabelecido à medida que hospedeiro e parasitos evoluem (Neves e Filippis, 2014).

Além da forma assintomática, a ação dos parasitos em seus hospedeiros pode ser: mecânica, em que ocorre ação do parasito sobre um órgão, podendo ser

obstrutiva ou de compressão; espoliativa, quando o parasito retira nutrientes do hospedeiro; traumática, de maneira que durante a fixação ou migração do parasito promovendo traumas sobre o hospedeiro; tóxica ou imunogênica, caracterizado quando os produtos metabolizados pelo parasito são tóxicos ou estimulam o sistema de defesa do seu hospedeiro (Neves e Filippis, 2014).

A relação espécie-especifica pode ajudar a entender como poderíamos prever o estabelecimento de novas associações parasito-hospedeiro após trânsitos bióticos, de maneira que conquistar novos hospedeiros sem eventos de coespeciação, podem vir a resultar em uma expansão da gama de hospedeiros (Agosta e Klemens, 2008). O novo contato com diferentes hospedeiros requer que os parasitos tenham adaptações ecológicas, de maneira que para que essa infecção seja bem-sucedida ele mantenha características chave da infecção de hospedeiros anteriores. No entanto, a heterogeneidade na conquista dos hospedeiros é um fator importante para determinar a especificidade em parasitos generalistas, principalmente para os que infectam animais silvestres (Agosta e Klemens, 2008). Caracterizar a variação natural dos parasitos em seus hospedeiros pode identificar aspectos regionais ou diversidade filogenética.

Essa generalização de hospedeiros em parasitos de potencial zoonótico torna a transmissão preocupante em áreas de alto fluxo de animais domésticos e trânsito de pessoas, de maneira que esses parasitos podem vir a estabelecer novos hospedeiros. Zoonoses emergentes são conhecidas pela sua evolução recente, de maneira que esteja ocorrendo aumento da sua incidência ou expansão em áreas geográficas dos hospedeiros definitivos, intermediários ou vetores, causando forte impacto econômico e social (Meslin, et al. 2000; Neves e Filippis, 2014).

A conquista de novos hospedeiros e a patogenicidade das infecções parasitárias podem causar mortalidade, perdas de produção (redução do peso de uma carcaça, leite, produção de fibras) e lesões nos tecidos (menor comercialização do produto). O platelminto *Fasciola hepatica*, por exemplo, vem causando mortalidade em animais silvestres (Labruna, et al. 2018), e uma perda econômica de cerca de 210 milhões de dólares ao ano no Brasil, sendo o estado do Rio Grande do Sul, estado com o maior impacto econômico, seguido dos estados de Santa Catarina e Paraná (Molento, et al 2018). Apesar de muitos avanços no tratamento e controle de parasitos, as infecções ainda persistem devido a fatores, que incluem urbanização,

desmatamento, sistemas de produção pecuária intensivos, maior trânsito de animais, descarte inadequado de efluentes, surgimento de resistência a medicamentos e inseticidas, falta de manejo correto em animais de produção, além da falta de saneamento básico, higiene e educação ambiental principalmente nas regiões subdesenvolvidas da América e Velho Mundo.

Biologia, evolução e hospedeiros de *Fasciola*

No Brasil, umas das zoonoses com o maior impacto socioeconômico é a fasciolose. Essa doença é causada por parasitos do gênero *Fasciola*, do filo Platyhelminthes, classe Trematoda e subclasse Digenea, é representado pela espécie *Fasciola hepatica* que é cosmopolita e *Fasciola gigantica*, que é restrita ao Velho Mundo. O trematódeo *F. hepatica* em sua fase adulta tem tamanho de cerca de 3 cm de comprimento por 1,5 de largura, o seu corpo tem forma de folha e é achatada dorsoventralmente (Figura 1), sendo popularmente conhecida no Brasil como baratinha do fígado (Neves e Filippis, 2014). O ciclo do parasito é heteroxênico, pois os parasitos utilizam um hospedeiro intermediário da família Lymnaeidae.



Figura 1. *Fasciola hepatica* em sua fase adulta. Fonte: Raffaele Roncalli.

O ciclo biológico do parasito se inicia com a eliminação dos ovos pelos vermes adultos lançados no intestino através da bile e assim eliminados nas fezes do seu hospedeiro definitivo. Com condições de umidade e temperatura ideais, há a formação de um miracídio que em contato com a água e a luz, eclode do ovo. Esse miracídio nada a procura de um hospedeiro intermediário, um molusco da família Lymnaeidae, e ao penetrar nos tecidos do caramujo, forma-se um esporócito, que origina 5 a 8 rédias, e que por sua vez podem originar rédias de segunda geração ou cercárias. As cercárias, são formas de vida livre que nadam até encontrarem um vegetal (capim,

agrião, entre outros) ou um local para se fixarem, e após fixados encistam-se transformando-se em sua forma infectante, a de metacercária. Herbívoros ou onívoros são infectados quando ingerem as metacercárias. Ao chegar no intestino delgado, as metacercárias desencistam e perfuram a parede do intestino e caem na cavidade peritoneal de onde caminham até atingir o fígado, perfurando a capsula hepática do órgão e migrando pelo parênquima hepático até chegar aos ductos e vesícula biliar, reiniciando o ciclo (Figura 2) (Neves e Filippis, 2014).

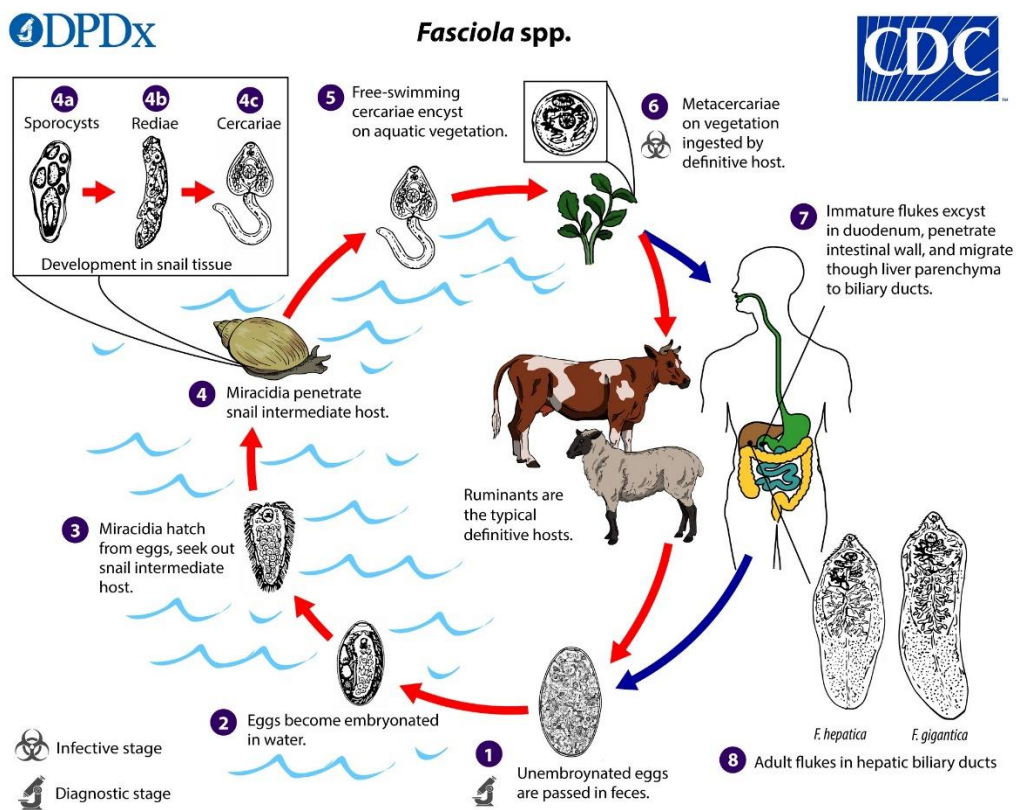


Figura 2. Ciclo biológico do gênero *Fasciola*. Fonte: CDC.

A infecção da doença no hospedeiro definitivo inicia com lesões causadas pelas formas juvenis do trematódeo, ao migrarem do ducto biliar normalmente para o parênquima hepático, por ação mecânica e atividade de catepsina L e B, e após de cerca de 7 semanas, estas tornam-se adultas, causando extensa hemorragia e fibrose hepática (Moazeni e Ahmadi, 2016). Os hospedeiros definitivos com maior prevalência são mamíferos domésticos. Os animais silvestres vêm apresentando papel de reservatórios da doença, enquanto humanos são hospedeiros acidentais. Esses parasitos podem permanecer por até 1 e 2 anos no bovino, até 20 anos em ovinos e

em humanos esse tempo pode chegar a 13,5 anos (Andrews, 1999; Mas-Coma, et al. 2014)

A ascendência da Família Fasciolidae sugere que a origem do seu fasciolídeo mais basal tenha irradiado em Proboscidea originados da África há 50 milhões de anos atrás, e esses se dispersaram pela Eurásia há 18,5 – 0.8 milhões de anos e assim ocorrendo extensas radiações (Lotfy, et al. 2008) (Figura 3). Já, Mas-Coma, et al. (2009), salientam que a origem do gênero *Fasciola* tenha ocorrido após a separação da Gondwana para o África e América do sul, tendo a sua origem a cerca de 90-100 milhões de anos atrás. Lotfy et al. (2008) sugerem que *Fasciola hepatica* teve a sua origem na Eurásia devido a sua preferência por *Lymnaea truncatula*, um de seus hospedeiros intermediários. Já nos definitivos, é sugerido que a sua história evolutiva tenha iniciado em ovicaprídeos, preferencialmente da espécie *Ovis*, devido a sua alta capacidade de produção de ovos e ao tempo de vida nesse hospedeiro.

Os hospedeiros selvagens descritos para o continente Americano são, *Odocoileus virginianus*, *Hippocamelus antisensis* (Gomez-Puerta, 2019), *Ozotoceros bezoarticus* (Hernández e González, 2012), *Lama guanicoe*, *Lama glama*, *Cervus elaphus* (Larroza e Olaechea, 2010), *Pudu puda* (Bravo, 2013), *Vicugna pacos* (Flores, et al. 2014), *Vicugna vicugna* (Cafrune, et al. 2004), *Lagidium viscaccia* (Led, et al. 1979), *Rhea americana*, *Rhea pennata* (Martínez-Díaz, et al. 2013), *Myocastor coypus* (El-Kouba, et al. 2009) e *Hydrochoerus hydrochaeris* (Santarém, et al. 2006).

A alta produção de animais domésticos, juntamente com a alta biodiversidade de mamíferos herbívoros, faz com que áreas de contato entre esses animais formem focos da doença. Animais silvestres com hábitos de vida semiaquático como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), juntamente com seus hábitos comportamentais de defecação e alimentação em áreas ripárias, local esse de presença do hospedeiro intermediário, tornem-se importantes reservatórios silvestres da doença.

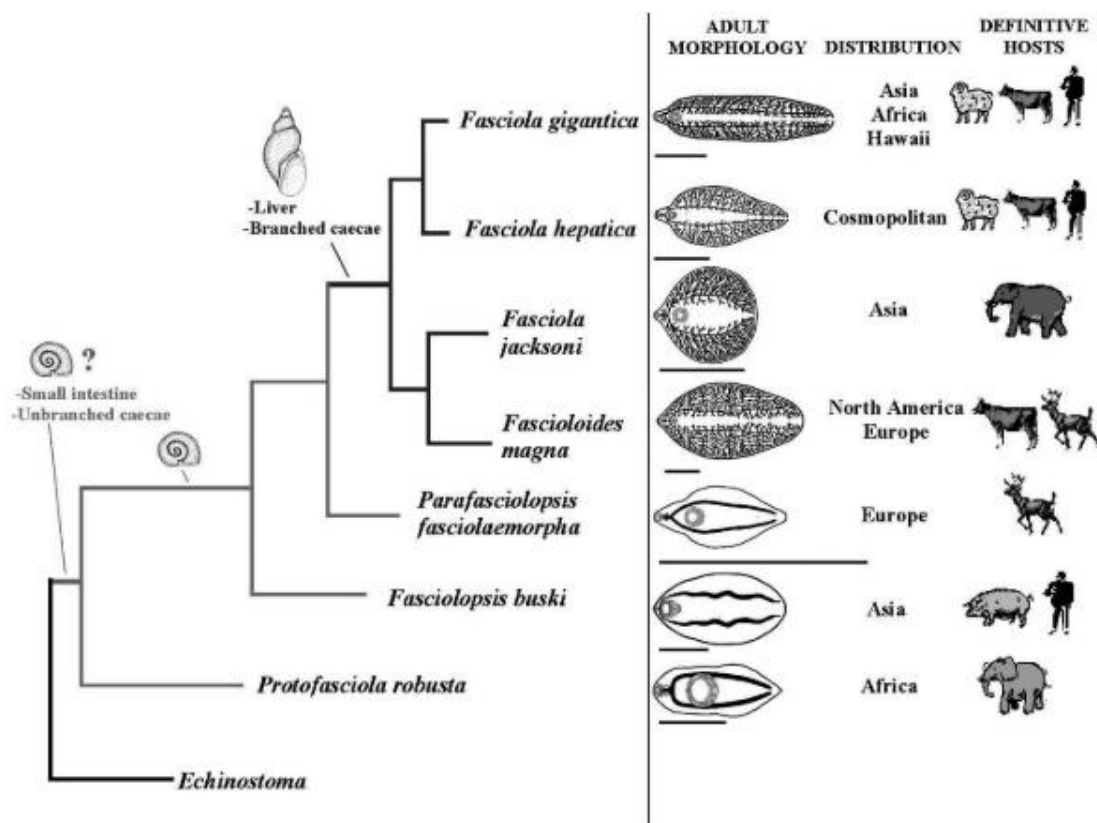


Figura 3. Árvore filogenética da Família Fasciolidae. Análise bayesiana de dados concatenados dos genes ITS1, ITS2 e *NAD1*. Padrões e alterações significativas em hospedeiros, habitat, morfologia e distribuição. Barra de tamanho: 10mm. Fonte: Lotfy, et al. 2008.

Filogeografia de parasitos

A filogeografia concentra-se no estudo dos princípios e processos que regem a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente dentro e entre espécies proximamente relacionadas (Avice, 2000). Deste modo, genes de interesse são analisados concomitantemente com tempo e espaço, gerando relações filogenéticas dos organismos em questão. As análises e interpretação das distribuições das linhagens usualmente requerem de dados genéticos, genética de populações, etologia, demografia, biologia filogenética, paleontologia, geologia, e geografia histórica.

Estudos filogeográficos são aplicados nos mais diversos organismos, desde vírus (Edwards et al. 2019), bactérias (Bouznif, et al. 2019), aranhas (Postiglioni, et al. 2019) macacos (Link et al 2019) e populações humanas (Töpf, et al. 2006). Os diferentes marcadores moleculares permitem a realização de diversas abordagens,

uma vez que possuem diferentes taxas evolutivas. Marcadores mitocondriais, de plastídios e de regiões nucleares não codificantes são utilizados para inferir eventos mais antigos, e marcadores de regiões repetitivas, como os microssatélites, para eventos mais recentes. Sendo assim, as histórias biogeográficas podem ser contadas tanto para o entender eventos geológicos ou da história recente.

Os distribuição biogeográfica dos parasitos é influenciada simultaneamente pelas pressões seletivas sobre o parasito, sejam elas do ambiente ou de seus hospedeiros, e pela história evolutiva de seus hospedeiros. Endoparasitos ou ectoparasitos por exemplo, tem a sua distribuição correlacionada aos seus hospedeiros. Bruyndonckx et al. (2009), demonstrou uma associação na dispersão de ácaros do gênero *Spinturnix* e a distribuição de seus hospedeiros morcegos (Família Vespertilionidae e Rhinolophidae) europeus utilizando dois genes mitocondriais. Embora associação entre a distribuição de parasitos e seus hospedeiros seja intuitiva, também foram verificados casos de incongruências. Toon e Hughes, (2008) em um estudo utilizando uma ave (*Gymnorhina tibicen*) e duas espécies de piolhos *Philopterus* sp. e *Brueelia semiannulata*, utilizando sequências do gene mitocondrial *COI*, demonstraram que com a espécie *Brueelia semiannulata* não há congruência na relação de distribuição parasito-hospedeiro, e que a estruturação genética deste parasito foi geográfica e não correlacionada com o seu hospedeiro.

Algumas zoonoses ainda podem ser altamente influenciadas pelo homem, uma vez que, a velocidade do trânsito de pessoas e de animais domésticos que as acompanham, alteram os sinais filogeográficos, principalmente para parasitos de importância socioeconômicas (Morgan, et al. 2012). Este é o caso de doenças como a malária, onde estudos utilizando dados de microssatélites demonstraram que o alto fluxo gênico em *Plasmodium vivax*, é resultado da movimentação humana para regiões geográficas distantes da Amazônia Peruana. Isto faz com que a manutenção do alto índice de diversidade genética, causado pela movimentação dos reservatórios humanos, forme uma forte barreira contra o controle e posterior eliminação da malária na região Peruana (Manrique, et al. 2019). Além da malária, doenças como a da fasciolose sofreram forte influência humana em sua distribuição, devido as colonizações humanas no continente americano e na Oceania, e atualmente devido ao trânsito de hospedeiros definitivos como os bovinos e ovelhas, entre cidades, estados e países. O fato de que a patogenicidade da doença possa ser extremamente

alta em animais silvestres da América do Sul, como lhamas, alpacas e guanacos nas regiões andinas (Carmona e Tort, 2017) e capivaras no Brasil (Labruna, et al. 2018), sugere que as infecções de *Fasciola hepatica* sejam recentes nesses animais, uma vez que não há registros da parasitose antes da colonização europeia.

Mesmo que o ciclo de vida de *Fasciola hepatica* esteja intimamente ligada ao hospedeiro intermediário, o fato de ser cosmopolita e com grande número de hospedeiros definitivos, tornam os estudos filogeográficos utilizando *F. hepatica* de diferentes hospedeiros definitivos importantes para entender a dinâmica populacional nos hospedeiros domésticos e silvestres. Desta forma, aspectos epidemiológicos da doença, irão auxiliar em medidas de manejo de fauna doméstica e silvestre, e para que assim sejam implementados em áreas de alta prevalência.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Caracterizar geneticamente diferentes populações de *Fasciola hepatica* em hospedeiros definitivos domésticos e silvestres no Brasil;

Objetivos específicos:

- i) Verificar a diversidade genética, a estrutura populacional e o fluxo gênico de *Fasciola hepatica* em hospedeiros bovinos em regiões de alta prevalência;
- ii) Avaliar o papel de hospedeiros definitivos silvestres como reservatórios de diversidade em *Fasciola hepatica*.

CAPÍTULO II – ARTIGO 1

Journal of Helminthology

Fasciola hepatica in Brazil: genetic diversity provides insights of its origin and geographic dispersion

Jéssyca Bressan Schwantes ^{1,2}; Pedro de Souza Quevedo ³; Marícia Fantinel D'Ávila ²; Marcelo Beltrão Molento ⁴; Daniel Angelo Sganzerla Graichen ^{1,2}

¹ Graduate Program in Animal Biodiversity. Federal University of Santa Maria. Av. Roraima, 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul. CEP: 97105-900. Brazil.

² Evolutionary Genetics Laboratory. Federal University of Santa Maria. Av. Independencia, 3751. Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul. CEP: 98300-000. Brazil.

³ Institute of Tropical Studies, Federal University of Southern and Southeastern Pará. Nova Marabá-Marabá, Pará. CEP: 68507-590. Brazil.

⁴ Laboratory of Parasitic Diseases, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná. Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, Paraná. CEP. 80035-050. Brazil.

Running title: Genetic diversity of *Fasciola hepatica* in Brazil

Research Paper

Cite this article: Schwantes JB, Quevedo P, D'Ávila MF, Molento MB, Graichen DAS (2019). *Fasciola hepatica* in Brazil: genetic diversity provides insights into its origin and geographic dispersion. *Journal of Helminthology* 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000774>

Received: 8 May 2019

Revised: 4 July 2019

Accepted: 25 July 2019


Key words:

Liver fluke; genetic structure; South America; mtDNA

Author for correspondence:

D.A.S. Graichen, E-mail: das.graichen@ufsm.br

Fasciola hepatica in Brazil: genetic diversity provides insights into its origin and geographic dispersion

J.B. Schwantes^{1,2} , P. Quevedo³, M.F. D'Ávila², M.B. Molento⁴ and D.A.S. Graichen^{1,2}

¹Graduate Program in Animal Biodiversity, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, CEP 97105-900, Brazil; ²Evolutionary Genetics Laboratory, Federal University of Santa Maria, Av. Independência, 3751, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, CEP 98300-000, Brazil; ³Institute of Tropical Studies, Federal University of Southern and Southeastern Pará, Nova Marabá-Marabá, Pará, CEP 68507-590, Brazil and ⁴Laboratory of Parasitic Diseases, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, Paraná, CEP 80035-050, Brazil

Abstract

Fasciola hepatica is a trematode parasite that affects mammals, including humans. In Brazil, fascioliasis, a disease caused by the parasite, is of great importance. The disorder affects the welfare of the Brazilian population through impairing the agricultural production of cattle, where the disease causes weight loss as a result of liver damage. This study aimed to evaluate the genetic diversity of *F. hepatica* throughout Southern Brazil to determine its geographic origin and estimate the colonization route of the parasite. To accomplish these aims, flukes were collected from slaughterhouses in three endemic areas of Rio Grande do Sul and Paraná states. DNA was isolated using the phenol–chloroform protocol from single flukes and two mitochondrial genes, cytochrome oxidase subunit I (COI) and nicotinamide dehydrogenase subunit 1 (Nad1), were amplified and sequenced. Ten haplotypes of COI were found from 75 isolated parasites and the total haplotype and nucleotide diversity observed were 0.475 and 0.002, respectively. Using the Nad1 gene, we found 24 haplotypes from 79 samples, resulting in haplotype and nucleotide diversity values of 0.756 and 0.004, respectively. An analysis of molecular variance showed that 57.4% and 77.5% of variation was within populations (F_{ST}), while 9.0 and 36.8% of variation was among groups (F_{CT}) when considering COI and Nad1 genes, respectively. For COI, the fixation index values of 0.425 and 0.368 were obtained for F_{ST} and F_{CT} , respectively, while analysis of Nad1 0.225 and 0.089 index values were obtained for F_{ST} and F_{CT} , respectively. We have determined that *F. hepatica* found in the two distinct areas originated from several geographical regions, since we found haplotypes that were shared with at least three different continents. These data are in accordance with the recent colonization of Brazil, and the recent import of cattle from South American, European and, possibly, some African countries. The observed F_{ST} and F_{CT} values for COI and Nad1 genes of *F. hepatica* may be a result of limited movement of animals within states and support the lack of geographical structure of the parasite in Brazil, which are in agreement with the observed cattle production systems in this region.

