UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

RAFAEL EIJI IWAMA

Sanguessugas parasitas da ordem Rhycobdellida (Clitellata: Hirudinida) do território Brasileiro

SÃO PAULO
2017

RAFAEL EIJI IWAMA

Sanguessugas parasitas da ordem Rhycobdellida (Clitellata: Hirudinida) do território Brasileiro

Versão Original

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Orientador: Prof. Dr. João Miguel de Matos Nogueira

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.
Rafael Eiji Iwama
Sanguessugas parasitas da ordem Rhyncobdellida (Clitellata: Hirudinida) do território brasileiro
133 páginas
Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
Versão Original
1. Hirudinea 2. Sanguessugas 3. Rhyncobdellida. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia

Nome: IWAMA, Rafael Eiji
Título: Sanguessugas parasitas da ordem Rhyncobdellida (Clitellata: Hirudinida) do território brasileiro

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr(a).: _____
Instituição :_____
Julgamento: _____

Prof. Dr(a).: _____
Instituição :_____
Julgamento: _____

Prof. Dr(a).: _____
Instituição :_____
Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao João Nogueira pela orientação e pelas discussões construtivas, além da confiança em me deixar trabalhar com um grupo tão importante, mas esquecido. Agradeço também, a Alejandro Oceguera-Figueroa, que tem tido uma enorme paciência ao responder minhas mensagens, com dúvidas cruéis sobre sistemática de Hirudinea. Aos meus amigos de laboratório, Orlemir Carrerete, Felipe Ramon de Chiara, Carlos Ananias, Gilberto Bergamo, William Matheus e Alan Henrique, eu agradeço pelas horas infinitas de discussões, brincadeiras, reflexões, youtube, facebook e muito trabalho. Aos técnicos Ênio Matos e Phillip Lenktaitis, do Laboratório de Histologia, do Departamento de Zoologia, que me ajudaram com os cortes histológicos e MEV.

Aos meus amigos Renata Galera e Tiago Donegatti, que me aguentaram os dois anos de drama de mestrado e corrigiram todo e qualquer parágrafo antes dele ser enviado ao meu orientador. À minha irmã Gabriela pela ajuda com os desenhos e correções de última hora.

Agradeço também a todos os outros amigos e aos meus pais, Paulo e Helenildes, que não estiveram diretamente envolvidos na confecção deste trabalho, mas que, com certeza, me influenciaram positivamente.

Muito obrigado!

RESUMO

IWAMA, Rafael Eiji. **Sanguessugas parasitas da ordem Rhyncobdellida (Clitellata: Hirudinida) do território brasileiro.** 2017. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Zoologia – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Sanguessugas são importantes componentes da comunidade de macroinvertebrados bentônicos, podendo ser parasitas ou predadoras. Apesar das propriedades terapêuticas relacionadas à secreção salivar destes animais serem conhecidas por milênios, pouca atenção taxonômica foi dada ao grupo, principalmente em regiões como América do Sul, África e Ásia. O objetivo deste trabalho foi de inventariar a hirudofauna parasita da ordem Rhyncobdellida do território brasileiro e aplicar novas técnicas de estudo taxonômico, que não são recorrentes para o grupo. Além das observações da morfologia interna e externa através de dissecções e esteomicroscópio, foi realizado o estudo do tegumento através de microscopia eletrônica de varredura e microtomografia computadorizada para o estudo anatômico. Foram encontradas 7 espécies válidas e 7 espécies novas para a ciência. As ocorrências dos gêneros *Oligobdella* e *Placobdella* são discutidas em detalhe e é sugerida a criação de dois novos gêneros, para acomodar as espécies parasitas de Glossiphoniidae bianuladas e trianuladas da América do Sul. O gênero *Austrobdella* é registrado pela primeira vez para o Atlântico Sul, na costa do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Hirudinea, sanguessugas, *Rhyncobdella*, Glossiphoniidae, *Austrobdella*.

ABSTRACT

IWAMA, Rafael Eiji. **Parasites leeches of the order Rhycobdellida from Brazil.** 2017. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Zoologia – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Leeches are important components of the macroinvertebrates community and they have parasitic or predatory behavior. Although the therapeutic properties related to the salivary secretion are known for thousands of years, little attention was given to taxonomic studies, especially in South America, Africa and Asia. The present study aims to explore the diversity of parasitic rhyncobdelid leeches in Brazil and apply new technologies to the taxonomic study of this group. Besides the classic observation on the internal and external morphology using dissection and a stereomicroscope, Scanning Electron Microscopy and Microcomputed tomography were used to access the fine structure of the tegument and the internal morphology, respectively. seven known species and 7 species new to science were found. The occurrences of *Oligobdella* and *Placobdella* are discussed and the description of two new genera is suggested, to accommodate biannulate and triannulate parasitic glossiphonid species from South America. The genus *Austrobdella* is reported for the first time to the Southern Atlantic, from the coast of Rio de Janeiro.

Keywords: Hirudinea, leeches, *Rhyncobdella*, Glossiphoniidae, *Austrobdella*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1

1.1. **Morfologia básica** 2

1.2. **Diversidade de sanguessugas** 6

1.3. Problemas taxonômicos 11

1.4. Micro-tomografia computadorizada (µCT) 13

2. MATERIAL E MÉTODOS 18

2.1. Material analisado 18

2.2. Coleta e fixação 18

2.3. Análise dos dados 19

2.4. Microscopia eletrônica de varredura 19

2.5. Microtomografia computadorizada 20

3. RESULTADOS 21

3.1. Microscopia eletrônica de varredura 21

3.2. Tomografia computadorizada 21

3.3. Seção taxonômica 23

Glossiphoniidae Vaillant, 1890 23

***Haementeria* Filippi, 1849** 24

***Haementeria* cf. *brasiliensis* (Weber, 1915)** 27

***Haementeria brasiliensis sensu* Cordero, 1937**.....31

***Haementeria lutzi* Pinto 1920** 36

***Haementeria vizottoi* Castro, 1971** 43

***Haementeria* sp. 1** 47

***Haementeria* sp. 2** 52

***Haementeria* sp. 3.** 56

***Haementeria* sp. 4** 62

***Placobdella* Blanchard, 1893** 65

***Placobdella columbiensis* (Ringuelet, 1972)** 67

***Placobdella maculata* Weber, 1915** 70

***Placobdella* sp. 1** 75

***Placobdella* sp. 2** 82

Piscicolidae (Johnston, 1865) 86

***Austrobdella* Badham, 1916** 87
***Austrobdella* sp.** 87
Ozobranchidae Pinto, 1921 93
***Ozobranchus* cf. *branchiatus* (Menzies, 1791)** 93
4. DISCUSSÕES.....98
4.1. Microtomografia computadorizada e Microscopia eletrônica de Varredura 98
4.2. *Haementeria* 101
4.3. *Oligobdella* 102
4.4. Ocorrências de *Placobdella* na América do Sul 103
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 104
6. REFERÊNCIAS 105
Anexo 1 118
Anexo 2 120
Anexo 3 121

1. Introdução

As sanguessugas são mais conhecidas como hematófagas e chamam a atenção humana desde o antigo Egito. Estes animais podem ser encontrados em pinturas que datam por volta de 1567-1308 a.C (Whitaker et al., 2004). Desde então, muitas culturas têm descrito o poder medicinal das sanguessugas no tratamento de diversas doenças. O procedimento, que ficou conhecido como “blood letting” - em que hirudíneos são utilizados para drenar o acúmulo de sangue em lesões subcutâneas - ganhou atenção especial e influenciou diversas personalidades que tiveram importante papel no desenvolvimento da medicina moderna, tais como Galeno, Alexandre de Tales, Avicenna e muitos outros (Whitaker et al., 2004). Apesar do uso destes parasitas em tratamentos médicos ter diminuído substancialmente a partir do século XIX, devido ao avanço da medicina moderna, eles continuam sendo usados em transplantes de tecidos, reimplantação de partes amputadas e remoção de sangue estagnado (Elliot & Kutschera, 2011). Muitas propriedades são atribuídas à secreção salivar dos hirudíneos, tais como atividades anti-inflamatória, vasodilatadora, anestésica e antibiótica (Vera, 2005), porém, a mais explorada é a propriedade anticoagulante, que já foi descrita para vários táxons (Faria et al., 1999; Salzet, 2001). Além do uso médico e farmacêutico, as sanguessugas são importantes modelos em estudos neurológicos devido ao longo tamanho dos neurônios presentes no cordão nervoso ventral (Elliot & Kutschera, 2011) e podem ser utilizados como bioindicadores de qualidade de água em lagos, riachos e rios (Koperski, 2005). Apesar da importância histórica, ecológica e farmacêutica, há poucos estudos sobre a diversidade de sanguessugas, especialmente na região neotropical.

As relações filogenéticas entre Hirudinea e outros clitelados têm sido estudadas por diversos autores, utilizando diferentes estratégias (e.g. Gelder & Siddall, 2001; Martin, 2001; Oceguera-Figueroa et al., 2016; Purschke et al., 1993; Siddall et al., 2001). A monofilia de Clitellata é bem suportada, tanto por dados morfológicos, quanto moleculares. Contudo, as relações dentro dos grandes grupos de Hirudinea (Branchiobdellida, Acanthobdellida e Euhirudinea) continuam incertas, já que não há concordância entre as análises acerca do grupo irmão de Euhirudinea.

Euhirudinea é classicamente dividida em dois táxons, como indicado por vários autores (e.g. Pinto, 1923; Ringuelet, 1985; Sawyer, 1986; Weber, 1915). Membros da

ordem Rhyncobdellida são sanguessugas cujo parasitismo ocorre pela penetração de uma faringe protraível. Já em sanguessugas pertencentes à ordem Arhyncobdellida, há um aparato mastigatório ou a perda completa da faringe. No entanto, esta classificação mostrou-se inválida com o advento da cladística. Apakupakul et al. (1999) mostraram que a presença de faringe protraível é um caractere plesiomórfico, resultando na parafilia de Rhyncobdellida, resultado também obtido por outros autores, em estudos posteriores (Borda & Siddall, 2004). Apesar disto, os táxons pertencentes a Rhyncobdellida (Glossiphoniidae, Piscicolidae e Ozobrachidae) são monofiléticos, de acordo com análises recentes (Apakupakul et al., 1999; Borda & Siddall, 2004; Siddall et al., 2001; Siddall et al., 2005).