Introduction

Fascioliasis is one of the most important parasitic diseases of bovines, with approximately 700 million animals raised in areas in which there is a high level of risk of infection. *Fasciola hepatica* is a trematode parasite with a wide geographical distribution (Lotfy *et al.*, 2008). Although ruminants are the most important, and most frequently infected, livestock hosts (Dutra *et al.*, 2010), a variety of other mammals (i.e. horses, capybaras, deer and humans) can be infected and/or serve as natural reservoirs for the parasite (Mendes *et al.*, 2008; Ichikawa-Seki *et al.*, 2017).

Despite high incidence in domestic animals, very few human cases of fascioliasis have been reported in Brazil (Pritsch & Molento, 2018). The South of Brazil, which includes the states of Paraná (PR), Santa Catarina (SC) and Rio Grande do Sul (RS), is the region with the highest level of fascioliasis in ruminants in the country (Bennema *et al.*, 2014). Cattle in the state of RS are the most highly affected in the country (14.39%), with the economic impact on the region costing approximately \$147 million/year due to losses in carcass weight (Molento *et al.*, 2017).

Even though it is largely believed that *F. hepatica* was introduced in South America by Portuguese and Spanish settlers who zealously transported animals to the region (Mas-Coma *et al.*, 2009; Ichikawa-Seki *et al.*, 2017), Carnevale *et al.* (2017) did not find any geographic structuration within Argentinean samples, using the ITS1 and mitochondrial

© Cambridge University Press 2019

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

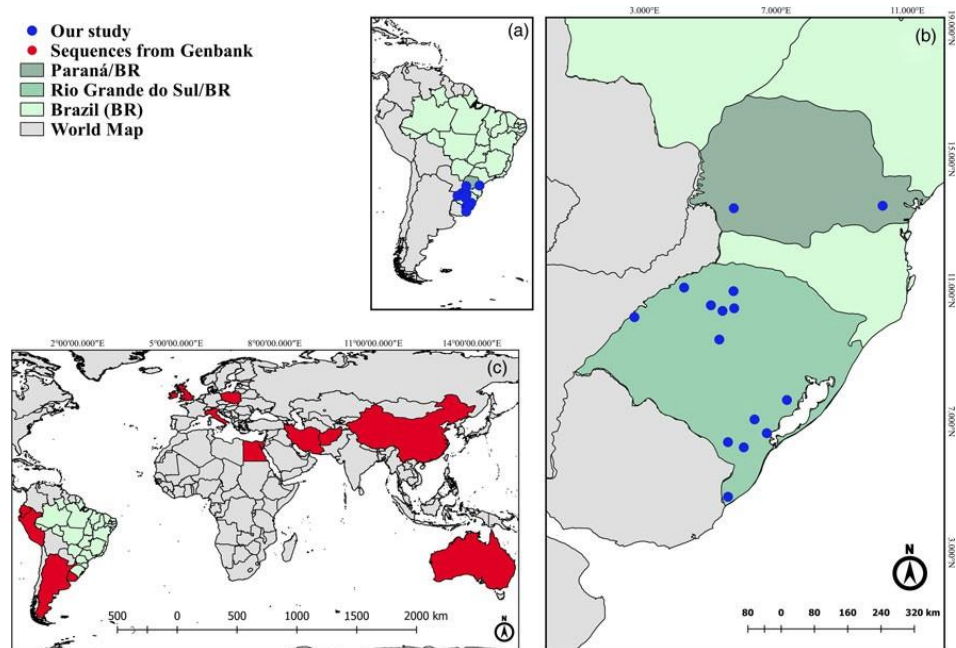


Fig. 1. (a) View of Latin America, sample points highlighted in blue; (b) geographic distribution of *Fasciola hepatica* samples in Brazil included in the study; (c) geographic origins of samples from GenBank included in our analysis (highlighted in red).

markers. *Fasciola hepatica* has been reported in Brazil since 1921, but there is little information concerning its genetic variation within local or regional populations. In addition, there is a complete lack of information regarding the geographic organization of *F. hepatica* genetic variation in Brazil, which could be useful to forecast the eventual dispersal of new, drug-resistant strains, as suggested by Beesley *et al.* (2017). This study aimed to evaluate the genetic diversity of *F. hepatica* in cattle from PR and RS and predict the spread of the parasite in the region.

Material and methods

Samples

Adult parasites were collected from cattle after liver inspection in slaughterhouses in 15 localities within RS and two in PR (supplementary table S1 and fig. 1). In total, 91 flukes were analysed in this study. After sampling, the trematodes were immediately stored in absolute ethanol at -80°C for later use, according to Itagaki *et al.* (2005). For the analysis, individual parasites collected from the same area were considered one population.

Molecular analysis

DNA extraction was performed from single flukes using phenol-chloroform, according to Green & Sambrook (2012). We amplified two mitochondrial genes, the cytochrome oxidase subunit 1 (COI) and the nicotinamide dehydrogenase subunit 1 (Nad1), using primer pairs ITA8/ITA9 and ITA2/ITA10, respectively, following the protocol described in Itagaki *et al.* (2005). After analysis using electrophoresis in an agarose gel, polymerase chain

reaction products were purified using 13% Polyethylene Glycol (PEG) precipitation and sequenced in both directions, using an ABI 3500 automated DNA sequencer (with BigDye Terminator Chemistry, Belo Horizonte, (MG), Brazil).

Statistical analysis

Base calling and sequence accuracy procedures were performed using the Staden software package (Staden, 1996), and polymorphic sites were confirmed by the visual inspection of sequence chromatograms. Indices of population diversity (number of haplotypes, haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity) and Tajima's D test were calculated using the DNAsp 5.0 (Librado & Rozas, 2009). Identification of haplotypes and the construction of network trees were performed using the medium joining method with Network 5.0 (Bandelt *et al.*, 1999). In addition to the samples we collected, we used sequences deposited in GenBank for the geographic comparison of haplotypes. We downloaded sequences from 14 countries (Peru, Argentina, Ecuador, Uruguay, UK, Ireland, Italy, Poland, Egypt, Afghanistan, Iran, China, Australia and Brazil), resulting in a total of 197 sequences of the COI gene (supplementary table S2) and 254 of the Nad1 gene (supplementary table S3).

We used the analysis of molecular variance (AMOVA) to search for the main source of genetic variability of *F. hepatica*, and F-statistics were used to estimate the proportion of genetic variability among populations (F_{ST}), among populations within groups (F_{SC}) and among groups (F_{CT}). The AMOVA was run with populations grouped according to geographical sampling (RS and PR), considering that values close to 1 indicated an

Table 1. Indexes of population diversity of *Fasciola hepatica* for the COI and Nad1 genes.

Genes	COI					Nad1					
	City	N	π	h	Hd	City	N	π	h	Hd	
Rio Grande do Sul	Arroio Grande	9	0.00469	3	0.556	Arroio Grande	9	0.00384	5	0.722	
	Camaquã	5	0.00528	3	0.700	Camaquã	4	0.00887	2	0.500	
	Canguçu	2	–	1	–	Canguçu	2	0.00177	2	1	
	Herval	1	–	–	–	Herval	8	0.00602	7	0.964	
	Ijuí	1	–	–	–	Ijuí	1	–	–	–	
	Júlio de Castilhos	7	0.00075	2	0.286	Júlio de Castilhos	5	0.00957	3	0.800	
	Palmeira	7	–	1	–	Palmeira	6	0.00059	2	0.333	
	Pejuçara	6	–	1	–	Pejuçara	5	–	1	–	
	Pelotas	3	0.00176	2	0.667	Pelotas	5	0.00248	3	0.800	
	Santa Bárbara do Sul	3	–	1	–	Santa Bárbara do Sul	6	0.00508	5	0.933	
	Santa Vitória do Palmar	6	0.00088	2	0.333	Santa Vitória do Palmar	6	0.00059	2	0.333	
	Santo Cristo	4	0.00132	2	0.500	Santo Cristo	2	0.00177	2	1	
	São Borja	12	0.00108	2	0.409	São Borja	10	0.00063	2	0.356	
All cities of RS	66	0.00178	8	0.375	All cities of RS	69	0.00384	23	0.756		
Paraná	Curitiba	6	0.00246	3	0.733	Curitiba	4	0.00177	3	0.833	
	Nova Prata do Iguazu	3	0.00176	2	0.667	Nova Prata do Iguazu	6	–	1	–	
	All cities of PR	9	0.00249	4	0.694	All cities of PR	10	0.00071	3	0.378	
All samples	75	0.00211	10	0.475	All samples	79	0.00358	24	0.756		
Tajima's D: –1.86913	$P < 0.05$					Tajima's D: –2.43824	$P < 0.01$				

N, number of samples; π , nucleotide diversity; h, number of haplotypes; Hd, haplotype diversity.

extreme differentiation between the populations, and values close to zero indicated a total genetic mix among populations. Both types of analysis were performed using the Arlequin program 3.5.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

Results

We analysed the COI gene (379 bp) from 75 samples and obtained Hd and nucleotide diversity (π) values of 0.475 and 0.002, respectively. Among these, ten distinct haplotypes were identified. Regarding the Nad1 gene (564 bp), we identified 24 distinct haplotypes from a total of 79 samples, resulting in a Hd value of 0.756 and a nucleotide diversity value of 0.004 (table 1). The COI haplotype network built with the samples from our study presented a star-like model, where the C_1 haplotype was the most frequently observed and consisted of 54 samples that were distributed throughout both RS and PR (fig. 2). In addition to C_1, the C_5 haplotype appeared in both areas. Six C_5 haplotypes were shared among cities in RS and two were shared within PR (fig. 2). When the 197 sequences from Genbank were included in our COI network, we observed 46 haplotypes (fig. 3). Two haplogroups were formed; the first haplogroup was the most diverse, containing haplotypes from all analysed countries. In this haplogroup, the most frequently observed haplotype was C_1, in which a total of 125 sequences were included

(including 54 from our study). The second haplogroup seemed to be more restricted, including samples mainly from Iran. In this haplogroup, the most frequent haplotype, comprising 42 sequences, was C_2, which included 36 sequences from Iran, two from Poland, one from Peru and three from Brazil (identified in our study).

The haplotype network of the Nad1 gene was performed using only the newly identified, Brazilian samples. The analysis resulted in the identification of 24 haplotypes out of 79 total samples (fig. 2). The most frequent haplotype observed was N_1, comprising 32 individual samples, and the second was the N_7, with 23 samples. Curiously, 22 haplotypes were not shared among any city. When GenBank samples were added to the analysis, we obtained a total of 333 sequences, 88 haplotypes and four haplogroups (fig. 4). The sequences of haplogroups 1 and 2 were composed of the greatest concentration of samples from Europe, Asia and Africa, whereas the haplogroups 3 and 4 were mainly composed of a mixture of samples from South America. There were two highly shared haplotypes, N_1 and N_7, belonging to the South American haplogroups 3 and 4, respectively. Haplotype N_7 was the most frequently occurring; 90 sequences of the haplotype were identified, distributed between Afghanistan, Argentina, Ecuador, Egypt, Peru, Poland, Italy, the UK, Iran and Brazil. Of these 90 sequences, 24 were found in our study. The second most frequent haplotype

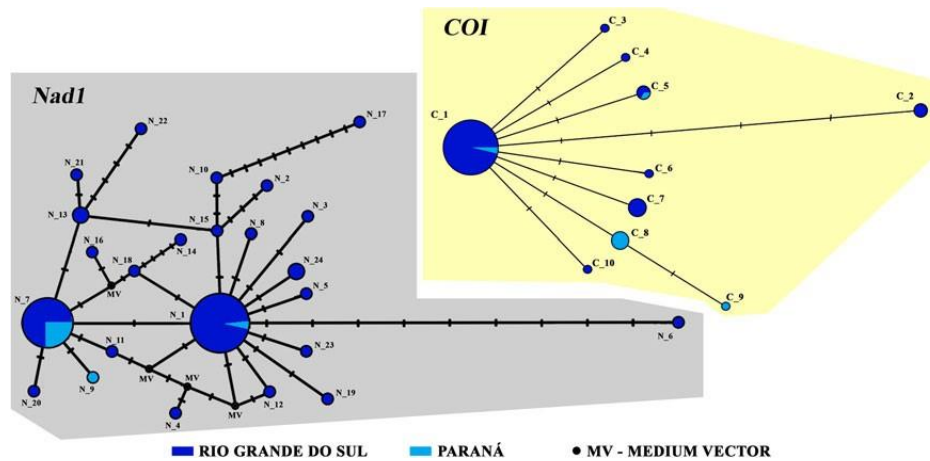


Fig. 2. Network analysis of Nad1 and COI genes of *Fasciola hepatica* samples from this study. In grey, the distribution of 24 haplotypes of the Nad1 gene are shown; in beige, the distribution ten haplotypes for the COI gene are presented.

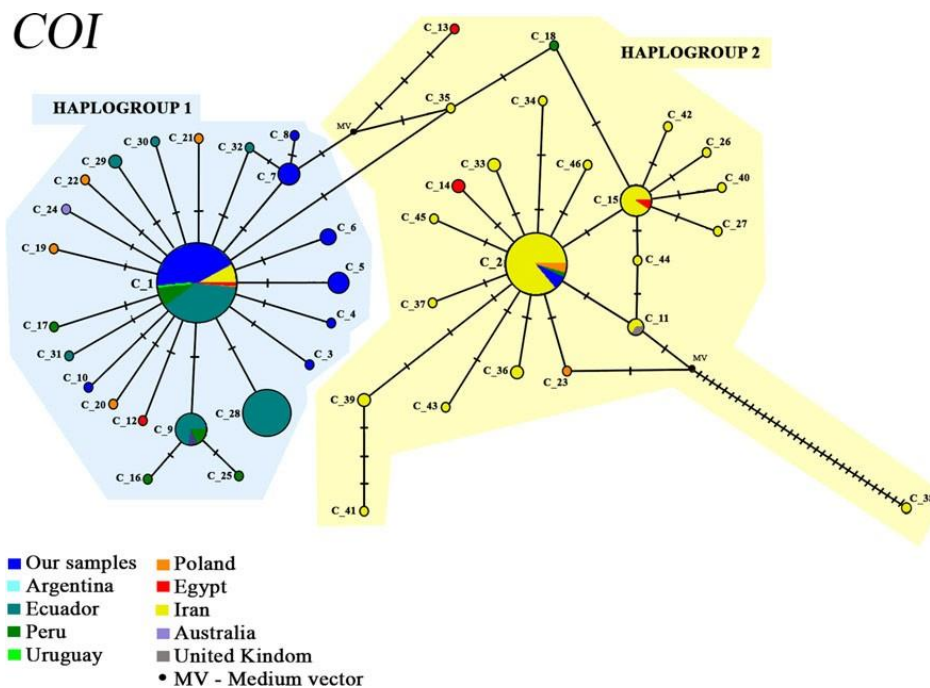


Fig. 3. Network analysis for the COI gene. In this analysis, we grouped sequences identified in the study with samples from other regions of the world. The colours correspond to their respective geographical locations.

was N_1, consisting of 78 sequences. This group was formed by individuals from Ecuador, Peru, Egypt, Uruguay, Argentina and our newly identified samples from Brazil (34 sequences). When we compared all the existing haplotypes of this analysis, we had a total of 15 haplotypes found exclusively in the RS and PR states.

The results of the analysis of population structure showed that most of the genetic diversity observed was within populations (COI: 57.4%; Nad1: 77.5%). The F_{ST} index value for the COI and Nad1 genes were 0.425 and 0.225, respectively. F_{CT} index values for COI and Nad1 were 0.368 and 0.089, respectively. When the COI gene was considered, there was 36.8% similarity

Nad1

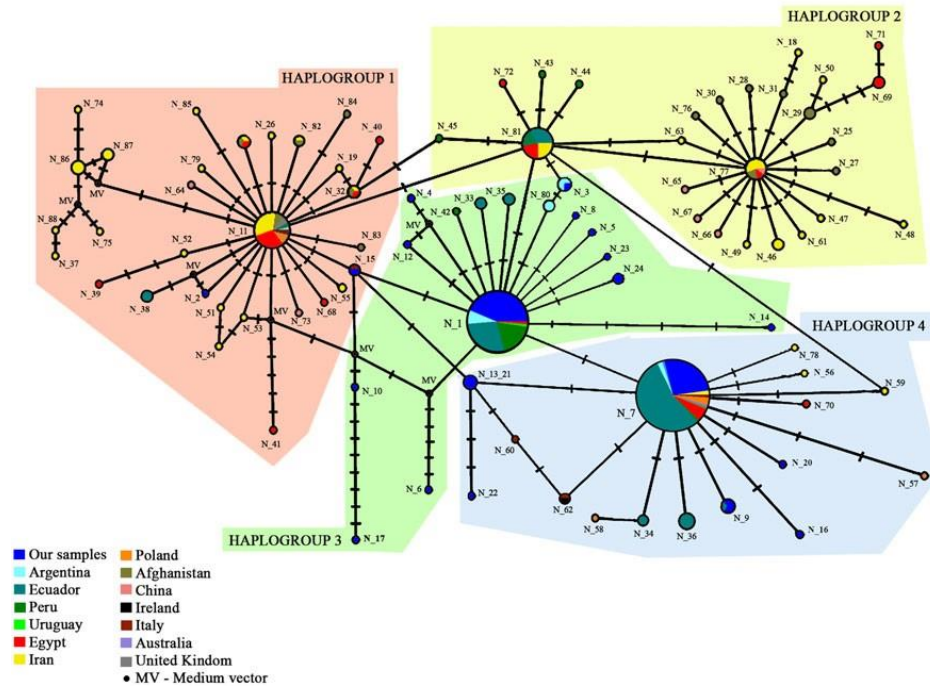


Fig. 4. Network analysis for the Nad1 gene. In this analysis, we grouped sequences identified in the study with samples from other regions of the world. The colours correspond to their respective geographical locations.

Table 2. AMOVA results based on the COI and Nad1 genes of *Fasciola hepatica* from Southern Brazil.

	Source of variation	Degrees of freedom	Percentage of variation (%)
COI	Among groups	1	36.81
	Among groups within population	13	5.75
	Within populations	60	57.45
	F-statistic	F _{ST} : 0.425 F _{CT} : 0.368 F _{SC} : 0.091	
Nad1	Among populations	1	8.99
	Among groups within population	13	13.51
	Within populations	64	77.51
	F-statistic	F _{ST} : 0.225 F _{CT} : 0.089 F _{SC} : 0.148	

among groups (table 2). The Tajima's D test of neutrality produced negative values, which were significant for both COI (-1869, $P < 0.05$) and Nad1 (-2438, $P < 0.01$) genes (table 1).

Discussion

This is the first report of the genetic characterization of *F. hepatica* from infected cattle isolated from different regions of Brazil. Diversity indices, evaluated using two mitochondrial genes for analysis, produced findings similar to others that were carried out in different countries. For example, a study in Peru analysed the Nad1 fragment from 78 individual parasites and found eight haplotypes (Hd = 0.685 and $\pi = 0.00175$) (Ichikawa-Seki *et al.*, 2016). A study conducted in Argentina examining 22 individuals, identified seven haplotypes for the COI gene. When two other mitochondrial genes were analysed – Nad4 and Nad5 – four and three haplotypes were identified, respectively (Carnevale *et al.*, 2017). Elliott *et al.* (2014) analysed 208 specimens in a study that yielded only six COI haplotypes (Hd = 0.482 and $\pi = 0.003$), and 18 Nad1 haplotypes (Hd = 0.832 and $\pi = 0.005$) in Australia.

A possible explanation for both high Hd and low nucleotide diversity could be related to the arrival of *F. hepatica* in Peru, Argentina, Australia and Southern Brazil, with a very small number of individuals, each from a much larger parental population, creating a Founder's effect. To better explain the large number of haplotypes observed, we suggest that the introduction of *F. hepatica* in Brazil occurred in several separate human/cattle immigration waves. A similar scenario was pointed out to explain the findings of Semyanova *et al.* (2006), in which researchers analysed populations from eastern Europe and western Asia with two different lineages. Lineage 1 was shared with Europe, Caucasus, Asia and Oceania, and lineage 2 was shared with European, Armenian and American populations (the USA and Uruguay).

We hypothesize that the introduction of *F. hepatica* to Brazil could have happened in accordance with two different scenarios. First, it could be due to land migration of wild animals by the Great American Interchange (i.e. wild ruminants from Peru). Second, effects could be due to Portuguese and Spanish colonization (i.e. movement of Catholic settlements and commerce). As nucleotide substitutions are rare, we suppose that there has not been enough time to generate many nucleotide substitutions with regard to ancestral haplotypes (C_1 and N_7). The same pattern has been observed in other helminth parasites after the introduction to new areas, including with *Echinococcus granulosus* in South America (Sharma *et al.*, 2013). Also, the exclusive haplotypes found in our samples generally contained only one substitution compared to the more frequent haplotypes. The neutrality test (table 1) and all the networks calculated for both genes obtaining a star-like model, indicating population expansion or lineage sorting (Avice, 2000).

The large number of haplotypes identified in our study may be associated with the optimal conditions for the intermediate host, since the landscape is formed by lowland areas with a large number of water sources (Dutra *et al.*, 2010; Bennema *et al.*, 2017). Epidemiological studies show that the dynamics of ruminant diseases should be combined with the understanding of climatological and environmental data, since these factors directly influence the continuity of the parasite cycle (Charlier *et al.*, 2016). Thus, we believe that, once brought into Americas, parasites faced numerous challenges (different climate and host adaptation). Accordingly, some local hosts may have offered ideal environments for parasite establishment. The lowlands of the Pampa region in the South of RS represents a complete habitat to the intermediate host, as well as being used to sustain large cattle herds.