A diversidade de sanguessugas conhecidas é razoavelmente bem distribuída pelo globo. De acordo com Sket e Trontelj (2008), há aproximadamente 680 espécies descritas, a maioria para águas continentais, e para a região paleártica, que é seguida em número de espécies pela região neotropical.

1.1. Morfologia básica

1.1.1. Sensilas, papilas e tubérculos

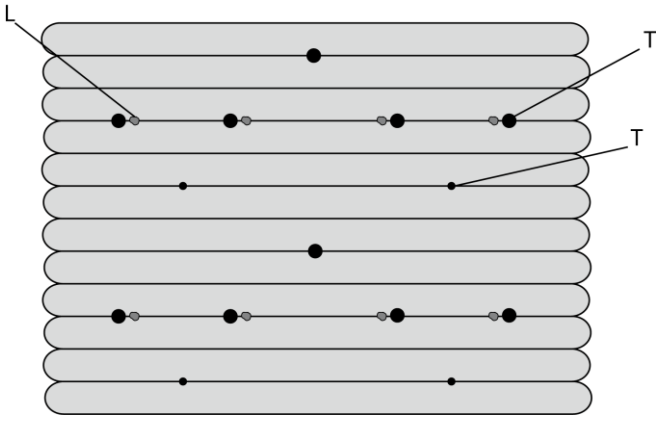
A ornamentação do tegumento das sanguessugas é um importante caractere taxonômico, principalmente em grupos que apresentam uma alta complexidade na distribuição destes ornamentos. Em algumas espécies, esta ornamentação pode apresentar padrões metaméricos, que podem ser utilizados como referência para a determinação da anulação, como em membros de diversas espécies de *Haementeria* Filippi, 1849 (figura 1). Apesar de serem conhecidas mais estruturas ornamentais em sanguessugas, as duas principais são as sensilas e os tubérculos.

As sensilas são órgãos sensoriais que podem ser utilizados para a determinação dos anéis a2, onde também está o gânglio do cordão nervoso ventral. Há muita confusão em relação a estes órgãos na literatura, Souza (1978) e Schlenz (1971) descreveram-nos como estruturas com certa elevação cônica, contrariando a maior parte da literatura (ex. Sawyer, 1986). Esta confusão pode estar associada ao uso da expressão “papilas segmentares”, usada por Pinto (1923). Apesar de não deixar claro a natureza da estrutura estudada, Pinto (1923) relatou que estes órgãos são extremamente inconspícuos. Derosa e Friesen (1981) forneceram um estudo sistemático da morfologia das sensilas em *Hirudo medicinalis*, por meio de micrografia

eletrônica de transmissão. Segundo os autores, as sensilas podem ser percebidas como regiões mais claras do tegumento, que apresentam cílios, mas não há menção a qualquer elevação perceptível sob estereomicroscópio. Estas sensilas podem, no entanto, variar de formato dependendo da região onde se encontram. Como demonstrou Elliott (1987), as sensilas localizadas próximas aos lábios da ventosa oral diferem em tamanho, distribuição e comprimento dos cílios.

Os tubérculos ou papilas, por outro lado, apresentam elevação cônica e podem apresentar seus próprios padrões de distribuição. Em membros de *Haementeria*, é possível determinar certos padrões metaméricos na distribuição dos tubérculos, como mostrou Souza (1978). Contudo, a morfologia dos tubérculos nunca foi estudada detalhadamente por meio de técnicas de microscopia eletrônica e estes órgãos podem facilmente ser confundidos com os órgãos de Lang, que são caracteres restritos aos anéis a2 de sanguessugas do gênero *Haementeria* (Oceguera-Figueroa, 2012).

Figura 1. Ornamentação do tegumento de *Haementeria lutzi,* vista dorsal. L: Órgão de Lang. T: Tubérculo.



Fonte: próprio autor

1.1.2. Segmentação e anéis externos

Diferentemente dos outros Annelida, as sanguessugas possuem um número fixo de segmentos. Membros do grupo Euhirudinea possuem um total de 32 segmentos metaméricos, sendo que os cinco primeiros e últimos segmentos formam as ventosas anterior e posterior, respectivamente (Davies & Govedich, 2001). Cada