The highest portion of the genetic diversity was found within populations (table 2), in accordance with population dynamics of the usual, definitive cattle host in this region, and could be due to cattle movement that contributes to the mixture of populations of *F. hepatica* within areas observed. However, an important proportion of genetic diversity of the species was found among groups

(flukes sampled in each Brazilian state comprised a different group). This observation can be explained by the limited cattle movement occurring between these two states, while the cattle movement within each state was considerably high. These findings are supported with calculated F_{CT} index (COI: 0.368; Nad1: 0.089) and F_{ST} (COI: 0.425; Nad1: 0.225) values, showing a geographic structuring among and within RS and PR samples.

In a study analysing flukes from the UK, Beesley *et al.* (2017) found that the widespread movement of definitive hosts could significantly contribute to the dispersal of *F. hepatica* variants, leading to the low F_{ST} values. Walker *et al.* (2011) reported low levels of genetic structure in fluke populations from the Netherlands.

The aforementioned study contrasts with our data; differences that are probably due to our wide geographical sampling area, differences in cattle migration/commerce and the timing of the establishment of fluke populations from South America, which were established more recently than those in Europe (supplementary tables S4 and S5).

Taken together, this comparison of nucleotide and Hd indicates that the colonization of Southern Brazil was made by several *F. hepatica* haplotypes. This agrees with a statement made by Ichikawa-Seki *et al.* (2016), arguing that the *F. hepatica* population in Peru was originated by numerous haplotypes, from multiple regions, but mainly originating from Europe.

Analysing the network tree constructed using the whole set of sequences, we observed a tree topology consisting of two main groups, with neither seeming to be characteristic of any specific region of the world. The great mixture among the samples suggests a high level of parasite circulation among populations from Europe, Asia and Africa. Moreover, this tree topology shows that the south Brazilian populations of *F. hepatica* were originated by at least three haplotypes shared by different areas of the world. The high dispersion capacity of the definitive hosts, i.e. dispersion caused by the transport of animals for breeding, demonstrates an increase in the dispersion of some parasite genotypes, which occasionally became more frequent, increasing opportunities for parasite adaptation and causing problems in the management of disease (Auld & Tinsley, 2015).

Our data regarding the genetic diversity of *F. hepatica* demonstrated that the parasite possesses a relatively high level of Hd, and presents a tree network topology with a great mixture in both lines of ancestral sequences mainly from Europe, Asia and Africa, and derivative population sequences from South America. This may be explained by the carriage of different variants of *F. hepatica* to the Americas through the introduction of infected animals. As *F. hepatica* faced intense circulation in Europe, Asia and Africa before the American colonization, our data cannot determine the exact centre of origin of our samples. The partition of the AMOVA and the value of F_{ST} support the lack of geographical structure in Brazil, which are in agreement with the observed cattle production systems in this region.

The molecular characterization of *F. hepatica* from Brazil can be used as a key factor to understand epidemiological aspects of the disease. In addition, understanding the geographical structuration observed in different regions, related to the fact that flukes can infect many mammals (including humans), may provide insights to aid local management and regional health programs designed to combat the parasites. Furthermore, nuclear markers, such as microsatellites or genes associated with parasite adaptation, should be used for future studies.

Supplementary material. To view supplementary material for this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000774>

Acknowledgements. The authors are grateful to DVM Daniela Gallas and DVM José Luis Teixeira for helping with the abattoir liver samplings. Jéssyca B. Schwantes received a Master of Science fellowship by CAPES.

Financial support. This study was funded by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul, FAPERGS (project number 16/ 2551-0000231-2).

Conflicts of interest. None.

References

- Auld SK and Tinsley MC (2015) The evolutionary ecology of complex lifecycle parasites: linking phenomena with mechanisms. *Heredity* 114, 125–132.
- Avice J (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA, Harvard University Press.
- Bandelt H, Forster P and Rohlf A (1999) Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37–48.
- Beesley NJ, Williams DJ, Paterson S and Hodgkinson J (2017) *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: Possible implications for drug resistance. *International Journal for Parasitology* 47, 11–20.
- Bennema SC, Scholte RGC, Molento MB, Medeiros C and Carvalho ODS (2014) *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial

- distribution. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 56, 35–41.
- Bennema SC, Molento MB, Scholte RG, Carvalho OS and Pritsch I (2017) Modelling the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in bovines using decision tree, logistic regression and GIS query approaches for Brazil. *Parasitology* 14, 1–9.
- Carnevale S, Malandrini JB, Pantano ML, Soria CC, Rodrigues-Silva R, Machado-Silva JR, Velásquez JN and Kamenetzky L (2017) First genetic characterization of *Fasciola hepatica* in Argentina by nuclear and mitochondrial gene markers. *Veterinary Parasitology* 245, 34–38.
- Charlier J, Ghebretinsae AH, Levecke B, Ducheyne E, Claerebout E and Vercruyse J (2016) Climate-driven longitudinal trends in pasture-borne helminth infections of dairy cattle. *International Journal for Parasitology* 46, 881–888.
- Dutra LH, Molento MB, Naumann CRC, Biondo AW, Fortes FS, Savio D and Malone JB (2010) Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Veterinary Parasitology* 169, 76–81.
- Elliott T, Muller A, Brockwell Y, Murphy N, Grillo V, Toet HM, Anderson G, Sangster N and Spithill TW (2014) Evidence for high genetic diversity of *NAD1* and *COX1* mitochondrial haplotypes among triclabendazole resistant and susceptible populations and field isolates of *Fasciola hepatica* (liver fluke) in Australia. *Veterinary Parasitology* 200, 90–96.
- Excoffier L and Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567.
- Green MR and Sambrook J (2012) *Molecular cloning – a laboratory manual*. 4th edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ichikawa-Seki M, Ortiz P, Cabrera M, Hobán C and Itagaki T (2016) Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola hepatica* from Peru. *Parasitology International* 65, 171–174.
- Ichikawa-Seki M, Shiroma T, Kariya T, Nakao R, Ohari Y, Hayashi K and Fukumoto S (2017) Molecular characterization of *Fasciola* flukes obtained from wild sika deer and domestic cattle in Hokkaido, Japan. *Parasitology International* 66, 519–521.
- Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo J, Terasaki K, Shibahara T and Fukuda K (2005) Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology* 131, 679–685.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5, a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 2496–2597.
- Lotfy WM, Brant SV, DeJong RJ, Le TH, Demiaszkiewicz A, Rajapakse RP, Perera VB, Laursen JR and Loker ES (2008) Evolutionary origins, diversification, and biogeography of Liver Flukes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79, 248–255.
- Mas-Coma S, Valero MA and Bargues MD (2009) Fasciola, Lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology* 69, 141–146.
- Mendes EA, Lima WS and De Melo AL (2008) Development of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* infected with miracidia derived from cattle and marmoset infections. *Journal of Helminthology* 82, 81–84.
- Molento MB, Bennema S, Bertot J, Pritsch IC and Arenal A (2017) Bovine fascioliasis in Brazil: Economic impact and forecasting. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 12, 1–3.
- Pritsch I and Molento MB (2018) Recount of reported cases of human fascioliasis in Brazil over the last 60 years. *Journal of Tropical Pathology* 47, 75–85.
- Semyenova SK, Morozova EV, Chrisanfova GG, Gorokhov VV, Arkhipov IA, Moskvina AS, Movsessyan SO and Ryskov AP (2006) Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial *Nad1* and *cox1* genes. *Journal of Parasitology* 92, 525–530.
- Sharma M, Fomda BA, Mazta S, Sehgal R, Singh BB and Malla N (2013) Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Echinococcus granulosus sensu stricto* complex based on mitochondrial DNA signature. *PLoS One* 8, e82904.
- Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* 5, 233–241.
- Walker SM, Johnston C, Hoey EM, Fairweather I, Borgsteede F, Gaasenbeek C, Prodöhl PA and Trudgett A (2011) Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. *Parasitology* 138, 215–223.

CAPITULO III – ARTIGO 2

Perfil genético de *Fasciola hepatica* em hospedeiros silvestres: o papel do hospedeiro definitivo

Schwantes, Jéssyca Bressan^{1,2}; de Paula, Adriano Alves²; Molento, Marcelo Beltrão³; Graichen, Daniel Ângelo Sganzerla^{1,2}

¹ Post-Graduate Program in Animal Biodiversity. Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima, 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 97105-900, Brazil

² Evolutionary Genetics Laboratory. Federal University of Santa Maria. Independência Avenue, 3751, 98300-000, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Laboratory of Parasitic Diseases, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, Paraná, CEP 80035-050, Brazil

Resumo

O trematódeo *Fasciola hepatica* é responsável pela zoonose chamada fasciolose. Esse parasito é cosmopolita, e tem uma grande gama de hospedeiros definitivos, tanto animais domésticos como silvestres, além de humanos como hospedeiros acidentais. Mamíferos silvestres podem apresentar alta taxa de prevalência, como por exemplo a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), espécie nativa do Brasil. Desta maneira, o objetivo deste trabalho é caracterizar geneticamente indivíduos de *Fasciola hepatica* de diferentes hospedeiros definitivos das Américas e do Velho Mundo para verificar agrupamentos de genótipos em hospedeiros específicos e o potencial dos animais silvestres como reservatórios desta zoonose. Foram analisadas 66 sequencias para o gene *COI*, das quais 10 de capivaras, além de 325 *NAD1* de diferentes hospedeiros definitivos. Os resultados não detectaram isolamento por hospedeiros, mas relação geográfica entre genótipos de *Fasciola hepatica*. A rede de haplótipos e distância genéticas dentro e entre os parasitos coletados de diferentes hospedeiros, mostraram que os grupos silvestres e domésticos da América do Sul compartilham o mesmo pool gênico de *F. hepatica*. Desta maneira torna-se necessário medidas de controle epidemiológico da doença principalmente em regiões de alta prevalência e diversidade de hospedeiros definitivos e intermediários, como a região Neotropical.

Palavras-chave: Fasciolose; animais silvestres; mtDNA

Abstract

The fluke *Fasciola hepatica* is responsible for the zoonosis called fasciolosis. This parasite is cosmopolitan and has a wide range of definitive hosts, both domestic and wild animals, as well as humans as accidental hosts. Wild mammals can have a high prevalence rate of this zoonosis, such as capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), a species native to Brazil. Thus, the objective of this work is to genetically characterize individuals of *Fasciola hepatica* from different definitive hosts in the Americas and the Old World to verify clusters of genotypes in specific hosts and the potential of wild animals as reservoirs of this zoonosis. 66 sequences for the *COI* gene were analyzed, 10 of them isolated from capybaras, in addition to 325 *NAD1* from different definitive hosts. The results did not detect isolation by hosts, but a geographical relationship between genotypes of *Fasciola hepatica*. The network of haplotypes and genetic distance within and between parasites collected from different hosts, showed that the wild and domestic groups of South America share the same gene pool of *F. hepatica*. Thus, it is necessary to adopt measures for the epidemiological control of the disease, especially in regions of high prevalence and diversity of definitive and intermediate hosts, such as the Neotropical region.

Keywords: Fasciolosis; wild animals; mtDNA

Introdução

O parasito *Fasciola hepatica* é um trematódeo de ciclo heteroxênico, dependente de hospedeiro intermediário molusco para completar seu ciclo de vida, e na fase adulta o parasito infecta uma ampla diversidade de mamíferos, assumindo assim uma distribuição cosmopolita. Este parasito é responsável por uma doença negligenciada chamada fasciolose, uma zoonose altamente patogênica e imunossupressora (Bargues, et al. 2017). Acredita-se que a introdução deste parasito e de um de seus hospedeiros intermediários *Galba truncatula* na América do Sul, ocorreu juntamente com o transporte de bovinos e ovinos vindos de colônias europeias em meados do século XVI (Mas-Coma, et al. 2009). O sucesso da parasitose nas Américas é decorrente da adaptação de *F. hepatica* a diferentes espécies de hospedeiros intermediários nativos da América do Sul, que permitiu ao parasito completar seu ciclo de vida no novo continente (Mas-Coma, et al. 2009).

No entanto, além de infectar ruminantes domésticos, o parasito foi eficiente na adaptação a outros mamíferos susceptíveis e, desta forma, estabeleceu novos hospedeiros definitivos em animais silvestres sul-americanos como, veados, preás, lhamas, alpacas, guanacos, e outros camelídeos. A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), espécie nativa do Brasil apresenta alta taxa de prevalência da doença. Devido ao fato de ter o seu hábito de vida semiaquático e ser herbívora, compartilha habitat com os hospedeiros intermediários da *F. hepatica*, aumentando assim a probabilidade de infecção, tornando-a um importante reservatório silvestre da parasitose (Carmona e Tort, 2017).

A *Fasciola hepatica* exibe uma grande capacidade de expansão populacional em novos habitats, parte devido a sua versatilidade para suportar diferentes ambientes e parte devido a capacidade de dispersão de seu hospedeiro intermediário. A conquista de novos ambientes implica na adaptação as novas condições (Martínez-Valladares e Rojo-Vázquez, 2014). Neste sentido, a velocidade de resposta às mudanças ambientais, impostas aos parasitos depende de sua variabilidade genética. Portanto, conhecer esta variabilidade pode nos permitir entender os processos históricos e demográficos contribuíram para a fixação de novas variantes genéticas.

Alguns marcadores moleculares neutros têm sido empregados para entender a filogenia de espécies, bem como a diversidade e estruturação genética das

populações, como é o caso dos marcadores mitocondriais. Schwantes et al. (2019) realizaram um estudo sobre a estruturação genética de *F. hepatica* parasitando bovinos em diferentes regiões do sul do Brasil, utilizando os marcadores moleculares de DNA mitocondrial, e salientaram que os parasitos das diferentes regiões apresentam uma associação geográfica. Essa caracterização pode auxiliar tanto no manejo dos animais domésticos quanto, no entendimento da heterogeneidade epidemiológica da doença (Schwantes, et al. 2019).

Atualmente, não existem informações suficientes sobre a diversidade genética em nível de populações de hospedeiros silvestres. Sabe-se, no entanto, que a formação de linhagens adaptadas a diferentes condições geográficas e hospedeiros é comum em parasitos (ex: *Trypanosoma*, Izeta-Alberd, et al. 2016), e que fatores como baixo fluxo gênico, autofecundação ou cruzamentos entre irmãos, e pequeno tamanho efetivo da população podem estar intimamente relacionados a estas adaptações (Esch e Fernandez, 2013).

Além disso, o papel dos reservatórios silvestres na transmissão da fasciolose ou sobre adaptações evolutivas destes parasitos não é claramente conhecido para novos hospedeiros das Américas. Com isso o objetivo deste trabalho é caracterizar molecularmente populações de *F. hepatica* parasitando hospedeiros definitivos silvestres e verificar a relação genética entre diferentes hospedeiros de *F. hepatica* das Américas e Velho Mundo, comparando-os com *Hydrochoerus hydrochaeris*.

Material e métodos

Amostragem e extração de DNA

Trematódeos adultos foram coletados de *Hydrochoerus hydrochaeris* mortos naturalmente no Parque Barigui, da cidade de Curitiba, Paraná. Além destas foram coletadas amostras fecais de capivaras em dois pontos no estado do Paraná, Parque Barigui (25°25'40.82"S, 49°18'27.64"O) e Fazenda Experimental Caguiari (25°23'12.33"S, 49° 7'41.81"O).

Para a limpeza e separação de ovos de *F. hepatica* das amostras fecais foi utilizada a técnica de 4 tamises (Girão e Ueno, 1985). Após a realização da técnica, o conteúdo foi fixado em álcool 70 % e posteriormente em PBS 1% (*Phosphate Buffered*

Saline) (Calvani, et al. 2017). Com as amostras fecais, foram realizadas buscas visuais por ovos de *Fasciola hepatica* em lupa estereoscópica com um aumento de 25x, e coletados em média 30 ovos por indivíduo. Os ovos foram armazenados em 50 µl Tris 10% a -20°C. Para realizar a ruptura dos ovos foram adicionados 10 µl de proteinase K (20 mg/ml) e colocados em banho maria a 60°C por 3h, e a cada 20min as amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos. Além deste protocolo também foi extraído DNA total das fezes utilizando o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit, conforme instruções do fabricante. Para as amostras adultas foi extraído DNA total utilizando o protocolo de fenol/clorofórmio de acordo com Green & Sambrook (2012).

Amplificação e sequenciamento

Foi amplificado um fragmento do gene mitocondrial *COI* utilizando os primers JB3 e JB4.5 descritos por Bowles et al. (1992), para as amostras coletadas de *Hydrochoerus hydrochaeris*. Para as amostras fecais foi utilizado de 1 até 2 µl de amostra e para as amostras adultas foi utilizado 1 µl. A amplificação foi realizada em termociclador utilizando as condições de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 95 °C por 50 s, anelamento de 53 °C por 50 s e extensão de 72 °C por 50 s , finalizando com extensão final de 72 °C por 10 min. Após a amplificação, o *amplicon* foi purificado utilizando precipitação por Polietilenoglicol (PEG) 13% e automaticamente sequenciado para ambas as direções utilizando BigDye terminator v3.1 no sequenciador Seqstudio Genetic Analyzer (ThermoFisher), conforme instruções do fabricante.

Análises dos dados

As edições dos eletroferogramas foram realizadas no pacote Staden (Staden, 1996) e as amostras tiveram a identidade confirmada por meio de BLASTn (NCBI). Todas as sequências para cada um de seus genes foram alinhadas separadamente utilizando o algoritmo ClustalW, implementado no programa Mega 7 (Kumar, et al. 2016).

Além destas, foram realizadas buscas no GenBank por sequências de *F. hepatica* de diferentes hospedeiros para os genes mitocondriais *COI* (Cytochrome

Oxidase Subunit 1) e *NAD1* (Nicotinamide Dehydrogenase Subunit 1), e assim os agrupando em seus respectivos hospedeiros.

As análises estatísticas foram realizadas para ambos os genes separadamente. Os índices de diversidade nucleotídica, haplotípica e número de haplótipos para cada grupo de hospedeiro e o teste D de *Tajima* foram gerados separadamente para animais domésticos da América e do Velho Mundo (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa domestica* e *Capra sp.*) e silvestres da América (*Hydrochoerus hydrochaeris*, *Odocoileus virginianus* e *Hippocamelus antisensis*) e do Velho Mundo (*Sylvicapra grimmia*, *Hippotragus niger*, *Equus sp.*, *Bubalus bubalis*, *Bison bonasus*) para essas análises utilizou-se o programa DNAsp 5.0 (Librado e Rozas, 2009).

No programa Mega 7 foram calculadas a distância genética (p-distance) dentro e entre os grupos, separados da mesma forma que a análise anterior. Essa análise resultará na proporção de sítios diferentes entre sequências dentro ou entre os grupos. A identificação, relação e frequências dos haplótipos para cada gene foi realizada utilizando o método de *medium joining* no programa Network 5.0 (Bandelt, et al. 1999).

Resultados

As sequências geradas a partir do sequenciamento de amostras coletadas de *Hydrochoerus hydrochaeris* apresentaram um tamanho de 306 pb para o gene *COI*, e 10 amostras foram positivas para *Fasciola hepatica* parasitando capivaras. Na comparação com sequências do GenBank todas mostraram identidade de no mínimo de 99% para o indivíduo MN006843.1 (bovino, Iraque). Complementarmente foi realizado download de 56 sequências de *Fasciola hepatica* de diferentes hospedeiros disponíveis no GenBank para gene *COI*. Já para o gene *NAD1* foram analisados 358 pb, em 327 sequências disponíveis no GenBank de *F. hepatica* em diferentes hospedeiros.

As análises com *COI* totalizaram 66 sequências, e 22 haplótipos foram encontrados, com uma diversidade haplotípica de 0.794 e nucleotídica de 0.005 (Tabela 1). Foram calculados os índices de diversidade separadamente para cada grupo de hospedeiro, as espécies domésticas do Velho Mundo obtiveram o maior índice de diversidade haplotípica (0.845) e nucleotídica (0.006), com 49 amostras e

18 haplótipos. Nas espécies silvestres de hospedeiros da América foram encontradas 13 sequências correspondentes a 3 haplótipos, com diversidade haplotípica de 0.295 e nucleotídica de 0.002. Entre os animais silvestres, a espécie *Hydrochoerus hydrochaeris* foi a mais representativa, sendo encontrados 3 haplótipos em 10 amostras, com diversidade haplotípica de 0.378 e nucleotídica de 0.003.

Com o gene *NAD1* foram analisadas 325 sequências e 59 haplótipos foram encontrados, com diversidade haplotípica de 0.767 e diversidade nucleotídica de 0.004, considerando todas as amostras sem distinguir hospedeiros (Tabela 2). A espécie *Bos taurus* da América teve 24 haplótipos encontrados em 194 sequências, com diversidade haplotípica de 0.671 e diversidade nucleotídica de 0.003 sendo o representante com o maior número de sequências disponíveis, seguido por *Ovis aries* do Velho Mundo com 71 sequências e 26 haplótipos, com diversidade haplotípica e nucleotídica de 0.882 e 0.006 respectivamente. Com os animais silvestres da América foram encontrados 2 haplótipos em 4 amostras, e os índices de diversidade foram 0.500 para diversidade haplotípica e 0.001 para nucleotídica, já com os animais silvestres do Velho Mundo, obtivemos um total de 21 amostras, onde foram encontrados 9 haplótipos, com diversidade haplotípica e nucleotídica de 0.852 e 0.005 respectivamente.

A distância p média encontrada entre as sequências dentro de cada grupo de hospedeiro para o gene *COI* variou de 0.007 em bovino América, e 0.003 dentro de *Hydrochoerus hydrochaeris* (Tabela 3). Comparando entre os grupos de hospedeiros domésticos do Velho Mundo, América e bovinos da América com a espécie *Hydrochoerus hydrochaeris* os valores calculados foram de 0.005 (Tabela 4). Já ao compararmos *Hydrochoerus hydrochaeris* com outros hospedeiros silvestres as maiores distâncias foram de 0.007 quando comparamos com as sequências de *Sylvicapra* e *Hippotragus* (Velho Mundo) e 0.001 entre as sequências de *Odocoileus* e *Hippocamelus* (América) (Tabela 5).

Os resultados de distancia- p para gene *NAD1* usando sequências dentro de cada grupo apresentou valor de 0.001 para animais domésticos e silvestres da América e a maior índice foi dentro de animais domésticos do Velho Mundo 0.006 (Tabela 3). Quando comparamos entre os grupos, o resultado foi de 0.003 entre o grupo de animais silvestres da América, com os silvestres do Velho Mundo, já ao compararmos o grupo de animais domésticos da América com os silvestres da mesma

região o valor foi de 0.001 e ao comparar com animais domésticos do Velho Mundo o resultado foi de 0.004 (Tabela 6).