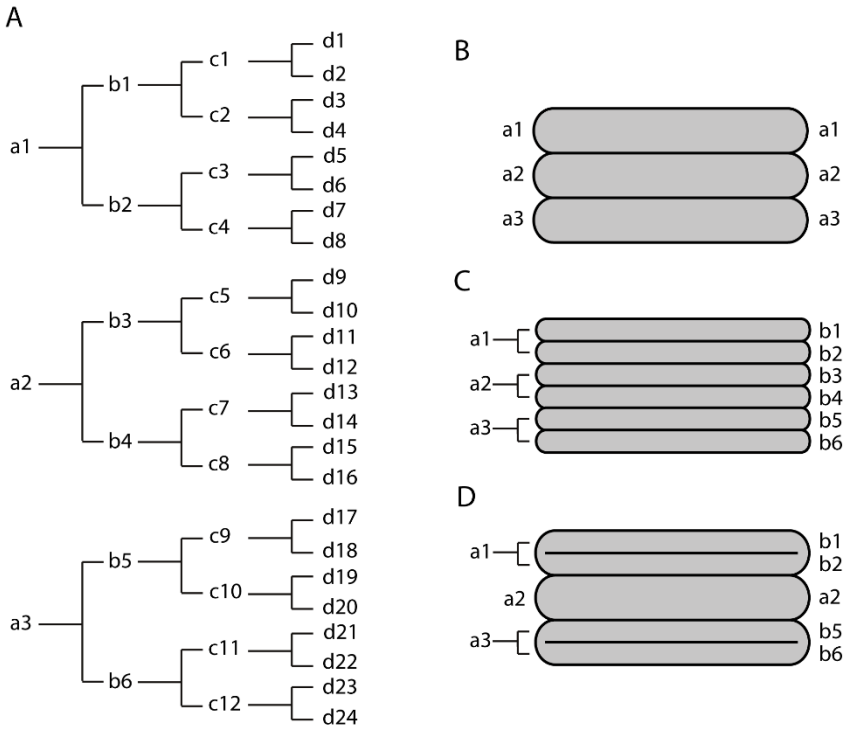
segmento se encontra externamente dividido em um número variável de anéis, sendo este número um caractere de extrema importância para a taxonomia de hirudíneos.

Gratiolet (1862) foi o primeiro autor a reconhecer o padrão metamérico de distribuição dos anéis como um importante caractere taxonômico e definiu o limite anterior do segmento como sendo o anel portador de papilas segmentares (Whitman, 1886), um conceito divergente daquele tradicional em sanguessugas, mais conhecido como Castle-Moore (Castle, 1900; Moore, 1899; 1900; Sawyer, 1986;).

Castle (1900) e Moore (1899, 1900), a partir da análise cuidadosa do padrão de anulação de sanguessugas bianuladas, concluíram independentemente que o padrão básico de anulação em Euhirudinea são três anéis por segmento e que os distintos padrões metaméricos encontrados são derivados deste básico. Os autores também propuseram que o anel portador de papilas segmentares, cuja localização coincide com a dos gânglios metaméricos do cordão nervoso ventral, correspondia àquele localizado no meio do metâmero, portanto, o segundo anel.

Baseado nesta proposição, Moore (1899) introduziu uma nomenclatura que indica a origem dos anéis. Os três anéis primários são chamados de a1, a2 e a3. Os anéis secundários (derivados diretamente dos anéis primários) recebem a conotação b1, b2, b3, b4, b5 e b6, onde cada anel, dá origem a, no máximo, dois derivados. A figura 2a ilustra o sistema proposto por Moore (1899) e demonstra como é possível estabelecer o anel primário de origem de cada anel derivado. Apesar de útil, a conotação Castle-Moore não é totalmente adequada para representar a anelação de sanguessugas, já que é comum que espécimes apresentem padrões de anelação que não são consistentes ao redor de toda a circunferência do corpo, como mostra a figura 2D. Nestes casos, é preciso utilizar a conotação dos anéis primários para fazer referência ao conjunto de anéis derivados de tal anel primário.

Figura 2. Relação entre anéis primários e seus derivados. A. esquema da relação entre anéis primários, secundários e terciários. B. somito composto por três anéis primários, típico de membros de *Helobdella*. C. somito composto por seis anéis secundários de exemplares de *Helobdella diploides*. D. somito composto por cinco anéis de exemplares de *Haementeria*, quatro anéis secundários derivados de a1 e a3, a2 não dividido.



Fonte: próprio autor

1.1.3. Trato digestivo e glândulas salivares

O aparato digestivo da sanguessugas é divido em três regiões principais: tratos digestivos anterior e médio, e intestino. A porção anterior do trato digestivo das sanguessugas é formada pelo aparato bucal (mandíbulas ou estiletes de quitina), a faringe (que pode ser protraível, ou não), o complexo salivar e o esôfago. O complexo salivar tem extrema importância taxonômica e pode ser formado por glândulas salivares difusas ou compactas, e por órgãos esofágicos, que possuem bactérias endossimbiontes. A porção imediatamente após o esôfago, que pode ser reduzida em alguns grupos, forma a região mediana do aparato digestivo. Esta região é normalmente formada por cecos gástricos (figura 3), mas podem estar ausentes em alguns táxons. Esta região do aparato digestivo é responsável pelo armazenamento de alimento, especialmente em espécies parasitas. No segmento XIX, encontra-se o último par de cecos gástricos, que pode apresentar um trajeto descendente. É no

intestino que a digestão e a absorção de nutrientes ocorrem. Esta região compreende dos segmentos seguintes ao último par de cecos gástricos até o reto, apresentando, normalmente, quatro pares de cecos intestinais.