A rede de haplótipos para o gene *COI* apresentou um modelo *starlike*, e 3 haplogrupos foram formados (Figura 1). O haplogrupo 1, teve um haplótipo mais frequente H_2, esse foi formado por amostras de *Sylvicapra grimmia*, *Hippotragus niger*, *Capra* sp., *Ovis aries* e *Bos taurus*, essas amostras tem o Velho Mundo como a sua origem, dois haplotipos deste haplogrupo foram exclusivos para hospedeiros diferentes, H_3 para *Capra* sp. e H_19 para *H. hydrochaeris*, sendo esse haplótipo o único representante da América, neste haplogrupo. Já no haplogrupo 2, o haplótipo mais frequente foi o H_1, com 28 amostras, estas foram divididas entre diferentes hospedeiros, *Bos taurus*, *Capra* sp., *Ovis aries*, *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Odocoileus virginianus* e *Hippocamelus antisensis*, alguns haplótipos foram exclusivos dois para *Bos taurus* e *Ovis aries*, um para *Capra* sp. e *H. hydrochaeris*, esse haplogrupo foi dividido entre amostras do Velho Mundo e América. O haplogrupo 3 foi formado exclusivamente por amostras de *Bos taurus*, neste haplogrupo a origem das amostras foi do Velho Mundo. Ao compararmos os animais silvestres haplogrupos 1 e 2, podemos salientar que ocorreu separação por áreas de ocorrência das espécies hospedeiras, com exceção de *Hydrochoerus hydrochaeris*, que foi presente em ambos os haplogrupos, mas com a sua maior frequência no haplótipo H_1 do haplogrupo 2, da qual contem animais de origem sul americana.

A relação haplotípica para o gene *NAD1* mostrou 3 haplogrupos e um modelo *starlike*, todos os haplogrupos apresentados tiveram representantes do Velho Mundo e América, no entanto, no haplogrupo 3, a frequência de amostras do Velho Mundo foi maior (Figura 2). O haplogrupo 1, teve um haplótipo mais frequente com 123 amostras (H_2) e esse haplótipo foi formado por *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Odocoileus virginianus*, *Hippocamelus antisensis*, *Equus* sp., *Capra* sp., *Sus scrofa domestica* e *Bubalus bubalis*. No haplogrupo 2 o haplótipo mais frequente foi o H_3 com 95 indivíduos, estes foram divididos em quatro espécies, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Bison bonasus* e *Hydrochoerus hydrochaeris*. O haplogrupo 3, teve o seu haplótipo mais frequente com 29 amostras (H_4) compartilhado com *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Bubalus bubalis* e *Capra* sp..

Ambas as redes de haplótipos mostraram um padrão *starlike*, o que indica expansão populacional, o que é corroborado com o teste D de Tajima, nos quais os

resultados foram negativos. *Fasciolas* da espécie *Hydrochoerus hydrochaeris* apresentaram valor de D de Tajima de -1.667 para o gene *COI*.

Discussão

A fase adulta de *Fasciola hepatica* é descrita parasitando os mais diferentes hospedeiros herbívoros e onívoros, desde mamíferos até aves (Vaughan, et al. 1997; Mas-Coma, et al. 2009). Os dados de diferenciação populacional obtidos neste estudo mostram relativa homogeneidade entre *Fasciolas* de diferentes hospedeiros.

Apesar de não detectarmos isolamento entre fascíolas de hospedeiros distintos, existe uma clara relação geográfica entre os parasitos de hospedeiros silvestres, de forma que *Fasciolas* de hospedeiros exclusivamente sul americanos como *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Odocoileus virginianus* e *Hippocamelus antisensis* são mais próximas geneticamente (Tabela 4; Tabela 6). Schwantes et al., (2019) salientaram que há estruturação genética entre os estados do Rio Grande do Sul e Paraná com *Fasciolas* de bovinos, mostrando que o isolamento se deve pelo baixo fluxo de animais de corte entre os dois estados devido a barreiras sanitárias legais.

O compartilhamento de 80% das amostras de capivaras principalmente com o bovinos (H_1 gene *COI*) mostra que, apesar de encontrarmos alguns haplótipos exclusivos em capivara (H_19 e H_20 gene *COI*), a infecção de *Fasciola hepatica* em *Hydrochoerus hydrochaeris* é recente e recorrente, esses resultados são corroborados com o teste de neutralidade, da qual sugere que as nossas amostras coletadas deste hospedeiro apresentam um padrão de expansão populacional (Awise, 2000; Schwantes, et al. 2019).

Os resultados das redes de haplótipos e das baixas distancias-*p* entre os grupos, mostrando que os grupos silvestres e domésticos da américa do sul compartilham o mesmo pool gênico de *F. hepatica* (Figura 1, Tabela 4; Tabela 5; Tabela 6). Levando em conta aspectos comportamentais de capivaras, e as suas adaptações para ambientes alterados, com os hábitos de defecação dentro ou nas margens de rios/açudes, faz com que *Hydrochoerus hydrochaeris* contribua para a manutenção do ciclo silvestre do parasito (Santarém, et al. 2006). Estas características comportamentais de capivara, juntamente com a grande abundância de ambientes favoráveis para que o ciclo se complete, torna necessário a

implementação de planos de manejo da fauna silvestre como medida necessária para o controle epidemiológico da zoonose.

Ao contrário do controle do trânsito em hospedeiros domésticos apresentado, especialmente em regiões focadas em produção (Schwantes, et al. 2019), os hospedeiros definitivos selvagens potenciais de *F. hepatica* não estão completamente isolados pela paisagem, e nem por delimitações políticas, com isso estão em frequente contato com rebanhos de animais infectados, facilitando a troca de genótipos de parasitos entre os hospedeiros (Silva Santos, et al. 1992), levando a uma grande mistura entre as populações de hospedeiros selvagens e domésticos.

A rede de haplótipos do gene *COI* de *Fasciola* em capivaras posicionou o haplótipo H_19 (gene *COI*) distante dos demais haplótipos de capivara, possuindo quatro substituições em relação ao haplótipo mais frequente (H_1) e cinco mutações para o haplótipo H_20 (Figura 1). Ao relacionarmos este haplótipo com outras sequências de *F. hepatica*, o H_19 teve relação de proximidade com o haplogrupo 1, que apresenta sequências de diferentes hospedeiros do Velho Mundo, da mesma maneira que a sequência de *Hydrochoerus hydrochaeris* para o gene *NAD1* (Figura 2). Esse resultado corrobora com a hipótese de resultante das múltiplas origens e ondas migratórias de *F. hepatica* para a América do Sul ao longo de 500 anos de colonização europeia (Mas-Coma, et al. 2009; Schwantes, et al. 2019).

Apesar da grande potencialidade de infecção de *F. hepatica* em capivaras, Labruna et al. 2018 sugere que a infecção pode ser extremamente letal para estes animais, com relatos de morte de 90% da população de capivara existente em um parque no estado de São Paulo. A alta patogenicidade apresentada em capivaras sugere que há uma relação parasito-hospedeira recente, da mesma forma que Caviidae e Cricetidae são descritos como animais de forma corporal insuficiente para desempenhar um papel de hospedeiro definitivo de *Fasciola hepatica* (Mas-Coma, et al. 2009).

A grande diversidade de hospedeiros definitivos para *Fasciola hepatica*, é um desafio na compreensão dos aspectos epidemiológicos de uma doença infecciosa, letal e negligenciada, como é o caso da fasciolose. Neste contexto, são necessárias medidas de controle mais amplas, com o objetivo de tratar hospedeiros definitivos domésticos mais frequentes e em áreas de alta prevalência, mas também tratar e implementar medidas de controle da zoonose na fauna silvestre, principalmente em

regiões de alta biodiversidade de potenciais hospedeiros definitivos como é o caso da região neotropical.

Referências bibliográficas

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.

Bargues, M. D., Gayo, V., Sanchis, J., Artigas, P., Khoubbane, M., Birriel, S., & Mas-Coma, S. (2017). DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(2), e0005352.

Bowles, J., Blair, D., & McManus, D. P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and biochemical parasitology*, 54(2), 165-173.

Calvani, N. E. D., Windsor, P. A., Bush, R. D., & Šlapeta, J. (2017). Scrambled eggs: a highly sensitive molecular diagnostic workflow for *Fasciola* species specific detection from faecal samples. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(9), e0005931.

Carmona, C., & Tort, J. F. (2017). Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. *Journal of helminthology*, 91(2), 99-109.

Esch, G. W., & Fernandez, J. C. (Eds.). (2013). *A functional biology of parasitism: Ecological and evolutionary implications*. Springer Science & Business Media.

Girão, E. S., & Ueno, H. (1985). Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 20(8), 905-912.

Green, M. R. & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning – a laboratory manual*. 4th edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Izeta-Alberdi, A., Ibarra-Cerdeña, C. N., Moo-Llanes, D. A., & Ramsey, J. M. (2016). Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasites & vectors*, 9(1), 631.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.

Labruna, M. B., Costa, F. B., Port-Carvalho, M., Oliveira, A. S., Souza, S. L. P., & Castro, M. B. (2018). Lethal fascioliasis in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *Journal of Parasitology*, 104(2), 173-176.

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

Martínez-Valladares, M., & Rojo-Vázquez, F. A. (2014). Intraspecific mitochondrial DNA variation of *Fasciola hepatica* eggs from sheep with different level of anthelmintic resistance. *Parasitology research*, 113(7), 2733-2741.

Mas-Coma, S., Valero, M. A., & Bargues, M. D. (2009). *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in parasitology*, 69, 41-146.

Santarém, V. A., Tostes, R. A., Alberti, H., & de Carvalho Sanches, O. (2006). *Fasciola hepatica* in capybara. *Acta tropica*, 98(3), 311-313.

Schwantes, J. B., Quevedo, P., D'Ávila, M. F., Molento, M. B., & Graichen, D. A. S. (2019). *Fasciola hepatica* in Brazil: genetic diversity provides insights into its origin and geographic dispersion. *Journal of helminthology*, 94.

Silva Santos, I. C., Scaini, C. J., & Rodrigues, L. A. F. (1992). *Myocastor coypus* (Rodentia: Capromyidae) como reservatório silvestre de *Fasciola hepatica* (Lineu, 1758). *Rev. Bras. Parasitol*, 1, 27-30.

Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular biotechnology*, 5(3), 233.

Vaughan, J. L., Charles, J. A., & Boray, J. C. (1997). *Fasciola hepatica* infection in farmed emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Australian veterinary journal*, 75(11), 811-813.

Tabela 1. Índices de diversidade de *Fasciola hepatica* para o gene *COI*.

Região	Hospedeiros	N	π	h	Hd	Tajima's D (P)
Velho Mundo	<i>Bos taurus</i>	38	0.005	14	0.862	-1.364 (> 0.10)
	<i>Ovis aries</i>	5	0.005	4	0.900	
	<i>Capra sp.</i>	6	0.006	4	0.867	
	<i>Hippotragus niger</i>	1	-	-	-	
	<i>Sylvicapra grimmia</i>	1	-	-	-	
	Domésticos	49	0.006	18	0.845	-1.643 (0.10 > P > 0.05)
	Silvestres	2	-	1	-	-
América	<i>Bos taurus</i>	2	0.007	2	1	
	<i>Odocoileus virginianus</i>	2	-	1	-	
	<i>Hippocamelus antisensis</i>	1	-	-	-	
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	10	0.003	3	0.378	-1.667 (0.10 > P > 0.05)
	Domésticos	2	0.007	2	1	-
	Silvestres	13	0.002	3	0.295	-1.775 (0.10 > P > 0.05)
	Todas as amostras		66	0.005	22	0.794

N= Número de amostras, π = Diversidade nucleotídica, h= Número de haplótipos e Hd= Diversidade haplotípica

Tabela 2. Índices de diversidade de *Fasciola hepatica* para o gene *NAD1*.

Região	Hospedeiros	N	Π	H	Hd	Tajima's D (P)
Velho Mundo	<i>Bos taurus</i>	19	0.005	10	0.906	-1.080 (> 0.10)
	<i>Ovis aries</i>	71	0.006	26	0.882	-2.196 (< 0.01)
	<i>Capra sp.</i>	4	0.005	4	1	
	<i>Bison bonasus</i>	6	0.005	4	0.800	
	<i>Equus sp.</i>	8	0.004	5	0.786	
	<i>Bubalus bubalis</i>	7	0.004	6	0.952	
	Domésticos	94	0.006	33	0.881	-2.321 (< 0.01)
	Silvestres	21	0.005	9	0.852	-1.440 (> 0.10)
América	<i>Bos taurus</i>	192	0.003	24	0.671	-2.279 (< 0.01)
	<i>Ovis aries america</i>	7	0.001	3	0.524	-1.237 (> 0.10)
	<i>Odocoileus virginianus</i>	2	-	1	-	
	<i>Hippocamelus antisensis</i>	1	-	-	-	
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	1	-	-	-	
	<i>Sus scrofa domestica</i>	7	0.002	4	0.810	
	Domésticos	206	0.003	25	0.665	-2.282 (< 0.01)
	Silvestres	4	0.001	2	0.500	-0.612 (> 0.10)
Todas As Amostras		325	0.004	59	0.767	-2.524 (< 0.001)

N= Número de amostras, π = Diversidade nucleotídica, h= Número de haplótipos e Hd= Diversidade haplotípica

Tabela 3. Distância- p dentro de cada grupo.

Grupo	COI	NAD1
Doméstico Velho Mundo	0.006	0.006
Doméstico América	-	0.001
Bovino Velho Mundo	0.006	0.005
Bovino América	0.007	0.003
Silvestre Velho Mundo	0.000	0.005
Silvestre América	0.000	0.001
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	0.003	-

Tabela 4. Distância-*p* entre os grupos utilizando o gene *COI*.

	1	2	3	4	5	6
1						
2	0.006					
3	0.007	0.007				
4	0.005	0.005	0.010			
5	0.004	0.005	0.004	0.007		
6	0.005	0.005	0.005	0.007	-	-

1.Doméstico Velho Mundo; 2 Bovino Velho Mundo; 3 Bovino América; 4 Silvestre Velho Mundo; 5 Silvestre América; 6 *Hydrochoerus hydrochaeris*

Tabela 5. Distância-*p* entre as espécies silvestres utilizando o gene *COI*.

	1	2	3	4	5
1					
2	0.001				
3	0.001	0.000			
4	0.007	0.007	0.007		
5	0.007	0.007	0.007	0.000	

1= *Hydrochoerus hydrochaeris*; 2 = *Odocoileus virginianus*; 3 = *Hippocamelus antisensis*; 4 = *Sylvicapra grimmia*; 5 = *Hippotragus niger*

Tabela 6. Distância-*p* entre os grupos utilizando o gene *NAD1*.

	1	2	3	4	5	6
1						
2	0.003					
3	0.005	0.004				
4	0.003	0.001	0.004			
5	0.005	0.003	0.005	0.003		
6	0.005	0.002	0.005	0.003	0.004	-

1. Silvestre Velho Mundo; 2 Silvestre América; 3 Doméstico Velho Mundo; 4 Doméstico América; 5 Bovino Velho Mundo; 6 Bovino América

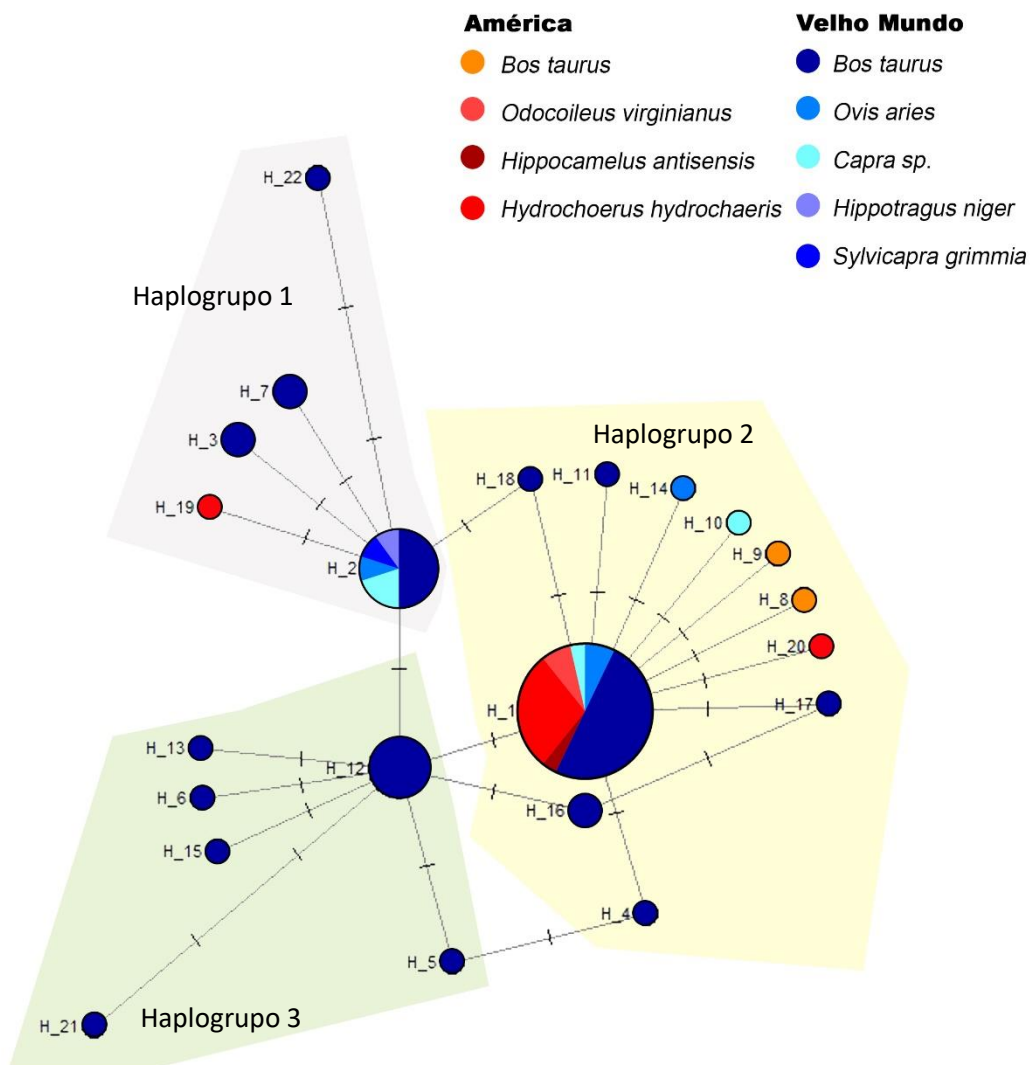


Figura 1. Rede de haplótipo de *Fasciola hepatica* para o gene *COI*. Os círculos representam os haplótipos, e os tamanhos dos mesmos representam a sua frequência, as linhas fazem a relação dos haplótipos e os traços dentro das linhas mostram os passos mutacionais que os diferenciam.

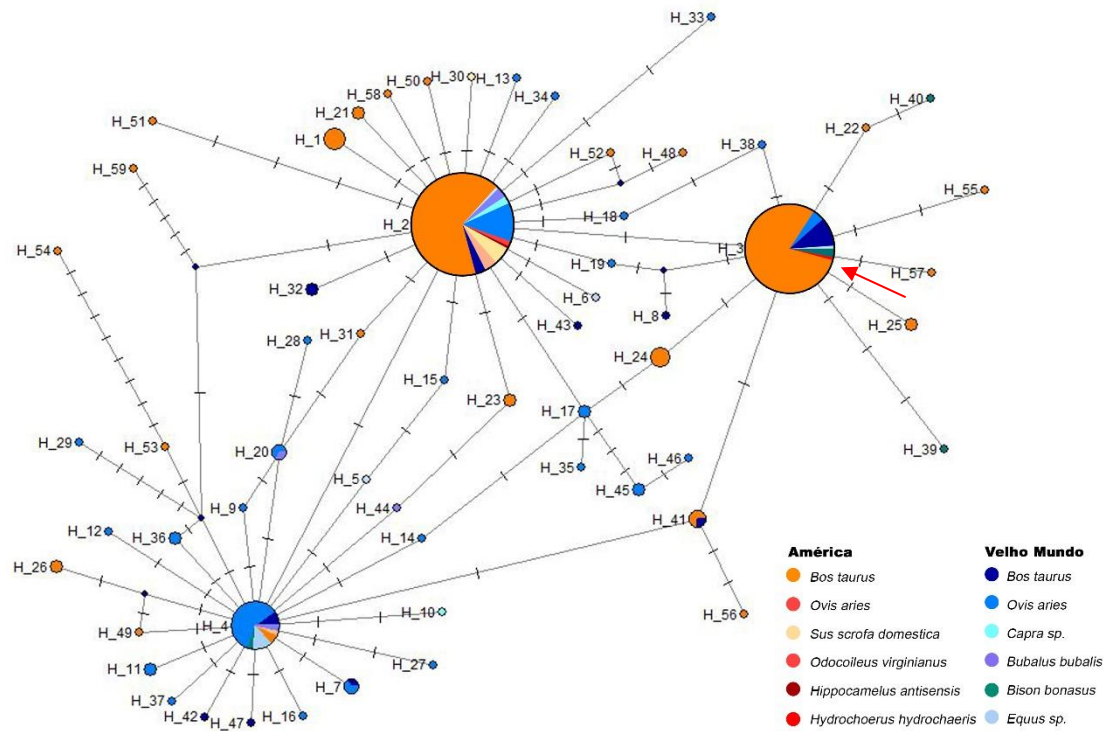


Figura 2. Rede de haplótipo de *Fasciola hepatica* para o gene *NAD1*. Os círculos representam os haplótipos, e os tamanhos dos mesmos representam a sua frequência, as linhas fazem a relação dos haplótipos e os traços dentro das linhas mostram os passos mutacionais que os diferenciam. Seta indica *Hydrochoerus hydrochaeris*.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho propôs-se a realizar a primeira caracterização molecular de populações de *Fasciola hepatica* no Brasil. Para conseguirmos entender a história deste parasito no Brasil, utilizamos uma amostragem ampla no estado de maior prevalência da doença, o Rio Grande do Sul. Da mesma maneira, as nossas coletas do parasito foram direcionadas a populações de *Fasciola* do hospedeiro de maior ocorrência, o bovino. Para avaliar se estaria ocorrendo estruturação genética dentro ou entre os estados brasileiros, utilizamos amostras do estado do Paraná para comparações. Os resultados desta pesquisa sugeriram que, múltiplas infecções de *F. hepatica* ocorreram no Brasil, da mesma forma que corroborou estudos anteriores, mostrando que há ao menos duas linhagens de *Fasciola hepatica* em todo o mundo. Além disso, nossos resultados mostraram que há estrutura geográfica em *F. hepatica*, enquanto dentro de cada estado as populações são semelhantes, devido ao alto trânsito destes animais, entre os estados do Rio Grande do Sul e Paraná os grupos se mostraram diferentes.