1.1.4. Sistema reprodutor

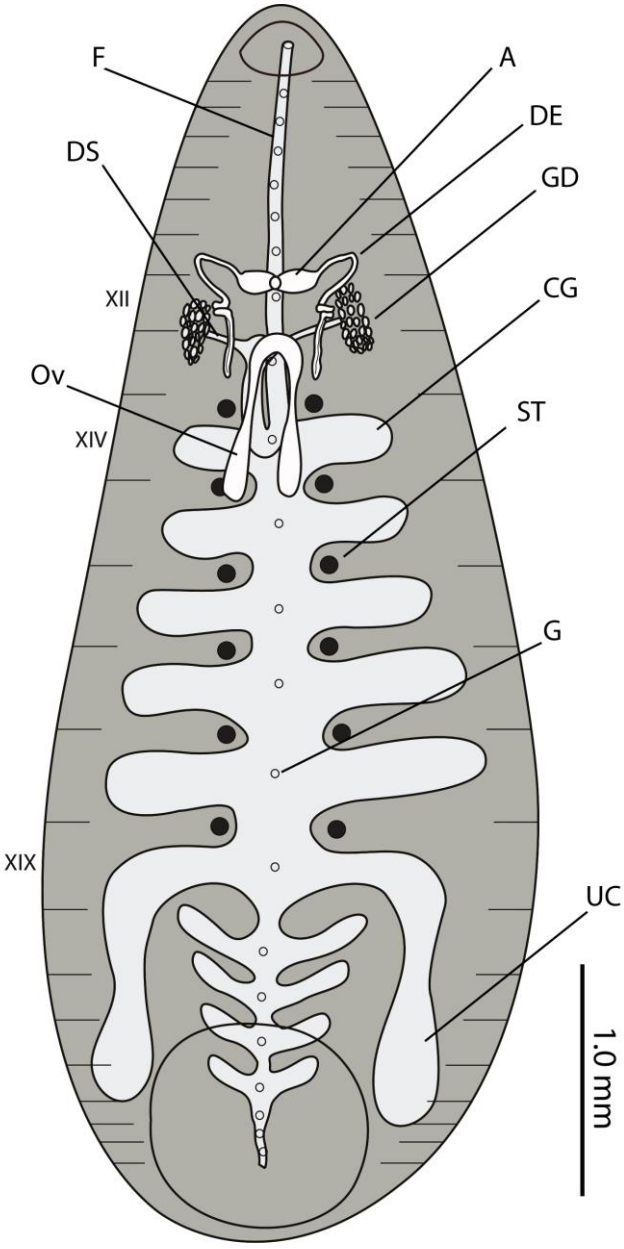
Os sistemas reprodutores masculino e feminino têm grande importância na taxonomia de sanguessugas. Alguns autores, como Sawyer (1986) e Richardison (1969a) destacaram esta importância, especialmente para os hirudiniformes.

As sanguessugas são hermafroditas, portanto os indivíduos apresentam órgãos reprodutivos masculino e feminino (figura 3). O sistema masculino pode ser dividido em duas regiões. A região anterior é formada pelo átrio (bursa) e pelos ductos ejaculatórios, e a região posterior é composta pelos sacos testiculares, vasos aferentes e deferentes. O número de sacos testiculares, o formato dos ductos ejaculatórios e a presença ou ausência de um órgão copulatório especializado são caracteres importantes. Os ovários são pouco utilizados como caractere taxonômico, já que apresentam grande variação morfológica, dependendo do estágio reprodutivo em que o indivíduo se encontra.

1.2. Diversidade de sanguessugas

Segundo Christoffersen (2009), há 139 espécies de sanguessugas descritas para o continente sul-americano e a taxa de endemicidade chega a quase 90%. Contudo, Christoffersen (2007, 2008, 2009) não incluiu em suas listas muitas espécies que foram sinonimizadas por Ringuelet ao longo de sua carreira, mas cujas sinonímias são duvidosas, por não haver evidências de que o autor tenha consultado o material tipo dos táxons considerados sinônimos.

Figura 3. Esquema da morfologia interna de *Helobdella buzz*. Estão representados nesta figura os principais componentes dos sistemas reprodutores masculino, feminino e do sistema digestivo. A: átrio; CG: Cecos gástricos; DE: ductos ejaculatórios; DS: ductos salivares; F: faringe; G: gânglios nervosos; GD: glândulas salivares compactas; Ov: ovários; ST: sacos testiculares.



Fonte: modificado de Iwama, Nogueira e Gonçalves (2017)

1.2.1. Predadores de água doce

O hábito alimentar predatório pode ser encontrado em pelo menos quatro dos grandes táxons de sanguessugas e tem origem independente em cada grupo (Borda & Siddall, 2004). O grupo predador mais importante da América do Sul é o gênero *Helobdella* Blanchard, 1896 (Glossiphoniidae), que são conhecidos por se alimentarem de gastrópodes e larvas de insetos, utilizando um tipo de predação chamado liquidossomatofagia (Cônsoli et al., 1984; Guimarães et al., 1984; Sawyer, 1986). Este comportamento alimentar é caracterizado pela sucção dos fluídos corporais, que normalmente resulta na morte da presa (Sawyer, 1986). Como muitas outras sanguessugas de água doce, membros deste gênero estão altamente associados a raízes de macrófitas. Takeda et al. (2003) apontaram as sanguessugas como um dos táxons mais abundantes em associação com plantas de água doce, o que indica sua alta importância na composição da comunidade. Outro tipo de predação em hirudinea é o hábito macrófago, que está presente em Arhyncobdellida, ocorrendo em sanguessugas de água doce, anfíbias e terrestres; neste caso, as presas são engolidas inteiras (Sawyer, 1986). Os principais grupos macrófagos presentes no território sul-americano são Americobdellidae, Cylicobdellidae (terrestre) e Semiscolecidae.