Ao estudarmos qual seria o papel dos hospedeiros definitivos na manutenção de diversidade genética de *Fasciola hepatica*, escolhemos amostrar em um animal nativo do Brasil, com grande prevalência da parasitose, a espécie *Hydrochoerus hydrochaeris*, mais conhecida como capivara. Nossos resultados com o gene *COI* mostraram que, *Fasciolas* de animais silvestres como a da capivara, compartilham do mesmo pool gênico dos animais domésticos, e que os aspectos geográficos são novamente importantes para a homogeneidade deste parasito, de maneira que *Fasciolas* de hospedeiros silvestres do Velho Mundo são mais distantes geneticamente de *F. hepatica* de hospedeiros da América.

Desta maneira, o controle da prevalência de *Fasciola hepatica* dentro dos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, e possivelmente de todo território brasileiro, deve realizar a implementação de planos de manejo desta zoonose tanto para os hospedeiros domésticos, como para os silvestres, principalmente nas regiões de alta potencialidade da doença e de possibilidade de novos hospedeiros definitivos.

Ao longo destes dois estudos nos deparamos com dificuldades na obtenção de amostras de para os animais silvestres, apesar de buscas em indivíduos atropelados e em amostras fecais, não tivemos sucesso para amostragens no Rio Grande do Sul, desta maneira este estudo se dirigiu a amostras obtidas no estado do Paraná. Muitas

de nossas amostras de *Fasciola hepatica* foram obtidas em amostras fecais, e ao optar por trabalhar com amostras extremamente contaminadas como as fezes dos animais, adicionamos dificuldades metodológicas ao projeto. Primeiramente, a procura dos ovos torna-se extremamente demorada, pois apesar de os ovos de *Fasciola* serem proporcionalmente grandes, a limpeza do material é sempre ineficiente e muitas impurezas não são eliminadas da preparação, e assim a visualização para a separação dos ovos fica dificultada (Figura 1). O segundo problema é a amplificação por PCR de amostras preparadas a partir de fezes. Tendo em vista que a extração de DNA apenas um ovo foi inviável, a realização da reação de PCR com uma amostragem de ovos de amostras fecais foi dificultada pela pouca quantidade de material genético e também pelos inibidores presentes nas amostras fecais. Além deste problemas amostrais, para as amostras de *F. hepatica* de capivara, os primers descritos para os genes mitocondriais descritos por Itagaki (2005) e utilizados no primeiro artigo desta dissertação, não resultavam em amplificação, mesmo que tentássemos diferente protocolos de amplificação e diferentes adjuvantes para as reações de PCR, como BSA (Albumina sérica bovina).



Figura 1. Obtenção de ovos de *Fasciola hepatica*. Seta indica a presença de ovo de *Fasciola hepatica*. Aumento de 25x em lupa estereoscópica.

Além dos estudos aqui descritos, realizamos a caracterização de quatro microssatélites descritos para *Fasciola hepatica* para populações brasileiras. Para a realização desta caracterização amostraremos diferentes populações de *Fasciola hepatica* para verificarmos o fluxo gênico entre essas populações. As reações para estes testes foram baseadas no trabalho de Cwiklinski et al. (2015), de onde foram escolhidos os fragmentos FH2 (TTGA), FH5 (ACT), FH6 (TAT) e FH10 (TAA), para a amplificação destes e a reação de PCR foi realizada conforme descritos por Cwiklinski et al. (2015). Até o presente momento foram realizadas as padronizações de reação para conseguir verificar o tamanho dos fragmentos. Essas padronizações foram realizadas em sequenciador de método de Sanger (Seqstudio Genetic Analyser Thermo Fisher) no Laboratório de Genética Evolutiva (UFSP/PM). Nossa análise preliminar identificou um total de 12 alelos para o FH2, 8 para FH5, 7 para FH6 e 9 alelos para FH10 (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização de quatro microssatélites para *Fasciola hepatica*.

	Localidade	N. A.	FH2		FH5		FH6		FH10	
			A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
1.	Arroio Grande	5	196	338	219	222	180		222	
2.	Arroio Grande	7	196		219	222	157		222	232
3.	Arroio Grande	10	196				157		213	
4.	Curitiba	297	196		219	222	177		237	
5.	Curitiba	344			219	222	180			
6.	Herval	319	196	218	168	173	201		228	235
7.	Ijuí	278	218	220					156	180
8.	Júlio De Castilhos	285	210	214	219	222	180		222	
9.	Júlio De Castilhos	290	214		213	222	177		222	
10.	Pejuçara	201	214				180		222	
11.	Pelotas	71	196	214	213	222	201		222	228
12.	Pelotas	77	214	322	219	222	157	201	228	
13.	Pelotas	78	196	330	168	222	157	180	222	228
14.	Santa Barbara Do Sul	249	196	326	177	212	157		222	
15.	Santa Barbara Do Sul	254			177	222	165	196	222	276
16.	Santo Cristo	358	322	326	219	222	180		222	
17.	Santo Cristo	358	322	326	219	222	180		222	
18.	São Borja	205	322	326	219	222	180		222	
19.	São Borja	203	322	326	219	222	180		222	228
20.	São Borja	260	196		222	225	201		228	
21.	São Borja	261	322	326	219	222	157	180	222	
22.	São Borja	262	196	214					228	
23.	Sta Vitoria Do Palmar	177	214	218	173	209	157	245	222	
24.	Sta Vitoria Do Palmar	178	196		219	222	180		222	232
25.	Sta Vitoria Do Palmar	180	214		222	225	157	180	222	
TOTAL DE ALELOS			12		8		7		9	

N.A. = Número da amostra; A1 = Alelo 1; A2 = Alelo 2

Para o Artigo 2, serão realizadas coletas em dois pontos do Rio Grande do Sul, na cidade de São Pedro do Butiá e na Estação Ecológica do Taim, nestes locais serão coletados fezes dos animais, e além disso devido ao alto índice de atropelamento, nós também iremos coletar capivaras mortas em torno do parque para necropsia (Sisbio 69526-3). Além destas coletas, estaremos testando a amplificação com o gene *NAD1* descrito por Bowles et al. 1992 para as amostras de capivara, da mesma forma que utilizaremos alguns exemplares do primeiro artigo para sequenciamento com esta região do *COI* para poder assim comparar também com nossas amostras dos estados do Rio Grande do Sul e Paraná. Para os microssatélites, estaremos amplificando todas as regiões do Rio Grande do Sul, juntamente com as amostras disponíveis do primeiro estudo do estado do Paraná, após a amplificação e identificação dos microssatélites, estaremos avaliando, número de alelos, frequência dos alelos, heterozigidade observada e esperada e equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Portanto, saliento a importância de mais estudos moleculares que caracterizem diferentes populações de parasitos zoonóticos para que desta forma, medidas de controle epidemiológico e manejo dos animais sejam mais efetivos, e que os ciclos das parasitoses se mantenham de forma controlada tanto nos animais domésticos, como nos selvagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agosta, S. J., & Klemens, J. A. (2008). Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecology Letters*, 11(11), 1123-1134.
- Andrews, S.J., (1999). In: Dalton, J.P. (Ed.), The Life Cycle of *Fasciola hepatica* in Fasciolosis. *CAB International*, pp. 1e29.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Bouznif, B., Guefrachi, I., Rodriguez de la Vega, R., Hungria, M., Mars, M., Alunni, B., & Shykoff, J. A. (2019). Phylogeography of the *Bradyrhizobium* spp. associated with peanut, *Arachis hypogaea*: Fellow travellers or new associations?. *Frontiers in microbiology*, 10, 2041.
- Bravo, M. J. (2013). Probables causas de muerte y principales hallazgos en la necropsia de pudues (*Pudu puda*) examinados durante 20 años en el sur de Chile. Tesis doctoral, Universidad Austral de Chile. 28p. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fvb826p/doc/fvb826p.pdf>
- Bruyndonckx, N., Dubey, S., Ruedi, M., & Christe, P. (2009). Molecular cophylogenetic relationships between European bats and their ectoparasitic mites (Acari, Spinturnicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51(2), 227-237.
- Cafrune, M. M., Aguirre, D. H., & Freytes, I. (2004). Fasciolosis en vicuñas (*Vicugna vicugna*) en semi-cautiverio de Molinos, Salta, Argentina, con notas de otros helmintos en este hospedador. *Vet Arg*, 21, 513-520.
- Carmona, C., & Tort, J. F. (2017). Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. *Journal of helminthology*, 91(2), 99-109.
- Dobson, A., Lafferty, K. D., Kuris, A. M., Hechinger, R. F., & Jetz, W. (2008). Homage to Linnaeus: how many parasites? How many hosts? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(Supplement 1), 11482-11489.
- Edwards, R., Vega, A., Norman, H., Ohaeri, M. C., Levi, K., Dinsdale, E., ... & Bibby, K. (2019). Global phylogeography and ancient evolution of the widespread human gut virus crAssphage. *bioRxiv*, 527796.
- El-Kouba, M. M., Marques, S. M., Pilati, C., & Hamann, W. (2009). Presence of *Fasciola hepatica* in feral nutria (*Myocastor coypus*) living in a public park in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 103-106.
- Flores, B., Pinedo, R., Suárez, F., Angelats, R., & Chávez, A. (2014). Prevalencia de fasciolosis en llamas y alpacas en dos comunidades rurales de Jauja, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(2), 276-283.

- Gazzinelli, A., Correa-Oliveira, R., Yang, G. J., Boatman, B. A., & Kloos, H. (2012). A research agenda for helminth diseases of humans: social ecology, environmental determinants, and health systems. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(4).
- Gomez-Puerta, L. A., Angulo-Tisoc, J. M., Pacheco, J. I., Lopez-Urbina, M. T., & Gonzalez, A. E. (2019). Infección natural por *Fasciola hepatica* en cérvidos del Perú. *Revista peruana de biología*, 26(1), 143-148.
- Hernández, Z., & González, S. (2012). Parasitological survey of the Uruguayan populations of wild Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* L. 1758). *Animal production science*, 52(8), 781-785.
- Labruna, M. B., Costa, F. B., Port-Carvalho, M., Oliveira, A. S., Souza, S. L. P., & Castro, M. B. (2018). Lethal fascioliasis in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *Journal of Parasitology*, 104(2), 173-176.
- Larroza, M., & Olaechea, F. (2010). Comparación de la morfología y la viabilidad de huevos de *Fasciola hepatica* en distintos hospedadores en Patagonia. *Veterinaria Argentina*, 27(268), 1-5.
- Led, J.E., Yannarella, F.G., Scasso, D.A. & Denegri, G.M. (1979) *Lagidium viscaccia* boxi nuevo reservorio silvestre de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) en la República Argentina. *Veterinaria* 2,31–39.
- Link, A., Valencia, L. M., Céspedes, L. N., Duque, L. D., Cadena, C. D., & Di Fiore, A. (2015). Phylogeography of the critically endangered brown spider monkey (*Ateles hybridus*): Testing the riverine barrier hypothesis. *International Journal of Primatology*, 36(3), 530-547.
- Lotfy, W. M., Brant, S. V., DeJong, R. J., Le, T. H., Demiaszkiewicz, A., Rajapakse, R. J., ... & Loker, E. S. (2008). Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(2), 248-255.
- Manrique, P., Miranda-Alban, J., Alarcon-Baldeon, J., Ramirez, R., Carrasco-Escobar, G., Herrera, H., ... & Escalante, A. A. (2019). Microsatellite analysis reveals connectivity among geographically distant transmission zones of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon: A critical barrier to regional malaria elimination. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(11).
- Martínez-Díaz, R. A., Martella, M. B., Navarro, J. L., & Ponce-Gordo, F. (2013). Gastrointestinal parasites in greater rheas (*Rhea americana*) and lesser rheas (*Rhea pennata*) from Argentina. *Veterinary parasitology*, 194(1), 75-78.
- Mas-Coma, S., Agramunt, V. H., & Valero, M. A. (2014). *Neurological and ocular fascioliasis in humans*. In *Advances in Parasitology* (Vol. 84, pp. 27-149). Academic Press.

- Meslin, F. X., Stohr, K., & Heymann, D. (2000). Public health implications of emerging zoonoses. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 19(1), 310-317.
- Moazeni, M., & Ahmadi, A. (2016). Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Experimental parasitology*, 169, 81-89.
- Molento, M. B., Bennema, S., Bertot, J., Pritsch, I. C., & Arenal, A. (2018). Bovine fascioliasis in Brazil: Economic impact and forecasting. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 12, 1-3.
- Morgan, E. R., Clare, E. L., Jefferies, R., & Stevens, J. R. (2012). Parasite epidemiology in a changing world: can molecular phylogeography help us tell the wood from the trees? *Parasitology*, 139(14), 1924-1938.
- Neves, D. P., & Filippis, T. D. (2014). *Parasitologia básica*. Rio de Janeiro: 3ª Edição. Atheneu.
- Petney, T. N. (2001). Environmental, cultural and social changes and their influence on parasite infections. *International Journal for Parasitology*, 31(9), 919-932.
- Postiglioni, R., Bidegaray-Batista, L., Simó, M., & Arnedo, M. A. (2019). Move to stay: genetic structure and demographic history of a wolf spider inhabiting coastal sand dunes of southern South America. *Systematics and Biodiversity*, 1-15.
- Rabajante, J. F., Tubay, J. M., Uehara, T., Morita, S., Ebert, D., & Yoshimura, J. (2015). Red Queen dynamics in multi-host and multi-parasite interaction system. *Scientific Reports*, 5, 10004.
- Santarém, V. A., Tostes, R. A., Alberti, H., & de Carvalho Sanches, O. (2006). *Fasciola hepatica* in capybara. *Acta tropica*, 98(3), 311-313.
- Toon, A., & Hughes, J. M. (2008). Are lice good proxies for host history? A comparative analysis of the Australian magpie, *Gymnorhina tibicen*, and two species of feather louse. *Heredity*, 101(2), 127-135.
- Töpf, A. L., Gilbert, M. T. P., Dumbacher, J. P., & Hoelzel, A. R. (2006). Tracing the phylogeography of human populations in Britain based on 4th–11th century mtDNA genotypes. *Molecular Biology and Evolution*, 23(1), 152-161.
- Weinstein, S. B., & Kuris, A. M. (2016). Independent origins of parasitism in Animalia. *Biology Letters*, 12(7), 20160324.

APÊNDICES

Material suplementar – Artigo 1

Journal of Helminthology

Fasciola hepatica in Brazil: genetic diversity provides insights of its origin and geographic dispersion

Jéssyca Bressan Schwantes ^{1, 2}; Pedro de Souza Quevedo ³; Marícia Fantinel D'Ávila ²; Marcelo Beltrão Molento ⁴; Daniel Angelo Sganzerla Graichen ^{1, 2}

Table S1. *Fasciola hepatica* samples with their respective geographic, haplotypic and GenBank accession numbers.

State	N	City	Number of the sample	Haplotype of COI	Haplotype of NAD1	Genbank COI	Genbank NAD1
Rio Grande do Sul	1.	Arroio Grande	1	COI_1	NAD_1	MK838613	MK838688
	2.	Arroio Grande	2	COI_1	NAD_1	MK838614	MK838689
	3.	Arroio Grande	3	COI_1	NAD_1	MK838615	MK838690
	4.	Arroio Grande	4	COI_1	NAD_1	MK838616	MK838691
	5.	Arroio Grande	5	COI_2	NAD_1	MK838617	MK838692
	6.	Arroio Grande	6	COI_9	NAD_2	MK838618	MK838693
	7.	Arroio Grande	7	COI_1	NAD_3	MK838619	MK838694
	8.	Arroio Grande	9	COI_1	NAD_4	MK838620	MK838695
	9.	Arroio Grande	10	COI_2	NAD_5	MK838621	MK838696
	10.	Camaquã	138	COI_3		MK838622	
	11.	Camaquã	139	COI_1	NAD_6	MK838623	MK838697
	12.	Camaquã	141		NAD_7		MK838698
	13.	Camaquã	142	COI_1	NAD_7	MK838624	MK838699
	14.	Camaquã	145	COI_2		MK838625	
	15.	Camaquã	146	COI_1	NAD_7	MK838626	MK838700
	16.	Canguçu	22	COI_6	NAD_8	MK838627	MK838701
	17.	Canguçu	23	COI_6		MK838628	
	18.	Canguçu	24		NAD_1		MK838702

19.	Santa Vitória do Palmar	177	COI_4	NAD_1	MK838629	MK838749
20.	Santa Vitória do Palmar	178	COI_1	NAD_7	MK838630	MK838750
21.	Santa Vitória do Palmar	179	COI_1	NAD_7	MK838631	MK838751
22.	Santa Vitória do Palmar	180	COI_1	NAD_7	MK838632	MK838752
23.	Santa Vitória do Palmar	181	COI_1	NAD_7	MK838633	MK838753
24.	Santa Vitória do Palmar	182	COI_1	NAD_7	MK838634	MK838754
25.	Pejuçara	195	COI_1	NAD_1	MK838635	MK838733
26.	Pejuçara	196	COI_1		MK838636	
27.	Pejuçara	197	COI_1	NAD_1	MK838637	MK838734
28.	Pejuçara	199	COI_1	NAD_1	MK838638	MK838735
29.	Pejuçara	200	COI_1	NAD_1	MK838639	MK838736
30.	Pejuçara	201	COI_1	NAD_1	MK838640	MK838737
31.	São Borja	202	COI_1	NAD_1	MK838641	MK838757
32.	São Borja	203	COI_5	NAD_24	MK838642	MK838758
33.	São Borja	204	COI_1	NAD_1	MK838643	MK838759
34.	São Borja	205	COI_1	NAD_1	MK838644	MK838760
35.	São Borja	213	COI_1	NAD_1	MK838645	MK838761
36.	São Borja	220	COI_5		MK838646	
37.	São Borja	221	COI_1	NAD_1	MK838647	MK838762
38.	São Borja	223	COI_1	NAD_1	MK838648	MK838763
39.	São Borja	259	COI_1		MK838659	
40.	São Borja	260	COI_1	NAD_1	MK838660	MK838764
41.	São Borja	261	COI_1	NAD_1	MK838661	MK838765
42.	São Borja	262	COI_5	NAD_24	MK838662	MK838766
43.	Palmeira das Missões	229	COI_1		MK838649	
44.	Palmeira das Missões	230	COI_1	NAD_1	MK838650	MK838727
45.	Palmeira das Missões	231	COI_1	NAD_1	MK838651	MK838728
46.	Palmeira das Missões	232	COI_1	NAD_1	MK838652	MK838729
47.	Palmeira das Missões	233	COI_1	NAD_1	MK838653	MK838730

48.	Palmeira das Missões	234	COI_1	NAD_1	MK838654	MK838731
49.	Palmeira das Missões	235	COI_1	NAD_18	MK838655	MK838732
50.	Santa Barbara do Sul	249	COI_1	NAD_20	MK838656	MK838743
51.	Santa Barbara do Sul	250		NAD_1		MK838744
52.	Santa Barbara do Sul	251		NAD_7		MK838745
53.	Santa Barbara do Sul	252		NAD_7		MK838746
54.	Santa Barbara do Sul	253	COI_1	NAD_21	MK838657	MK838747
55.	Santa Barbara do Sul	254	COI_1	NAD_22	MK838658	MK838748
56.	Ijuí	278	COI_1	NAD_16	MK838663	MK838715
57.	Júlio de Castilhos	285	COI_1	NAD_7	MK838664	MK838716
58.	Júlio de Castilhos	288	COI_1		MK838665	
59.	Júlio de Castilhos	289	COI_1		MK838666	
60.	Júlio de Castilhos	290	COI_1	NAD_17	MK838667	MK838717
61.	Júlio de Castilhos	291	COI_1	NAD_1	MK838668	MK838718
62.	Júlio de Castilhos	292	COI_5	NAD_1	MK838669	MK838719
63.	Júlio de Castilhos	293	COI_1	NAD_7	MK838670	MK838720
64.	Herval	314		NAD_10		MK838707
65.	Herval	316		NAD_11		MK838708
66.	Herval	317		NAD_12		MK838709
67.	Herval	318		NAD_13		MK838710
68.	Herval	319	COI_1	NAD_14	MK838678	MK838711
69.	Herval	320		NAD_15		MK838712
70.	Herval	321		NAD_13		MK838713
71.	Herval	322		NAD_7		MK838714
72.	Santo Cristo	358	COI_1	NAD_1	MK838681	MK838755
73.	Santo Cristo	359	COI_1	NAD_23	MK838682	MK838756
74.	Santo Cristo	360	COI_5		MK838683	

	75. Santo Cristo	361	COI_1		MK838684	
	76. Pelotas	71	COI_10	NAD_7	MK838685	MK838738
	77. Pelotas	73		NAD_19		MK838739
	78. Pelotas	77	COI_1	NAD_7	MK838686	MK838740
	79. Pelotas	78	COI_1	NAD_1	MK838687	MK838741
	80. Pelotas	93		NAD_1		MK838742
Paraná	81. Curitiba	297	COI_7	NAD_9	MK838671	MK838703
	82. Curitiba	298	COI_7	NAD_7	MK838672	MK838704
	83. Curitiba	299	COI_6		MK838673	
	84. Curitiba	300	COI_7	NAD_7	MK838674	MK838705
	85. Curitiba	332	COI_1		MK838679	
	86. Curitiba	344	COI_1	NAD_1	MK838680	MK838706
	87. Nova Prata do Iguaçu	301	COI_7	NAD_7	MK838675	MK838721
	88. Nova Prata do Iguaçu	302		NAD_7		MK838722
	89. Nova Prata do Iguaçu	303	COI_7	NAD_7	MK838676	MK838723
	90. Nova Prata do Iguaçu	304	COI_8	NAD_7	MK838677	MK838724
	91. Nova Prata do Iguaçu	305		NAD_7		MK838725
	92. Nova Prata do Iguaçu	306		NAD_7		MK838726

Table S2. Sequences of *Fasciola hepatica* for *COI* gene provided GenBank for network analysis.

	Number of access	Country	Gene
1.	AB207103.1	Australia	<i>COI</i>
2.	LC273025.1	Ecuador	<i>COI</i>
3.	LC273026.1	Ecuador	<i>COI</i>
4.	LC273027.1	Ecuador	<i>COI</i>
5.	LC273028.1	Ecuador	<i>COI</i>
6.	LC273029.1	Ecuador	<i>COI</i>
7.	LC273030.1	Ecuador	<i>COI</i>
8.	LC273031.1	Ecuador	<i>COI</i>
9.	LC273032.1	Ecuador	<i>COI</i>
10.	LC273033.1	Ecuador	<i>COI</i>
11.	LC273034.1	Ecuador	<i>COI</i>
12.	LC273035.1	Ecuador	<i>COI</i>
13.	LC273036.1	Ecuador	<i>COI</i>
14.	LC273037.1	Ecuador	<i>COI</i>
15.	LC273038.1	Ecuador	<i>COI</i>
16.	LC273039.1	Ecuador	<i>COI</i>
17.	LC273040.1	Ecuador	<i>COI</i>
18.	LC273041.1	Ecuador	<i>COI</i>
19.	LC273042.1	Ecuador	<i>COI</i>
20.	LC273043.1	Ecuador	<i>COI</i>
21.	LC273044.1	Ecuador	<i>COI</i>
22.	LC273045.1	Ecuador	<i>COI</i>
23.	LC273047.1	Ecuador	<i>COI</i>
24.	LC273048.1	Ecuador	<i>COI</i>
25.	LC273049.1	Ecuador	<i>COI</i>
26.	LC273050.1	Ecuador	<i>COI</i>
27.	LC273051.1	Ecuador	<i>COI</i>
28.	LC273052.1	Ecuador	<i>COI</i>
29.	LC273053.1	Ecuador	<i>COI</i>
30.	LC273054.1	Ecuador	<i>COI</i>
31.	LC273056.1	Ecuador	<i>COI</i>
32.	LC273057.1	Ecuador	<i>COI</i>
33.	LC273059.1	Ecuador	<i>COI</i>
34.	LC273060.1	Ecuador	<i>COI</i>
35.	LC273061.1	Ecuador	<i>COI</i>
36.	LC273062.1	Ecuador	<i>COI</i>
37.	LC273063.1	Ecuador	<i>COI</i>
38.	LC273064.1	Ecuador	<i>COI</i>
39.	LC273065.1	Ecuador	<i>COI</i>
40.	LC273066.1	Ecuador	<i>COI</i>
41.	LC273067.1	Ecuador	<i>COI</i>
42.	LC273068.1	Ecuador	<i>COI</i>
43.	LC273069.1	Ecuador	<i>COI</i>
44.	LC273070.1	Ecuador	<i>COI</i>
45.	LC273071.1	Ecuador	<i>COI</i>
46.	LC273072.1	Ecuador	<i>COI</i>
47.	LC273073.1	Ecuador	<i>COI</i>
48.	LC273074.1	Ecuador	<i>COI</i>
49.	LC273075.1	Ecuador	<i>COI</i>
50.	LC273076.1	Ecuador	<i>COI</i>
51.	LC273077.1	Ecuador	<i>COI</i>

52.	LC273078.1	Ecuador	COI
53.	LC273079.1	Ecuador	COI
54.	LC273080.1	Ecuador	COI
55.	LC273081.1	Ecuador	COI
56.	LC273082.1	Ecuador	COI
57.	LC273083.1	Ecuador	COI
58.	LC273084.1	Ecuador	COI
59.	LC273085.1	Ecuador	COI
60.	LC273086.1	Ecuador	COI
61.	LC273087.1	Ecuador	COI
62.	LC273088.1	Ecuador	COI
63.	LC273089.1	Ecuador	COI
64.	LC273090.1	Ecuador	COI
65.	LC273091.1	Ecuador	COI
66.	LC273092.1	Ecuador	COI
67.	LC273093.1	Ecuador	COI
68.	LC273094.1	Ecuador	COI
69.	LC273095.1	Ecuador	COI
70.	LC273096.1	Ecuador	COI
71.	LC273097.1	Ecuador	COI
72.	LC273098.1	Ecuador	COI
73.	LC273099.1	Ecuador	COI
74.	LC273100.1	Ecuador	COI
75.	LC273101.1	Ecuador	COI
76.	LC273102.1	Ecuador	COI
77.	LC273103.1	Ecuador	COI
78.	LC273104.1	Ecuador	COI
79.	LC273105.1	Ecuador	COI
80.	LC273106.1	Ecuador	COI
81.	LC273107.1	Ecuador	COI
82.	LC273108.1	Ecuador	COI
83.	LC273109.1	Ecuador	COI
84.	LC273110.1	Ecuador	COI
85.	LC273111.1	Ecuador	COI
86.	LC273112.1	Ecuador	COI
87.	LC273113.1	Ecuador	COI
88.	AB553812.1	Egypt	COI
89.	AB553813.1	Egypt	COI
90.	AB553814.1	Egypt	COI
91.	AB553817.1	Egypt	COI
92.	AB553818.1	Egypt	COI
93.	AB553824.1	Egypt	COI
94.	FJ895604.1	Iran	COI
95.	FJ895605.1	Iran	COI
96.	FJ895606.1	Iran	COI
97.	GQ398051.1	Iran	COI
98.	GQ398052.1	Iran	COI
99.	GQ398053.1	Iran	COI
100.	GQ398054.1	Iran	COI
101.	GQ398055.1	Iran	COI
102.	GQ398056.1	Iran	COI
103.	KF992216.1	Iran	COI
104.	KF992217.1	Iran	COI
105.	KF992218.1	Iran	COI

106.	KF992219.1	Iran	COI
107.	KF992220.1	Iran	COI
108.	KT893716.1	Iran	COI
109.	KT893717.1	Iran	COI
110.	KT893718.1	Iran	COI
111.	KT893719.1	Iran	COI
112.	KT893720.1	Iran	COI
113.	KT893721.1	Iran	COI
114.	KT893722.1	Iran	COI
115.	KT893723.1	Iran	COI
116.	KT893724.1	Iran	COI
117.	KT893725.1	Iran	COI
118.	MF537583.1	Iran	COI
119.	MF537584.1	Iran	COI
120.	MF537585.1	Iran	COI
121.	MF537586.1	Iran	COI
122.	MF537587.1	Iran	COI
123.	MF537588.1	Iran	COI
124.	MF537589.1	Iran	COI
125.	MF537590.1	Iran	COI
126.	MF788076.1	Iran	COI
127.	MF788077.1	Iran	COI
128.	MF788078.1	Iran	COI
129.	MF788079.1	Iran	COI
130.	MF788080.1	Iran	COI
131.	MF788081.1	Iran	COI
132.	MF788082.1	Iran	COI
133.	MF788083.1	Iran	COI
134.	MF788084.1	Iran	COI
135.	MF788085.1	Iran	COI
136.	MF788086.1	Iran	COI
137.	MF788087.1	Iran	COI
138.	MF788089.1	Iran	COI
139.	MF788091.1	Iran	COI
140.	MF788092.1	Iran	COI
141.	MF788093.1	Iran	COI
142.	MF788094.1	Iran	COI
143.	MF788095.1	Iran	COI
144.	MF788096.1	Iran	COI
145.	MF788097.1	Iran	COI
146.	MF788098.1	Iran	COI
147.	MF788099.1	Iran	COI
148.	MF788100.1	Iran	COI
149.	MF788101.1	Iran	COI
150.	MF788102.1	Iran	COI
151.	MF788103.1	Iran	COI
152.	MF788104.1	Iran	COI
153.	MF788105.1	Iran	COI
154.	MF788106.1	Iran	COI
155.	MF788107.1	Iran	COI
156.	MF788109.1	Iran	COI
157.	MF788110.1	Iran	COI
158.	MF788111.1	Iran	COI
159.	MF788112.1	Iran	COI

160.	MF788113.1	Iran	COI
161.	MF788114.1	Iran	COI
162.	MF788115.1	Iran	COI
163.	MF788116.1	Iran	COI
164.	MF788117.1	Iran	COI
165.	MF788118.1	Iran	COI
166.	MF788119.1	Iran	COI
167.	MF788120.1	Iran	COI
168.	MF788121.1	Iran	COI
169.	MG870566.1	Iran	COI
170.	MG987190.1	Iran	COI
171.	KJ716910.1	Peru	COI
172.	KJ716911.1	Peru	COI
173.	KJ716912.1	Peru	COI
174.	KJ716913.1	Peru	COI
175.	KJ716914.1	Peru	COI
176.	KJ716915.1	Peru	COI
177.	KJ716916.1	Peru	COI
178.	KJ716917.1	Peru	COI
179.	KJ716918.1	Peru	COI
180.	KJ716919.1	Peru	COI
181.	KJ716920.1	Peru	COI
182.	KJ716921.1	Peru	COI
183.	KJ716922.1	Peru	COI
184.	KJ716923.1	Peru	COI
185.	KJ716924.1	Peru	COI
186.	KJ852772.1	Peru	COI
187.	KT869169.1	Peru	COI
188.	KR422380.1	Poland	COI
189.	KR422381.1	Poland	COI
190.	KR422382.1	Poland	COI
191.	KR422383.1	Poland	COI
192.	KR422384.1	Poland	COI
193.	KR422385.1	Poland	COI
194.	KR422386.1	Poland	COI
195.	KR422387.1	Poland	COI
196.	KR422388.1	United Kingdom	COI
197.	AB207170.1	Uruguay	COI

Table S3. Sequences of *Fasciola hepatica* for *NAD1* gene provided GenBank for network analysis.

	Number of access	Country	Gene
1.	LC436788.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
2.	LC436789.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
3.	LC436790.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
4.	LC436791.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
5.	LC436792.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
6.	LC436793.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
7.	LC436794.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
8.	LC436795.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
9.	LC436796.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
10.	LC436797.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
11.	LC436798.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
12.	LC436799.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
13.	LC436801.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
14.	LC436802.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
15.	LC436803.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
16.	LC436804.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
17.	LC436805.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
18.	LC436806.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
19.	LC436807.1	Afghanistan	<i>NAD1</i>
20.	MF959486.1	Argentina	<i>NAD1</i>
21.	MF959487.1	Argentina	<i>NAD1</i>
22.	MF959488.1	Argentina	<i>NAD1</i>
23.	MF959489.1	Argentina	<i>NAD1</i>
24.	MF959490.1	Argentina	<i>NAD1</i>
25.	MF959491.1	Argentina	<i>NAD1</i>
26.	MF959492.1	Argentina	<i>NAD1</i>
27.	MF959493.1	Argentina	<i>NAD1</i>
28.	MF959494.1	Argentina	<i>NAD1</i>
29.	MF959495.1	Argentina	<i>NAD1</i>
30.	MF959496.1	Argentina	<i>NAD1</i>
31.	MF959497.1	Argentina	<i>NAD1</i>
32.	MF959498.1	Argentina	<i>NAD1</i>
33.	MF959499.1	Argentina	<i>NAD1</i>
34.	AB207155.1	Australia	<i>NAD1</i>
35.	AF216697.1	Australia	<i>NAD1</i>
36.	MF287675.1	Brazil	<i>NAD1</i>
37.	AB477357.1	China	<i>NAD1</i>
38.	AB477358.1	China	<i>NAD1</i>
39.	AB604926.1	China	<i>NAD1</i>
40.	AB604927.1	China	<i>NAD1</i>
41.	AB604929.1	China	<i>NAD1</i>
42.	AB604930.1	China	<i>NAD1</i>
43.	LC273114.1	Ecuador	<i>NAD1</i>
44.	LC273115.1	Ecuador	<i>NAD1</i>
45.	LC273116.1	Ecuador	<i>NAD1</i>
46.	LC273117.1	Ecuador	<i>NAD1</i>
47.	LC273118.1	Ecuador	<i>NAD1</i>
48.	LC273119.1	Ecuador	<i>NAD1</i>
49.	LC273120.1	Ecuador	<i>NAD1</i>
50.	LC273121.1	Ecuador	<i>NAD1</i>
51.	LC273122.1	Ecuador	<i>NAD1</i>

52.	LC273123.1	Ecuador	NAD1
53.	LC273124.1	Ecuador	NAD1
54.	LC273125.1	Ecuador	NAD1
55.	LC273126.1	Ecuador	NAD1
56.	LC273127.1	Ecuador	NAD1
57.	LC273128.1	Ecuador	NAD1
58.	LC273129.1	Ecuador	NAD1
59.	LC273130.1	Ecuador	NAD1
60.	LC273131.1	Ecuador	NAD1
61.	LC273132.1	Ecuador	NAD1
62.	LC273133.1	Ecuador	NAD1
63.	LC273134.1	Ecuador	NAD1
64.	LC273135.1	Ecuador	NAD1
65.	LC273136.1	Ecuador	NAD1
66.	LC273137.1	Ecuador	NAD1
67.	LC273138.1	Ecuador	NAD1
68.	LC273139.1	Ecuador	NAD1
69.	LC273140.1	Ecuador	NAD1
70.	LC273141.1	Ecuador	NAD1
71.	LC273142.1	Ecuador	NAD1
72.	LC273143.1	Ecuador	NAD1
73.	LC273144.1	Ecuador	NAD1
74.	LC273145.1	Ecuador	NAD1
75.	LC273146.1	Ecuador	NAD1
76.	LC273147.1	Ecuador	NAD1
77.	LC273148.1	Ecuador	NAD1
78.	LC273149.1	Ecuador	NAD1
79.	LC273150.1	Ecuador	NAD1
80.	LC273151.1	Ecuador	NAD1
81.	LC273152.1	Ecuador	NAD1
82.	LC273153.1	Ecuador	NAD1
83.	LC273154.1	Ecuador	NAD1
84.	LC273155.1	Ecuador	NAD1
85.	LC273156.1	Ecuador	NAD1
86.	LC273157.1	Ecuador	NAD1
87.	LC273158.1	Ecuador	NAD1
88.	LC273159.1	Ecuador	NAD1
89.	LC273160.1	Ecuador	NAD1
90.	LC273161.1	Ecuador	NAD1
91.	LC273162.1	Ecuador	NAD1
92.	LC273163.1	Ecuador	NAD1
93.	LC273164.1	Ecuador	NAD1
94.	LC273165.1	Ecuador	NAD1
95.	LC273166.1	Ecuador	NAD1
96.	LC273167.1	Ecuador	NAD1
97.	LC273168.1	Ecuador	NAD1
98.	LC273169.1	Ecuador	NAD1
99.	LC273170.1	Ecuador	NAD1
100.	LC273171.1	Ecuador	NAD1
101.	LC273172.1	Ecuador	NAD1
102.	LC273173.1	Ecuador	NAD1
103.	LC273174.1	Ecuador	NAD1
104.	LC273176.1	Ecuador	NAD1
105.	LC273177.1	Ecuador	NAD1

106.	LC273178.1	Ecuador	NAD1
107.	LC273179.1	Ecuador	NAD1
108.	LC273180.1	Ecuador	NAD1
109.	LC273181.1	Ecuador	NAD1
110.	LC273182.1	Ecuador	NAD1
111.	LC273183.1	Ecuador	NAD1
112.	LC273184.1	Ecuador	NAD1
113.	LC273185.1	Ecuador	NAD1
114.	LC273186.1	Ecuador	NAD1
115.	LC273187.1	Ecuador	NAD1
116.	LC273188.1	Ecuador	NAD1
117.	LC273189.1	Ecuador	NAD1
118.	LC273190.1	Ecuador	NAD1
119.	LC273191.1	Ecuador	NAD1
120.	LC273192.1	Ecuador	NAD1
121.	LC273193.1	Ecuador	NAD1
122.	LC273194.1	Ecuador	NAD1
123.	LC273195.1	Ecuador	NAD1
124.	LC273196.1	Ecuador	NAD1
125.	LC273197.1	Ecuador	NAD1
126.	LC273198.1	Ecuador	NAD1
127.	LC273199.1	Ecuador	NAD1
128.	LC273200.1	Ecuador	NAD1
129.	LC273201.1	Ecuador	NAD1
130.	LC273202.1	Ecuador	NAD1
131.	AB554177.1	Egypt	NAD1
132.	AB554178.1	Egypt	NAD1
133.	AB554179.1	Egypt	NAD1
134.	AB554180.1	Egypt	NAD1
135.	AB554181.1	Egypt	NAD1
136.	AB554182.1	Egypt	NAD1
137.	AB554183.1	Egypt	NAD1
138.	AB554184.1	Egypt	NAD1
139.	AB554185.1	Egypt	NAD1
140.	AB554186.1	Egypt	NAD1
141.	AB554187.1	Egypt	NAD1
142.	AB554188.1	Egypt	NAD1
143.	AB554189.1	Egypt	NAD1
144.	AB554190.1	Egypt	NAD1
145.	AB554191.1	Egypt	NAD1
146.	AB554192.1	Egypt	NAD1
147.	AB554193.1	Egypt	NAD1
148.	LC076248.1	Egypt	NAD1
149.	LC076249.1	Egypt	NAD1
150.	LC076250.1	Egypt	NAD1
151.	LC076251.1	Egypt	NAD1
152.	LC076252.1	Egypt	NAD1
153.	LC076253.1	Egypt	NAD1
154.	LC076254.1	Egypt	NAD1
155.	LC076255.1	Egypt	NAD1
156.	LC076256.1	Egypt	NAD1
157.	LC076257.1	Egypt	NAD1
158.	LC076258.1	Egypt	NAD1
159.	LC076259.1	Egypt	NAD1

160.	LC076260.1	Egypt	NAD1
161.	LC076261.1	Egypt	NAD1
162.	GQ175362.1	Iran	NAD1
163.	GQ175363.1	Iran	NAD1
164.	GQ175364.1	Iran	NAD1
165.	GQ356033.1	Iran	NAD1
166.	KF992222.1	Iran	NAD1
167.	KF992223.1	Iran	NAD1
168.	KF992224.1	Iran	NAD1
169.	KF992225.1	Iran	NAD1
170.	KF992226.1	Iran	NAD1
171.	KT893726.1	Iran	NAD1
172.	KT893727.1	Iran	NAD1
173.	KT893728.1	Iran	NAD1
174.	KT893729.1	Iran	NAD1
175.	KT893730.1	Iran	NAD1
176.	KT893731.1	Iran	NAD1
177.	KT893732.1	Iran	NAD1
178.	KT893733.1	Iran	NAD1
179.	KT893734.1	Iran	NAD1
180.	KT893735.1	Iran	NAD1
181.	KT893736.1	Iran	NAD1
182.	KT893737.1	Iran	NAD1
183.	KT893738.1	Iran	NAD1
184.	KT893739.1	Iran	NAD1
185.	KT893740.1	Iran	NAD1
186.	KT893741.1	Iran	NAD1
187.	KT893742.1	Iran	NAD1
188.	KT893743.1	Iran	NAD1
189.	KT893744.1	Iran	NAD1
190.	KX712321.1	Iran	NAD1
191.	KX712322.1	Iran	NAD1
192.	MF428470.1	Iran	NAD1
193.	MF428471.1	Iran	NAD1
194.	MF428473.1	Iran	NAD1
195.	MF428475.1	Iran	NAD1
196.	MF428476.1	Iran	NAD1
197.	MF428477.1	Iran	NAD1
198.	MF628261.1	Iran	NAD1
199.	MF628262.1	Iran	NAD1
200.	MF628263.1	Iran	NAD1
201.	MF628264.1	Iran	NAD1
202.	MF628265.1	Iran	NAD1
203.	MF628266.1	Iran	NAD1
204.	MF628267.1	Iran	NAD1
205.	MF628268.1	Iran	NAD1
206.	MG926383.1	Iran	NAD1
207.	MG926384.1	Iran	NAD1
208.	MG926385.1	Iran	NAD1
209.	MG926386.1	Iran	NAD1
210.	MG926387.1	Iran	NAD1
211.	MG926388.1	Iran	NAD1
212.	MG926389.1	Iran	NAD1
213.	MG926390.1	Iran	NAD1

214.	MG926391.1	Iran	NAD1
	MG926392.1	Iran	NAD1
215.	AB207156.1	Ireland	NAD1
216.	JF824675.1	Italy	NAD1
217.	JF824676.1	Italy	NAD1
218.	JF824677.1	Italy	NAD1
219.	JF824678.1	Italy	NAD1
220.	JF824679.1	Italy	NAD1
221.	KJ716895.1	Peru	NAD1
222.	KJ716896.1	Peru	NAD1
223.	KJ716897.1	Peru	NAD1
224.	KJ716898.1	Peru	NAD1
225.	KJ716899.1	Peru	NAD1
226.	KJ716900.1	Peru	NAD1
227.	KJ716901.1	Peru	NAD1
228.	KJ716902.1	Peru	NAD1
229.	KJ716903.1	Peru	NAD1
230.	KJ716904.1	Peru	NAD1
231.	KJ716905.1	Peru	NAD1
232.	KJ716906.1	Peru	NAD1
233.	KJ716907.1	Peru	NAD1
234.	KJ716908.1	Peru	NAD1
235.	KJ716909.1	Peru	NAD1
236.	KJ852771.1	Peru	NAD1
237.	LC070666.1	Peru	NAD1
238.	LC070667.1	Peru	NAD1
239.	LC070668.1	Peru	NAD1
240.	LC070669.1	Peru	NAD1
241.	LC070670.1	Peru	NAD1
242.	LC070671.1	Peru	NAD1
243.	LC070672.1	Peru	NAD1
244.	LC070673.1	Peru	NAD1
245.	KR422389.1	Poland	NAD1
246.	KR422390.1	Poland	NAD1
247.	KR422391.1	Poland	NAD1
248.	KR422392.1	Poland	NAD1
249.	KR422393.1	Poland	NAD1
250.	KR422394.1	Poland	NAD1
251.	KR422395.1	Poland	NAD1
252.	KR422396.1	Poland	NAD1
253.	KR422397.1	United Kingdom	NAD1
254.	AB207154.1	Uruguay	NAD1

Table S4. Population pairwise FSTs for *COI* gene of *Fasciola hepatica*.