1.2.2. Predadores terrestres

Várias linhagens desenvolveram a capacidade de viver em ambientes terrestres como o solo ou em associação com plantas e rochas próximas a cachoeiras, lagos e rios. O gênero terrestre *Cylicobdella* Grube, 1871 é registrado em quase todo o território brasileiro (Chirstoffersen, 2008). Apesar das relações entre este gênero e outros Arhyncobdellida terem sido pouco estudadas, as análises mais recentes indicam que o grupo pertence à linhagem dos hirudiniformes (Borda & Siddall, 2004). Outra linhagem terrestre/anfíbia presente na América do Sul é Americobdellidae, composta apenas por um representante, que tem sua posição filogenética mal definida (Borda & Siddall, 2004; Nakano et al., 2011; Oceguera-Figueroa et al., 2011).

1.2.3. Parasitas de água doce

Sanguessugas parasitas normalmente chamam mais atenção do público, devido ao seu comportamento apelativo. No Brasil, é comum sanguessugas de água doce se fixarem eventualmente em humanos, durante atividades diárias e de lazer. A comunidade científica também apresenta este viés no interesse científico acerca dos hirudíneos, de maneira que os grupos predadores são menos estudados. Como o ancestral de Hirudinea é apontado como sendo parasita, houve uma grande diversificação deste hábito e a maioria dos táxons apresenta uma ampla variedade de hospedeiros, atacando vertebrados de todos os grupos (Brites & Rantin, 2004; Graham & Borda, 2010; Lemos et al., 2007; Ringuelet, 1985; Sawyer, 1986; Tuggle, 1986).

Membros de espécies pertencentes ao gênero *Haementeria* estão presentes em todo o continente americano. Estes animais são facilmente caracterizados, pela presença de um ou dois pares de glândulas conectadas ao esôfago, os órgãos esofágicos. Estes órgãos extremamente especializados possuem bactérias simbiontes, que são capazes de produzir muitos componentes salivares (Sawyer, 1986). Apesar do gênero *Placobdella* Blanchard, 1893 ter sido registrado no continente (ver Chirstoffersen, 2007; Ringuelet, 1985), acredita-se que estes registros sejam fruto de erros de identificação, já que as descrições das espécies mencionam pelo menos um par de órgãos esofágicos esféricos, o que é característico de *Haementeria*. Oceguera-Figueroa et al. (2012) diferenciaram a morfologia dos órgãos esofágicos em exemplares de *Placobdella* e *Haementeria* pelo formato e tipo de conexão com o esôfago. Em membros de *Haementeria,* as glândulas são regularmente esféricas e conectadas ao esôfago por ductos finos, enquanto nos de *Placobdella*, elas são saculiformes e se encontram aderidos diretamente ao esôfago. Entretanto, a maioria das descrições de espécies da América do Sul colocadas na subfamília Glossiphoniinae e no gênero *Placobdella* possuem vários caracteres considerados típicos de *Haementeria* e é provável que futuras análises molecularesindiquem que um posicionamento filogenético muito próximo de *Haementeria* (Haementerinae)..

Oceguera-Figueroa (2012) também ofereceu um grande avanço sobre o gênero *Oligobdella* Moore, 1918. Membros deste gênero são caracterizados por apresentarem segmentos do meio do corpo compostos por apenas dois anéis. O autor

utilizou duas espécies deste gênero em suas análises filogenéticas e concluiu que a espécie tipo, *O. biannulata* (Moore, 1900), pertence ao gênero *Placobdella* (Glossiphoniinae), enquanto *O. brasiliensis* pertence à subfamília Haementerinae.

Outro importante grupo de sanguessugas parasitas presente no continente é formado pelos membros do genêro *Oxyptychus* Grube, 1851, pertencente à família Macrobdellidae, cujos exemplares são frequentemente registrados como parasitas de anfíbios e mamíferos.

1.2.4. Parasitas marinhos

Dentro de Euhirudinea, dois grupos ocupam ambientes marinhos: Ozobranchidae e Piscicolidae e várias análises filogenéticas indicam que são grupos irmãos (Apakupakul et al., 1999; Borda & Siddall, 2004; Martin, 2001; Williams & Burreson, 2006). Enquanto membros da família Ozobranchidae são especializados em parasitar tartarugas marinhas e outros quelônios, Piscicolideos são frequentemente encontrados em peixes cartilaginosos e ósseos (Williams & Burreson, 2006).

Dentre os Piscicolideos, há variação em relação à especificidade de hospedeiros, dependendo da linhagem à qual a sanguessuga pertence. Membros da maioria das espécies voltam ao substrato e se fixam em um hospedeiro diferente a cada comportamento parasita (Sawyer, 1986). Contudo, os animais da subfamília Platybdellinae apresentam uma forte relação específica com seu hospedeiro, já que permanecem fixos a maior parte da vida em um único indivíduo (Sawyer,1986).