	1 RS	2 RS	3 RS	4 RS	5 RS	6 RS	7 RS	8 RS	9 RS	10 RS	11 RS	12 RS	13 RS	14 PR	15 PR
1 RS	0														
1 RS	-0.14446	0													
2 RS	0.3151	0.28571	0												
3 RS	0.05263	0.02793	0.77099	0											
4 RS	0.00991	-0.03261	0.71084	0.01935	0										
6 RS	-0.77778	-1	1	-1	-1	0									
7 RS	-0.01613	-0.07143	0.67568	0.06897	0.01449	-1	0								
8 RS	0.07004	0.05255	0.79361	0.00201	-0.19658	-1	0.09677	0							
9 RS	-0.77778	-1	1	-1	-1	0	-1	-1	0						
10 RS	-0.08068	-0.13208	1	-0.15385	-0.09091	0	0	-0.16667	0	0					
11 RS	0.07374	0.07285	1	0.02778	0.15152	0	0.3	0	0	0	0				
12 RS	0.15196	0.14773	0.71765	0.09848	-0.2	-0.63636	0.15152	-0.08896	-0.63636	-0.02857	0.10954	0			
13 RS	0.05029	0.04	1	0	0.11111	0	0.25	-0.02439	0	0	0	0.08861	0		
14 PR	0.38537	0.36556	0.8125	0.70652	0.64021	0.5	0.6	0.73206	0.5	0.75	0.86538	0.7065	0.8481	0	
15 PR	0.16439	0.13505	0.46835	0.24	0.18904	-0.4	0.16923	0.26431	-0.4	0.14286	0.33333	0.31924	0.3	0.16923	0

1 RS: Arroio Grande; 2 RS: Camaquã; 3 RS: Canguçu; 4 RS: Herval; 5 RS: Ijuí; 6 RS: Julio de Castilhos; 7 RS: Palmeira das Missões; 8 RS: Pejuçara; 9 RS: Pelotas; 10 RS: Santa Bárbara do Sul; 11 RS: Santa Vitória do Palmar; 12 RS: Santo Cristo; 13 RS: São Borja; 14 PR: Curitiba; 15 PR: Nova Prata do Iguaçu.

Table S5. Population pairwise FSTs for *NAD1* gene for *Fasciola hepatica*.

	1 RS	2 RS	3 RS	4 RS	5 RS	6 RS	7 RS	8 RS	9 RS	10 RS	11 RS	12 RS	13 RS	14 PR	15 PR
1 RS	0														
1 RS	0.20165	0													
2 RS	-	-	0												
	0.12372	0.03226													
3 RS	0.10246	0.05524	-	0											
			0.02524												
4 RS	0.47297	-	0.71429	0.12442	0										
		0.11111													
6 RS	0.05044	-	-	-	-0.08	0									
		0.04214	0.18077	0.04813											
7 RS	-	0.28144	0.53846	0.14334	1	0.07692	0								
	0.02857														
8 RS	-	0.23077	0.47368	0.11833	1	0.03571	0	0							
	0.05596														
9 RS	0.04539	0.03377	0.02077	0.01733	0.5333	-	0.1683	0.125	0						
					3	0.03659	2								
10 RS	0.2206	0.01124	0.12658	-	0.1809	-	0.3384	0.2992	0.05926	0					
				0.03957	5	0.03987	6	9							
11 RS	0.30441	0.06103	0.64179	0.08345	0.8461	0.06975	0.8	0.7810	0.12916	0.0069	0				
					5			2							
12 RS	-	-	0	-	0.7142	-	0.5384	0.4736	0.02077	0.12658	0.64179	0			
	0.12372	0.03226		0.02524	9	0.18077	6	8							
13 RS	0.04782	0.37231	0.28082	0.22576	0.8888	0.17112	0.04	0.0123	0.20863	0.40295	0.66437	0.2808	0		
					9			5				2			
14 PR	0.19205	-	0.33333	0.00523	0.6	-0.0371	0.5932	0.5522	-	-	-	0.3333	0.5265	0	
		0.04348					2	4				3	4		
15 PR	0.41935	0.11111	0.87755	0.151	1	0.14286	1	1	0.34375	0.04444	0	0.8775	0.8153	0.1111	0
												5	8	1	

1 RS: Arroio Grande; 2 RS: Camaquã; 3 RS: Canguçu; 4 RS: Herval; 5 RS: Ijuí; 6 RS: Julio de Castilhos; 7 RS: Palmeira das Missões; 8 RS: Pejuçara; 9 RS: Pelotas; 10 RS: Santa Bárbara do Sul; 11 RS: Santa Vitória do Palmar; 12 RS: Santo Cristo; 13 RS: São Borja; 14 PR: Curitiba; 15 PR: Nova Prata do Iguaçu.

Material suplementar – Artigo 2

Perfil genético de *Fasciola hepatica* em hospedeiros silvestres: o papel do
hospedeiro definitivo

Schwantes, JB^{1,2}; de Paula, AA²; Molento, MB³; Graichen, DAS^{1,2}

Tabela S1. Sequencias utilizadas para as análises moleculares disponíveis no GenBank para o gene *COI*.

	<i>Number of access</i>	<i>Country</i>	<i>Host</i>
1.	AP017707.1	Genome	
2.	AB510491.1	Egypt	<i>Bos taurus</i>
3.	AJ628039.1	France	Goat
4.	AF216697.1	Australia	Genome
5.	MH681797.1	Peru	<i>Odocoileus virginianus</i>
6.	MH681796.1	Peru	<i>Odocoileus virginianus</i>
7.	MH681798.1	Peru	<i>Hippocamelus antisensis</i>
8.	AJ628037.1	China	Goat
9.	AJ628038.1	China	Goat
10.	AJ628036.1	China	Goat
11.	JF824672.1	Italy	<i>Bos taurus</i>
12.	JF824674.1	Italy	<i>Bos taurus</i>
13.	JF824670.1	Italy	<i>Bos taurus</i>
14.	AJ628034.1	China	<i>Bos taurus</i>
15.	AJ628035.1	China	Goat
16.	KJ200621.1	France	<i>Bos taurus</i>
17.	GU112454.1	Spain	<i>Bos taurus</i>
18.	MN006843.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
19.	GU112483.1	USA	<i>Bos taurus</i>
20.	GU112482.1	USA	<i>Bos taurus</i>
21.	GU112476.1	France	Goat
22.	GU112457.1	Spain	<i>Ovis aries</i>
23.	GQ121276.1	<i>Bos taurus</i>	Turkey
24.	MN006838.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
25.	MN006837.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
26.	MN006836.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
27.	MN006835.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
28.	KT182300.1	South Africa	<i>Bos taurus</i>
29.	KT182299.1	South Africa	<i>Bos taurus</i>
30.	KT182298.1	South Africa	<i>Bos taurus</i>
31.	KT182297.1	South Africa	<i>Bos taurus</i>
32.	KT182296.1	South Africa	<i>Bos taurus</i>

33.	GQ231549.1	Algeria	<i>Ovis aries</i>
34.	GQ231548.1	Tunisia	<i>Ovis aries</i>
35.	MN006839.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
36.	KX470584.1	Egypt	<i>Bos taurus</i>
37.	MN006842.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
38.	MN006841.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
39.	MK212144.1	Algeria	<i>Bos taurus</i>
40.	MK212142.1	Algeria	<i>Bos taurus</i>
41.	GQ231551.1	Tunisia	<i>Ovis aries</i>
42.	MN006840.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
43.	MN006834.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
44.	MN006833.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
45.	MK212147.1	Algeria	<i>Bos taurus</i>
46.	MK212146.1	Algeria	<i>Bos taurus</i>
47.	KT182261.1	South Africa	<i>Bos taurus</i>
48.	KT182260.1	South Africa	<i>Bos taurus</i>
49.	KT182259.1	Zimbabwe	<i>Sylvicapra grimmia</i>
50.	KT182258.1	Zimbabwe	<i>Hippotragus niger</i>
51.	GQ231550.1	Tunisia	<i>Ovis aries</i>
52.	MN006844.1	Iraq	<i>Bos taurus</i>
53.	MK212143.1	Algeria	<i>Bos taurus</i>
54.	MK212148.1	Algeria	<i>Bos taurus</i>
55.	MK212145.1	Algeria	<i>Bos taurus</i>
56.	FJ469984.1	Niger	<i>Bos taurus</i>

Tabela S2. Sequencias utilizadas para as análises moleculares disponíveis no GenBank para o gene *NAD1*.

	<i>Number of access</i>	<i>Country</i>	<i>Host</i>
1.	KR422389.1	Poland	<i>Bison bonasus</i>
2.	KR422390.1	Poland	<i>Bison bonasus</i>
3.	KR422391.1	Poland	<i>Bison bonasus</i>
4.	KR422392.1	Poland	<i>Bison bonasus</i>
5.	KR422393.1	Poland	<i>Bison bonasus</i>
6.	KR422394.1	Poland	<i>Bison bonasus</i>
7.	AB207154.1	Uruguay	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
8.	AB477357.1	China	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
9.	AB477358.1	China	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
10.	AB604926.1	China	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
11.	AB604927.1	China	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
12.	AB604929.1	China	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
13.	AB604930.1	China	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
14.	KJ716895.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
15.	KJ716896.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
16.	KJ716897.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
17.	KJ716898.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
18.	KJ716899.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
19.	KX712321.1	Iran	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
20.	KX712322.1	Iran	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
21.	LC070666.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
22.	LC070667.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
23.	LC070668.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
24.	LC070669.1	Peru	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
25.	LC273114.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
26.	LC273115.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
27.	LC273116.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
28.	LC273117.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
29.	LC273118.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
30.	LC273119.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
31.	LC273120.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
32.	LC273121.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
33.	LC273122.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
34.	LC273123.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
35.	LC273124.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
36.	LC273125.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
37.	LC273126.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
38.	LC273127.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
39.	LC273128.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
40.	LC273129.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
41.	LC273130.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
42.	LC273131.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>
43.	LC273132.1	Ecuador	<i>Bos taurus (Cattle)</i>

44.	LC273133.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
45.	LC273134.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
46.	LC273135.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
47.	LC273136.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
48.	LC273137.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
49.	LC273138.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
50.	LC273139.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
51.	LC273140.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
52.	LC273141.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
53.	LC273142.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
54.	LC273143.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
55.	LC273144.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
56.	LC273145.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
57.	LC273146.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
58.	LC273147.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
59.	LC273148.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
60.	LC273149.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
61.	LC273150.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
62.	LC273151.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
63.	LC273152.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
64.	LC273153.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
65.	LC273154.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
66.	LC273155.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
67.	LC273156.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
68.	LC273157.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
69.	LC273158.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
70.	LC273159.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
71.	LC273160.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
72.	LC273161.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
73.	LC273162.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
74.	LC273163.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
75.	LC273164.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
76.	LC273165.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
77.	LC273166.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
78.	LC273167.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
79.	LC273168.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
80.	LC273169.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
81.	LC273170.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
82.	LC273171.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
83.	LC273172.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
84.	LC273173.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
85.	LC273174.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
86.	LC273176.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
87.	LC273177.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
88.	LC273178.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
89.	LC273179.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
90.	LC273180.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
91.	LC273181.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
92.	LC273182.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
93.	LC273183.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)

94.	LC273184.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
95.	LC273185.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
96.	LC273186.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
97.	LC273187.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
98.	LC273188.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
99.	LC273189.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
100.	LC273190.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
101.	LC273191.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
102.	LC273192.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
103.	LC273193.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
104.	LC273194.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
105.	LC273195.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
106.	LC273196.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
107.	LC273197.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
108.	LC273198.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
109.	LC273199.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
110.	LC273200.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
111.	LC273201.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
112.	LC273202.1	Ecuador	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
113.	MF959486.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
114.	MF959487.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
115.	MF959488.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
116.	MF959489.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
117.	MF959490.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
118.	MF959491.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
119.	MF959492.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
120.	MF959493.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
121.	MF959494.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
122.	MF959495.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
123.	MF959496.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
124.	MF959497.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
125.	MF959498.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
126.	MF959499.1	Argentina	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
127.	AB554177.1	Egypt	<i>Bubalus bubalis</i>
128.	AB554178.1	Egypt	<i>Bubalus bubalis</i>
129.	AB554189.1	Egypt	<i>Bubalus bubalis</i>
130.	AB554190.1	Egypt	<i>Bubalus bubalis</i>
131.	AB554191.1	Egypt	<i>Bubalus bubalis</i>
132.	AB554192.1	Egypt	<i>Bubalus bubalis</i>
133.	AB554193.1	Egypt	<i>Bubalus bubalis</i>
134.	AB207155.1	Australia	Cattle
135.	AB207156.1	Ireland	Cattle
136.	JF824675.1	Italy	Cattle
137.	JF824676.1	Italy	Cattle
138.	JF824677.1	Italy	Cattle
139.	JF824678.1	Italy	Cattle
140.	JF824679.1	Italy	Cattle
141.	KF992222.1	Iran	Cattle
142.	KT893729.1	Iran	Cattle
143.	KT893744.1	Iran	Cattle

144.	MF428473.1	Iran	<i>Cattle</i>
145.	MF428475.1	Iran	<i>Cattle</i>
146.	MF428476.1	Iran	<i>Cattle</i>
147.	MK838688	Brazil	<i>Cattle</i>
148.	MK838689	Brazil	<i>Cattle</i>
149.	MK838690	Brazil	<i>Cattle</i>
150.	MK838691	Brazil	<i>Cattle</i>
151.	MK838692	Brazil	<i>Cattle</i>
152.	MK838693	Brazil	<i>Cattle</i>
153.	MK838694	Brazil	<i>Cattle</i>
154.	MK838695	Brazil	<i>Cattle</i>
155.	MK838696	Brazil	<i>Cattle</i>
156.	MK838697	Brazil	<i>Cattle</i>
157.	MK838698	Brazil	<i>Cattle</i>
158.	MK838699	Brazil	<i>Cattle</i>
159.	MK838700	Brazil	<i>Cattle</i>
160.	MK838701	Brazil	<i>Cattle</i>
161.	MK838702	Brazil	<i>Cattle</i>
162.	MK838703	Brazil	<i>Cattle</i>
163.	MK838704	Brazil	<i>Cattle</i>
164.	MK838705	Brazil	<i>Cattle</i>
165.	MK838706	Brazil	<i>Cattle</i>
166.	MK838707	Brazil	<i>Cattle</i>
167.	MK838708	Brazil	<i>Cattle</i>
168.	MK838709	Brazil	<i>Cattle</i>
169.	MK838710	Brazil	<i>Cattle</i>
170.	MK838711	Brazil	<i>Cattle</i>
171.	MK838712	Brazil	<i>Cattle</i>
172.	MK838713	Brazil	<i>Cattle</i>
173.	MK838714	Brazil	<i>Cattle</i>
174.	MK838715	Brazil	<i>Cattle</i>
175.	MK838716	Brazil	<i>Cattle</i>
176.	MK838717	Brazil	<i>Cattle</i>
177.	MK838718	Brazil	<i>Cattle</i>
178.	MK838719	Brazil	<i>Cattle</i>
179.	MK838720	Brazil	<i>Cattle</i>
180.	MK838721	Brazil	<i>Cattle</i>
181.	MK838722	Brazil	<i>Cattle</i>
182.	MK838723	Brazil	<i>Cattle</i>
183.	MK838724	Brazil	<i>Cattle</i>
184.	MK838725	Brazil	<i>Cattle</i>
185.	MK838726	Brazil	<i>Cattle</i>
186.	MK838727	Brazil	<i>Cattle</i>
187.	MK838728	Brazil	<i>Cattle</i>
188.	MK838729	Brazil	<i>Cattle</i>
189.	MK838730	Brazil	<i>Cattle</i>
190.	MK838731	Brazil	<i>Cattle</i>
191.	MK838732	Brazil	<i>Cattle</i>
192.	MK838733	Brazil	<i>Cattle</i>
193.	MK838734	Brazil	<i>Cattle</i>

194.	MK838735	Brazil	<i>Cattle</i>
195.	MK838736	Brazil	<i>Cattle</i>
196.	MK838737	Brazil	<i>Cattle</i>
197.	MK838738	Brazil	<i>Cattle</i>
198.	MK838739	Brazil	<i>Cattle</i>
199.	MK838740	Brazil	<i>Cattle</i>
200.	MK838741	Brazil	<i>Cattle</i>
201.	MK838742	Brazil	<i>Cattle</i>
202.	MK838743	Brazil	<i>Cattle</i>
203.	MK838744	Brazil	<i>Cattle</i>
204.	MK838745	Brazil	<i>Cattle</i>
205.	MK838746	Brazil	<i>Cattle</i>
206.	MK838747	Brazil	<i>Cattle</i>
207.	MK838748	Brazil	<i>Cattle</i>
208.	MK838749	Brazil	<i>Cattle</i>
209.	MK838750	Brazil	<i>Cattle</i>
210.	MK838751	Brazil	<i>Cattle</i>
211.	MK838752	Brazil	<i>Cattle</i>
212.	MK838753	Brazil	<i>Cattle</i>
213.	MK838754	Brazil	<i>Cattle</i>
214.	MK838755	Brazil	<i>Cattle</i>
215.	MK838756	Brazil	<i>Cattle</i>
216.	MK838757	Brazil	<i>Cattle</i>
217.	MK838758	Brazil	<i>Cattle</i>
218.	MK838759	Brazil	<i>Cattle</i>
219.	MK838760	Brazil	<i>Cattle</i>
220.	MK838761	Brazil	<i>Cattle</i>
221.	MK838762	Brazil	<i>Cattle</i>
222.	MK838763	Brazil	<i>Cattle</i>
223.	MK838764	Brazil	<i>Cattle</i>
224.	MK838765	Brazil	<i>Cattle</i>
225.	MK838766	Brazil	<i>Cattle</i>
226.	MF628261.1	Iran	<i>Donkey</i>
227.	MF628262.1	Iran	<i>Donkey</i>
228.	MF628263.1	Iran	<i>Donkey</i>
229.	MF628264.1	Iran	<i>Donkey</i>
230.	MF628265.1	Iran	<i>Donkey</i>
231.	MF628266.1	Iran	<i>Donkey</i>
232.	MF628267.1	Iran	<i>Donkey</i>
233.	MF628268.1	Iran	<i>Donkey</i>
234.	KF992225.1	Iran	<i>Goat</i>
235.	KF992226.1	Iran	<i>Goat</i>
236.	MF428470.1	Iran	<i>Goat</i>
237.	K468855.1	Iran	<i>Goat</i>
238.	MH681801.1	Peru	<i>Hippocamelus_antisensis</i>
239.	MF287675.1	Brazil	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>
240.	MH681799.1	Peru	<i>Odocoileus virginianus</i>
241.	MH681800.1	Peru	<i>Odocoileus virginianus</i>
242.	AB554179.1	Egypt	<i>Ovis aries (Sheep)</i>

243.	AB554180.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
244.	AB554181.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
245.	AB554182.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
246.	AB554183.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
247.	AB554184.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
248.	AB554185.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
249.	AB554186.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
250.	AB554187.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
251.	AB554188.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
252.	GQ175363.1	Iran	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
253.	GQ175364.1	Iran	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
254.	GQ356033.1	Iran	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
255.	KJ716900.1	Peru	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
256.	KJ716901.1	Peru	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
257.	KJ716902.1	Peru	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
258.	KJ716903.1	Peru	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
259.	KJ716904.1	Peru	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
260.	KR422395.1	Poland	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
261.	KR422396.1	Poland	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
262.	KR422397.1	United Kingdom	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
263.	LC070670.1	Peru	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
264.	LC070672.1	Peru	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
265.	LC076248.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
266.	LC076249.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
267.	LC076250.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
268.	LC076251.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
269.	LC076252.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
270.	LC076253.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
271.	LC076254.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
272.	LC076255.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
273.	LC076256.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
274.	LC076257.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
275.	LC076258.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
276.	LC076259.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
277.	LC076260.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
278.	LC076261.1	Egypt	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
279.	LC436788.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
280.	LC436789.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
281.	LC436790.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
282.	LC436791.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
283.	LC436792.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
284.	LC436793.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
285.	LC436794.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
286.	LC436795.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
287.	LC436796.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
288.	LC436797.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
289.	LC436798.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
290.	LC436799.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
291.	LC436801.1	Afghanistan	<i>Ovis aries</i> (Sheep)

292.	LC436802.1	Afghanistan	<i>Ovis aries (Sheep)</i>
293.	LC436803.1	Afghanistan	<i>Ovis aries (Sheep)</i>
294.	LC436804.1	Afghanistan	<i>Ovis aries (Sheep)</i>
295.	LC436805.1	Afghanistan	<i>Ovis aries (Sheep)</i>
296.	LC436806.1	Afghanistan	<i>Ovis aries (Sheep)</i>
297.	LC436807.1	Afghanistan	<i>Ovis aries (Sheep)</i>
298.	KF992223.1	Iran	<i>Sheep</i>
299.	KF992224.1	Iran	<i>Sheep</i>
300.	KT893726.1	Iran	<i>Sheep</i>
301.	KT893727.1	Iran	<i>Sheep</i>
302.	KT893728.1	Iran	<i>Sheep</i>
303.	KT893730.1	Iran	<i>Sheep</i>
304.	KT893731.1	Iran	<i>Sheep</i>
305.	KT893732.1	Iran	<i>Sheep</i>
306.	KT893733.1	Iran	<i>Sheep</i>
307.	KT893734.1	Iran	<i>Sheep</i>
308.	KT893735.1	Iran	<i>Sheep</i>
309.	KT893736.1	Iran	<i>Sheep</i>
310.	KT893737.1	Iran	<i>Sheep</i>
311.	KT893738.1	Iran	<i>Sheep</i>
312.	KT893739.1	Iran	<i>Sheep</i>
313.	KT893740.1	Iran	<i>Sheep</i>
314.	KT893741.1	Iran	<i>Sheep</i>
315.	KT893742.1	Iran	<i>Sheep</i>
316.	KT893743.1	Iran	<i>Sheep</i>
317.	MF428471.1	Iran	<i>Sheep</i>
318.	MF428477.1	Iran	<i>Sheep</i>
319.	KJ716905.1	Peru	<i>Sus scrofa domestica</i>
320.	KJ716906.1	Peru	<i>Sus scrofa domestica</i>
321.	KJ716907.1	Peru	<i>Sus scrofa domestica</i>
322.	KJ716908.1	Peru	<i>Sus scrofa domestica</i>
323.	KJ716909.1	Peru	<i>Sus scrofa domestica</i>
324.	LC070671.1	Peru	<i>Sus scrofa domestica</i>
325.	LC070673.1	Peru	<i>Sus scrofa domestica</i>

ANEXOS

Em preparação para Parasitology Research

Another piece on the puzzle: *Echinococcus oligarthrus* recorded for the first time in southern Brazil

Schwantes, Jéssyca Bressan ^{1, 2}; Quevedo, Pedro de Souza ³; de Paula, Adriano Alves ²; Fortes, Vanessa Barbisan ⁴; Graichen, Daniel Angelo Sganzerla ^{1, 2}

¹ Post-Graduate Program in Animal Biodiversity. Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima, 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 97105-900, Brazil

² Evolutionary Genetics Laboratory. Federal University of Santa Maria. Independência Avenue, 3751, 98300-000, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Institute of Tropical Studies, Federal University of Southern and Southeastern Pará, Nova Marabá-Marabá, Pará, 68507-590, Brazil.