Há somente 17 espécies de hirudíneos marinhos registrados para o continente sul-americano (Christoffersen, 2008). Este número é extremamente subestimado devido à falta de especialistas no grupo e a algumas dificuldades no processo de coleta e fixação. Segundo Schlenz (1971), a maioria dos pesquisadores não possui conhecimento dos processos de anestesia e fixação de Hirudinea. Assim, embora muitos espécimes coletados ocasionalmente sejam depositados em coleções, eles não se encontram em bom estado de fixação para estudos morfológicos, impossibilitando a identificação e descrição destes exemplares.

1.3. Problemas taxonômicos

1.3.1. Sinonímias atribuídas por Raúl A. Ringuelet

Raul A. Ringuelet foi, provavelmente, o mais influente taxonomista especialista em Hirudinea da América do Sul, com quase 40 espécies descritas (Sket & Trontelj, 2008). Apesar da qualidade memorável dos seus trabalhos, o autor determinou muitas sinonímias sem o estudo de exemplares tipo, ou, se os estudou, não o indicou nos artigos (Ringuelet, 1972a, 1972b, 1980, 1985). O princípio adotado por Ringuelet gerou grande confusão na taxonomia de sanguessugas, uma vez que as descrições de espécies são pobres, não contemplando diversos caracteres diagnósticos. Autores recentes não consideram muitas sinonímias atribuídas por Ringuelet, como Christoffersen (2007, 2008, 2009). Contudo, este critério não é consistente entre todas as espécies listadas por diferentes autores. Como resultado, há uma variação muito ampla em relação ao número de espécies válidas atribuídas à América do Sul dependendo do autor que realiza a contagem.

1.3.2. Ausência de espécimes tipo

Muitos táxons registrados para a América do Sul foram descritos sem qualquer atribuição de material tipo. Bons exemplos são as espécies do gênero *Trachybdella* Pinto, 1920b, que aparentemente é amplamente distribuído pelo continente, mas Pinto não designou material tipo.

Outros exemplos são *Ozobranchus marcusi* Schlenz, 1971 e *Branchellion carvalhoi* Schlenz, 1971, ambas descritas em detalhes pormenorizados, mas tais descrições nunca foram publicadas formalmente, ou tiveram material tipo associado a elas.

1.3.3. Descrições pouco detalhadas

A maioria das descrições de espécies com registro para a América do Sul ainda possui descrições curtas e pouco detalhadas, não mencionando diversos caracteres de importância taxonômica. As espécies descritas anteriormente aos trabalhos de Raul A. Ringuelet (que compreende o período entre as décadas de 1940-1980) possuem descrições gerais e pouco claras, e poucas redescrições completas dessas espécies foram produzidas. Um exemplo destas descrições pouco detalhadas são os

trabalhos de Ávida-Goulart (1963, 1967), acerca dos hirudíneos do Estado de São Paulo, em que o autor fornece pequenas diagnoses contemplando apenas aspectos da morfologia externa.

De fato, a morfologia interna dos hirudíneos foi pouco explorada pela maioria dos principais autores que estudaram estes animais na América do Sul. Weber (1915), em sua monografia dos hirudíneos sul-americanos, utiliza poucos caracteres anatômicos, assim como também fez Pinto (1923). As espécies de *Helobdella* talvez sejam aquelas que melhor representam as descrições pouco informativas, já que se trata de animais de tamanho reduzido (variam entre 5-15 mm de comprimento) e de difícil dissecção.

Tentativas de aprimorar descrições de sanguessugas foram feitas por Schlenz (1971) e Souza (1978). As autoras utilizaram técnicas histológicas para a descrição detalhada de diversas espécies de sanguessugas marinhas e membros do gênero *Haementeria*, respectivamente.

Os primeiros trabalhos em periódicos científicos nos quais a microtomografia computadorizada (µCT) foi utilizada para acessar a morfologia interna de hirudíneos foram publicados em 2016. Em Tessler et al. (2016) e Iwama e Arruda (2016), novas espécies foram descritas utilizando µCT, para descrever ou confirmar descrições de estruturas que seriam dificilmente observadas com dissecções manuais.