⁴ Primatology Laboratory. Federal University of Santa Maria. Independência Avenue, 3751, 98300-000, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author

Daniel A. S. Graichen - das.graichen@ufsm.br phone +55 55 3742-8836

Abstract

Echinococcus oligarthrus is a parasitic species endemic from South America, highly distributed in the Amazon region. The cycle of this tapeworm is maintained by predator-prey relationship between felids and their preys, mainly small sylvatic rodents, but humans can be occasionally infected. Here we report two females of *Puma yagouaroundi* harboring *E. oligarthrus* in southern Brazil. The felines were found hit on the road in periurban areas, and during necropsy the small intestine was examined. The visual inspection revealed worms that were subjected to microscopy and molecular examination. Morphological analysis showed worms with around 2.5 mm of length, with four suckers and an armed rostrum with two rows of hooks. Phylogenetic reconstruction using *COI* sequences placed samples from South Brazil in the same clade as all others *E. oligarthrus* samples, but as a sister group. The same result was obtained when the genetic distance was used resulting in 0.087 of divergence between samples described in this study and other samples. Geographic pattern of genetic diversity, as assessed by AMOVA, suggest that the divergency is resulted of isolation by distance. This finding expands the geographic range of *E. oligarthrus* distribution and brings new insights to understand and prevent this zoonosis.

Key words: Molecular identification, *Puma yagouaroundi*, zoonosis, worm

KEY FINDINGS

- 1) *Echinococcus oligarthrus* were found for the first time out of Amazon Forest in Brazil, near the Pampa Biome;
- 2) *Puma yagouaroundi* is a potential dispersal agent of *O. oligarthrus* to periurban areas due to habitat loss;
- 3) *E. oligarthrus* genotypes found in South Brazil could represent a new parasite strain.

Introduction

The World Health Organization (WHO) defines zoonoses as diseases or infections that can be naturally transmitted between vertebrate animals and humans. The genus *Echinococcus* is the etiologic agent of the zoonotic disease called echinococcosis, which affects adult canids and felids (definitive hosts) causing them no harm, and whose larval stage affects herbivores, mainly ungulates or rodents (intermediate hosts) (McManus and Thompson 2003). Occasionally, human can be part of the cycle by ingesting eggs from the environment and become an accidental intermediate host (Moro and Schantz 2009). Echinococcosis has been an endemic zoonosis in several part of the world (Irabedra et al 2016), representing an important factor of human morbidity and causing economic burden when affects livestock (Torgerson 2003).

Traditionally, this genus is divided in four species: *Echinococcus granulosus sensu lato* (Batsch, 1786) which causes the cystic echinococcosis, *E. multilocularis* (Leuckart, 1863) causing the alveolar echinococcosis, *E. vogeli* (Rausch & Bernstein, 1972) which is responsible for the polycystic echinococcosis, and *E. oligarthrus* which cause unicystic echinococcosis (D'Alessandro et al, 2008). The Neotropical region holds two endemic *Echinococcus* species, *E. vogeli* and *E. oligarthrus*, which have canids and felids as definitive hosts, respectively (D'Alessandro et al, 2008). These two late species arrived at South America after the formation of Panama isthmus together with their definitive hosts, and subsequently, in historical times, *E. granulosus sensu lato* was introduced into South America with the bovine and ovine cattle brought by European immigrants (Nakao et al, 2007).

Regarding *Echinococcus* species distribution, we can recognize two main regions in South America: the first region where *E. granulosus* are found is associated with large cattle livestock with strong anthropic influence, including the Pampa and Andean regions. In those areas the cycle is maintained by humans who feed dogs with domestic livestock viscera (Otero-Abad and Torgeson, 2013). The other region, comprehend the Amazon forest, where *E. oligarthrus* and *E. vogeli* are found and the cycle is maintained by the predator-prey relationship (D'Alessandro, 1997).

Echinococcus oligarthrus has specificity to definitive hosts at family level, infecting at least six Neotropical wild felid species (*Puma concolor*, *P. yagouaroundi*, *Oncifelis pardalis*, *O. colocolo*, *O. geoffroyi* and *Panthera onca*), and has as intermediate hosts pacas (*Agouti paca*), agoutis (*Dasyprocta* spp.) and spiny rats (*Proechimys* spp.) (Arrabal et al 2017). The jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) is a feline species with wide distribution in Latin America, from Mexico to Argentina, inhabiting all Brazilian biomes (Trigo et al 2013). It seems to be restricted to densely forested areas, where is found at low population densities, and has currently been suffering population declines (Caso et al 2019), being considered as “Vulnerable” in Brazil (Almeida et al 2013). The aim of this paper is to report an unusual finding of a *P. yagouaroundi* being parasitized by *E. oligarthrus*, in a landscape with intensive agricultural and animal husbandry activities, close to the Pampa Biome in southern Brazil.

Material and methods

On May 2019, two adult females of wild Jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) were found hit on the road in the municipality of Palmeira das Missões, northeast of Rio Grande do Sul, southern Brazil (27°56'10.9"S 53°19'30.2"W) (Fig. 1). During the dissection of these animals, the intestinal tract was removed and the material obtained after scraping the interior of the small intestine was analysed by optical microscopy. Parasites found were submitted to microscopic and histopathologic examinations, as well as to DNA extraction for molecular analysis. The mitochondrial *COI* gene (cytochrome c oxidase subunit 1) was amplified using JB3 and JB4 primers (Bowles et al 1995) and automatically sequenced on Seqstudio Genetic Analyzer (ThermoFisher) using BigDye terminator v3.1 chemistry. The sequences were analysed using Staden Package (Staden 1996).

To elucidate the parasite taxonomic status, sequences obtained from our samples were aligned and compared phylogenetically with other sequences available in GenBank (Table S1). Phylogenetic analyses and pairwise genetic distance were performed in Mega 7 program (Kumar, et al 2016), using Neighbor-Joining method with *Taenia solium* and *Taenia saginata* (AY211880 and AY195858, respectively) as outgroup. We performed AMOVA and F_{ST} to

comprehend the diversity distribution of *E. oligarthrus* using Arlequin 3.5.2 software (Excoffier and Lischer, 2010).

Results

The worms found in the feline's small intestine had an average length of 2.5 mm. They present a scolex with four suckers and an armed rostrum with two rows of hooks. The measurement of the total length of the hooks showed values between 48µm and 49µm. Worms were composed by one or two immature proglottids (Fig. 1), followed by a gravid proglottid with a lateral genital pore.

Sequences obtained by CO1 amplification of worms collected from two felids were 354 pb long. When we first performed BLASTn search, the identity found among our samples and the best hit on GenBank was 92 and 91% with *E. oligarthrus* (JN367278.1 – human sample from Pará, Brazil). Pairwise genetic distance between the samples of *E. oligarthrus* from our study was 0.008, while the distance among Genbank sequences of *E. oligarthrus* and ours samples ranged from 0.082 to 0.097. Compared with others *Echinococcus* species, the genetic distance ranged from 0.087 with *E. oligarthrus* to 0.098 and 0.124 to *E. vogeli* and *E. granulosus* (Table 1).

The phylogenetic tree displayed two main clades. The first clade grouped samples belonging to *E. granulosus sensu lato*, *E. vogeli* and the European and Asiatic species *E. multilocularis* and *E. shiquicus*. The second clade clustered samples obtained in this study together all others samples from *E. oligarthrus*. Additionally, samples from our study was inferred as a sister group of the other *E. oligarthrus* samples from the Genbank (Fig. 2). AMOVA results showed that the principal source of genetic variation is among populations (70.96 %) with F_{ST} of 0.709 (Table 2).

Discussion

This study is the first molecular characterization of *Echinococcus oligarthrus* specimens infecting *Puma yagouaroundi*. This new record is located about 300 km from the nearest locality where the parasite species has already

been reported, however, it would be expected, since the geographic distribution of the parasite should be equivalent to that of its definitive host, which is widely spread in South America (Arrabal et al 2017). Thus, our findings add a new and important piece in the figure of *E. oligarthrus* geographic distribution, helping to understand the epidemiology of the endemic echinococcosis in a more complete manner, and present new directions for future research.

The few differences found within our samples in comparison to the difference among samples from this study and other *E. oligarthrus* sequences, as well as the result of AMOVA and F_{ST} , corroborates the hypothesis of Nakao et al (2013) that the genetic divergence in species of *Echinococcus* is due to the isolation of populations. However, we can not rule out the possibility that different local cycles of the parasite may also be interfering with its high population structure, since other feline and rodent species are already known as possible hosts (Arrabal et al 2017).

The phylogenetic tree of all species of *Echinococcus* were topologically similar to that of Nakao et al (2013) and Arrabal et al (2017), forming a separate clade from the other species of the genus *Echinococcus*. Samples collected in this study form a sister clade to *E. oligarthrus* collected in other places, supporting the idea that isolation by distance is an important factor in *Echinococcus* diversification.

The host reported here is present in all biomes and virtually all geographic regions of Brazil (Almeida et al 2013), but its extent of occurrence is considerably smaller than its extensive area of occupancy (Caso et al 2019). Like other Brazilian wild feline species, *P. yagouaroundi* populations are under pressure from the destruction of their habitats (Almeida et al 2013, Caso et al 2019), which makes individuals forced to travel greater distances and move through the matrix areas between forest fragments, being commonly seen near homes in rural and periurban areas (Giordano 2015). This increases the dispersal potential for the *E. oligarthrus* in the landscape. More attention should be given in the future to the knowledge of this species and its relationship with possible cases of human echinococcosis in the region.

Financial Support

Jéssyca B. Schwantes received a post-graduated fellowship by CAPES.

Ethical Statement

Collects were approved by Sisbio/ICMBio according number 69526/2.

Conflicts of Interest

None.

References

Almeida LB, Queirolo D, Beisiegel BM and Oliveira TG (2013) Avaliação do risco de extinção do gato-mourisco *Puma yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* **1**, 99–106.

Arrabal, JP, Avila, HG, Rivero, MR., Camicia, F, Salas, MM, Costa, SA, Nocera, CG, Rosenzvit, MC and Kamenetzky, L (2017) *Echinococcus oligarthrus* in the subtropical region of Argentina: First integration of morphological and molecular analyses determines two distinct populations. *Veterinary parasitology* **240**, 60-67. doi: 0.1016/j.vetpar.2017.03.019

Bowles, J, Blair, D and McManus, D (1995) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* **110**, 317–328. doi: 10.1017/S0031182000080902

Caso, A, de Oliveira, T and Carvajal, SV (2015) *Herpailurus yagouaroundi*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2015: e.T9948A50653167. . Downloaded on 26 September 2019. doi: 10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T9948A50653167.en

D'Alessandro, A (1997) Polycystic echinococcosis in tropical America: *Echinococcus vogeli* and *E. oligarthrus*. *Acta Tropica* **67**, 43–65. doi: 10.1016/s0001-706x(97)00048-x.

D'Alessandro, A and Rausch, RL (2008) New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clinical Microbiology Reviews* **21**, 380-401. doi: 10.1016/s0001-706x(97)00048-x.

Excoffier, L and Lischer, HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564–567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.

Giordano, AJ (2016) Ecology and status of the jaguarondi (*Puma yagouaroundi*): a synthesis of existing knowledge. *Mammal Review* **46**, 30-43. doi: 10.1111/mam.12051.

Irabedra, P, Ferreira, C, Sayes, J, Elola, S, Rodríguez, M, Morel, N, Segura S, dos Santos E and Guisantes, JA (2016) Control programme for cystic echinococcosis in Uruguay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **111**, 372-377. doi: 10.1590/0074-02760160070.

Kumar, S, Stecher, G and Tamura, K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

McManus, DP and Thompson, RCA (2003) Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* **127**, S37-S51. doi: 10.1017/S0031182003003524

Moro, P and Schantz, PM (2009) Echinococcosis: a review. *International journal of Infectious diseases* **13**, 125-133. doi: 10.1016/j.ijid.2008.03.037.

Nakao, M., McManus, DP, Schantz, PM, Craig, PS and Ito, A (2007) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* **134**, 713-722. doi: 10.1017/S0031182006001934.

Nakao, M, Lavikainen, A, Yanagida, T and Ito, A (2013) Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology* **43**, 1017-1029. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.06.002.

Otero-Abad, B and Torgerson, PR (2013) A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *PLoS neglected tropical diseases* **7**, e2249. doi: 10.1371/journal.pntd.0002249.

Staden, R (1996) The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* **5**, 233–241.

Torgerson, PR (2003) Economic effects of echinococcosis. *Acta Tropica* **85**, 113-118, 2003.

Table 1. Pairwise genetic distance among sequences of *COI* gene for *Echinococcus* species.

	OUR_GROUP	OLIGARTHURUS	VOGELI	GRANULOSUS	FELIDIS	ORTLEPPI	CANADENSIS	MULTILOULARIS	SHIQUICUS
OUR_GROUP									
OLIGARTHURUS	0.087								
VOGELI	0.098	0.086							
GRANULOSUS	0.124	0.116	0.087						
FELIDIS	0.112	0.110	0.085	0.074					
ORTLEPPI	0.108	0.090	0.095	0.088	0.091				
CANADENSIS	0.114	0.099	0.102	0.097	0.099	0.047			
MULTILOULARIS	0.111	0.110	0.098	0.097	0.091	0.085	0.097		
SHIQUICUS	0.111	0.094	0.077	0.088	0.102	0.088	0.099	0.085	
EQUINUS	0.094	0.087	0.064	0.082	0.082	0.085	0.082	0.088	0.080

Table 2. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) results based on the *COI* (Cytochrome Oxidase Subunit I) sequences of *Echinococcus oligarthrus* from Brazil. The analysis considered that populations are group of worms collected in the same region (Argentina, Panama, Northern Brazil and Southern Brazil).

Gene	Variation source	Degrees of freedom	Variation (%)
<i>COI</i>	Among populations	3	70.96
	Within populations	9	29.04
	F_{ST} 0.70964		

Figure 1. A) View of Latin America, sample points highlighted in blue, red and green; B) region where our felines are found. AR: Argentina; BR: Brazil; PA: Panamá; RS: Rio Grande do Sul, state of the Brazil. C) Total length of the hooks showed values between 48µm and 49µm. D) Worms were composed by one or two immature proglottids.

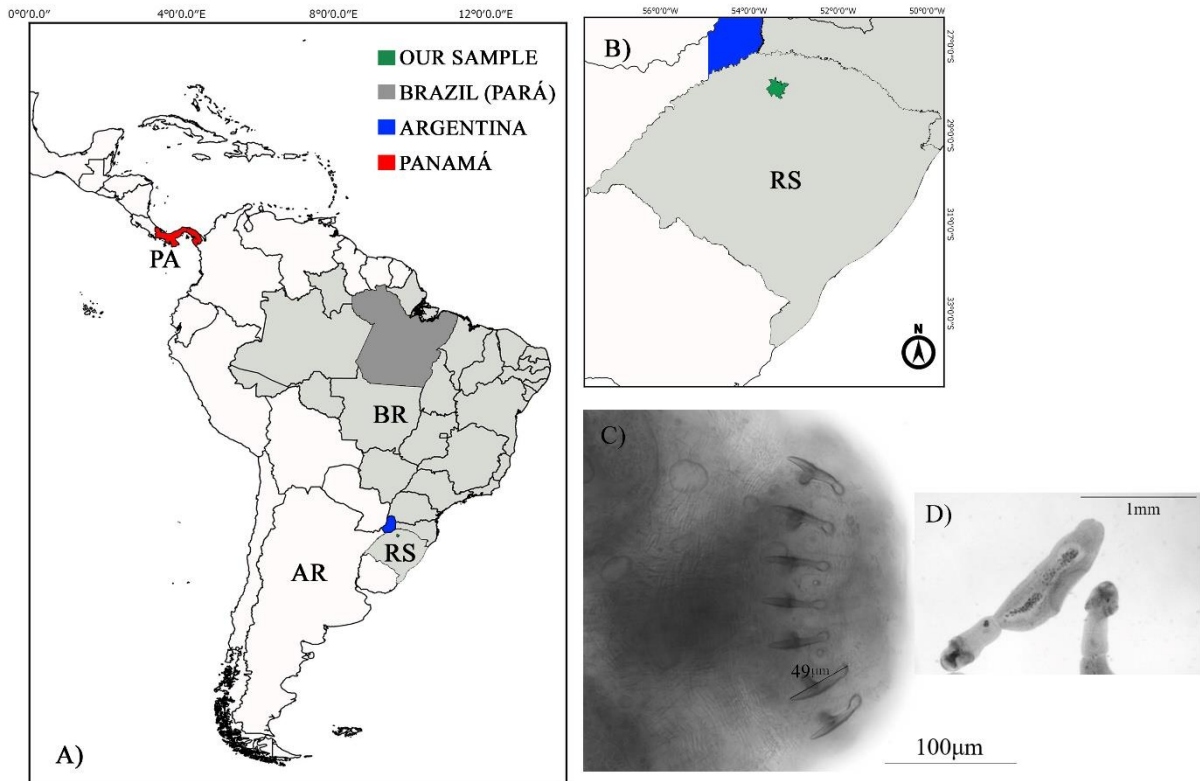
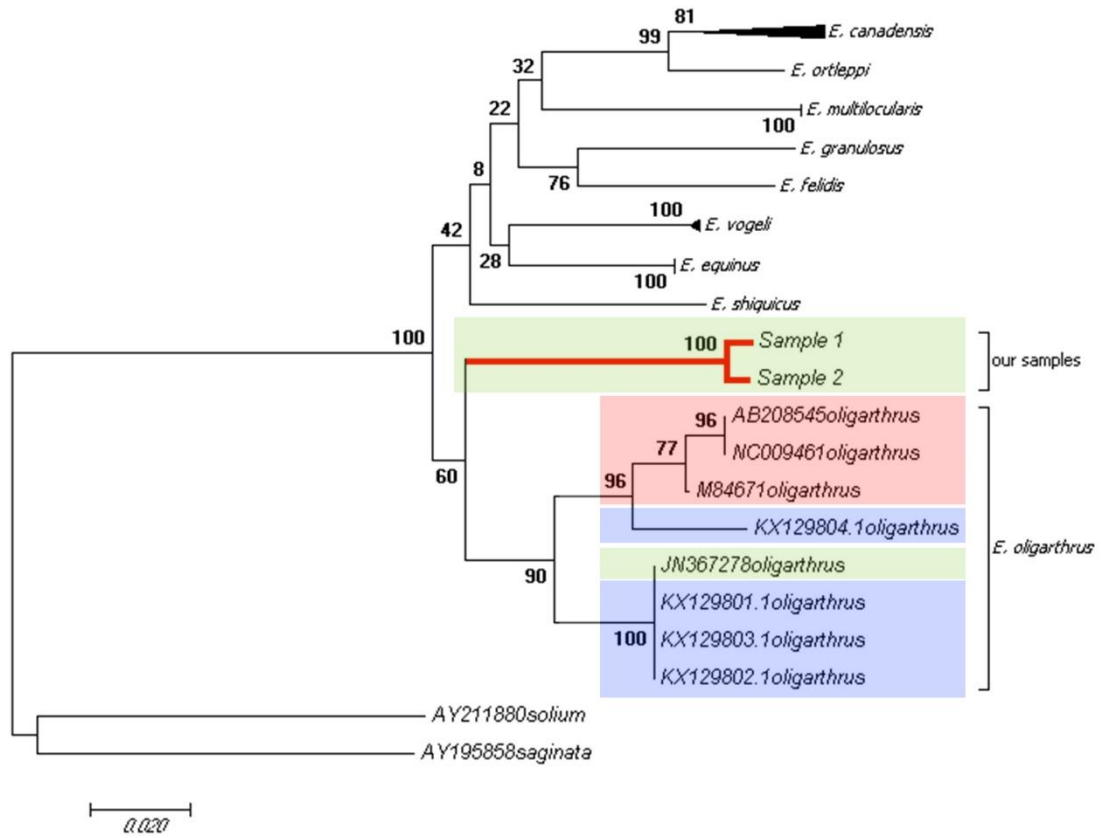


Figure 2. Molecular Phylogenetic analysis by Neighbor-Joining method. The evolutionary history was inferred by using the method based on the Tamura-Nei model.



Supplementary material

Table S1. Sequences of the genus *Echinococcus* and *Taenia* for *COI* gene from the Genbank

N	Specie	Number access Genbank
1.	<i>oligarthus</i>	AB208545
2.	<i>oligarthus</i>	NC009461
3.	<i>oligarthus</i>	M84671
4.	<i>oligarthus</i>	JN367278
5.	<i>oligarthus</i>	KX129801
6.	<i>oligarthus</i>	KX129802
7.	<i>oligarthus</i>	KX129803
8.	<i>oligarthus</i>	KX129804
9.	<i>vogeli</i>	NC009462
10.	<i>vogeli</i>	KM588226
11.	<i>vogeli</i>	JX315616
12.	<i>vogeli</i>	KX257618
13.	<i>granulosus</i>	AB786664
14.	<i>felidis</i>	AB732958
15.	<i>ortleppi</i>	NC011122
16.	<i>canadensis</i>	NC011121
17.	<i>canadensis</i>	AB235847
18.	<i>canadensis</i>	AB745463
19.	<i>canadensis</i>	AB235848
20.	<i>multilocularis</i>	NC000928
21.	<i>multilocularis</i>	MH259774
22.	<i>multilocularis</i>	MH259773
23.	<i>multilocularis</i>	MH259769
24.	<i>shiquicus</i>	NC009460
25.	<i>equinus</i>	AB786665
26.	<i>equinus</i>	KP161210
27.	<i>equinus</i>	KP161209
28.	<i>equinus</i>	KP161208
29.	<i>equinus</i>	KP161207
30.	<i>solium</i>	AY211880
31.	<i>saginata</i>	AY195858