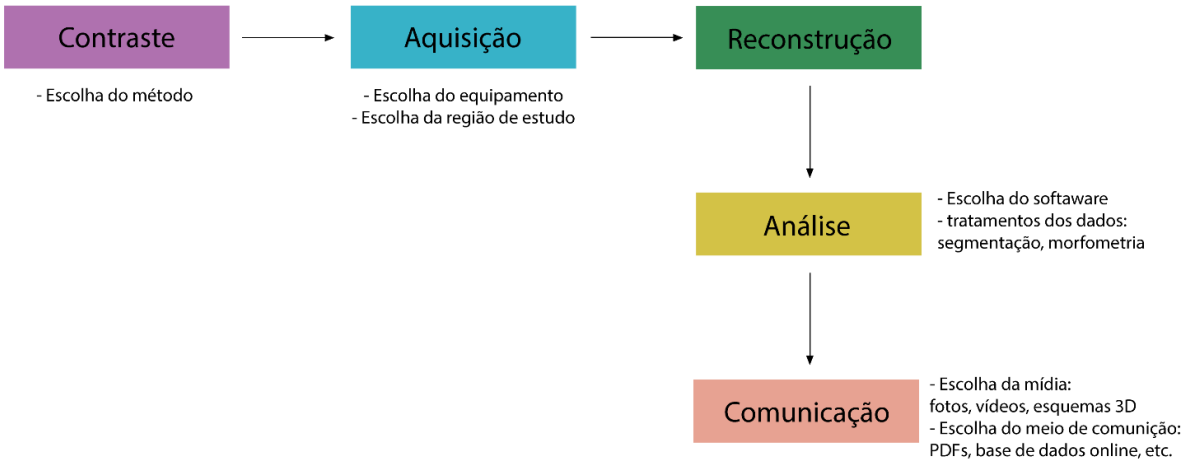
1.3.4. Problemas de nomenclatura

Muitas das estruturas analisadas sofrem com uma grande variação entre os autores acerca da nomenclatura utilizada. Particularmente, a morfologia externa sofre mais com este problema na literatura brasileira. Em Pinto (1923), por exemplo, as papilas segmentares são descritas como órgãos sensoriais não protuberantes. Já Souza (1978), utilizou o mesmo nome para descrever órgãos protuberantes, que se encontram em localização equivalente aos órgãos de Lang, típicos de *Haementeria*, grupo abordado pela autora.

1.4. Micro-tomografia computadorizada (µCT)

Considerando os problemas da taxonomia de hirudíneos na América do Sul e buscando novos caracteres para diferenciar os membros de espécies diferentes, uma das abordagens tomadas neste estudo foi a utilização da micro-tomografia computadorizada, cujos princípios serão tratados a seguir.

Figura 4. Etapas envolvidas no estudo morfológico de organismos de corpo mole com o método de µCT.

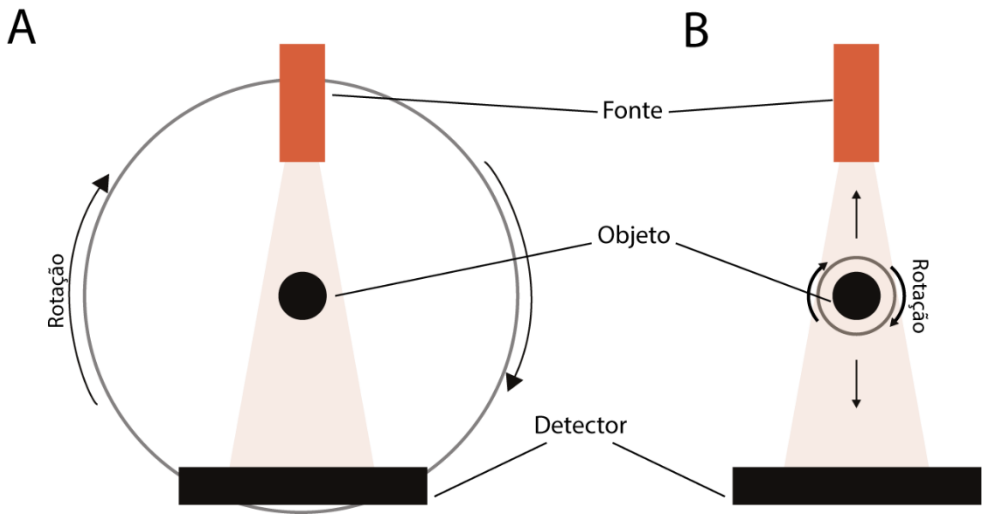


Fonte: próprio autor

1.4.1. Componentes dos microtomógrafos atuais

Todo tomógrafo consiste de três elementos básicos (figura 5) (Schambach et al., 2010). A fonte de raios X, o detector e a base, que sustenta o objeto a ser estudado. A fonte gera um feixe de raios X que passa pelo objeto e, ao final, é recebido pelo detector. Apesar de formado pelos mesmos componentes, há dois tipos de configuração de microtomógrafos disponíveis no mercado (Schambach et al., 2010). No primeiro tipo de configuração (figura 5a) a base é fixa e o sistema fonte-detector gira em torno do objeto escaneado, não sendo possível alterar a distância do objeto em relação à fonte e ao detector, o que limita a qualidade final da imagem. A segunda configuração de microtomógrafos (figura 5b) permite que esta distância seja alterada, uma vez que o sistema fonte-detector é fixo, mas a base é móvel e possui rotação sob seu próprio eixo, possibilitando aproximar ou distanciar o objeto da fonte, ou do detector.

Figura 5. Esquema representativo das duas configurações de microtomógrafos disponíveis no mercado. A. Microtomógrafo de base fixa, em que há apenas a rotação do sistema fonte-detector ao redor do objeto. B. Microtomógrafo de base móvel, em que a há a movimentação do objeto ao redor de si mesmo e em direção à fonte, ou ao detector.



Fonte: modificado de Schambach et al. (2010)

1.4.2. Métodos de contraste

Para que haja uma atenuação diferenciada de raios X entre tecidos moles capaz de gerar contraste suficiente para sua descriminação na imagem final da tomografia, é necessário o uso de compostos específicos, com números atômicos altos. Estes compostos se ligam ao tecido e aumentam a atenuação de raios X de forma diferenciada, já que a afinidade de cada composto é específica por um determinado tecido (Descamps et al., 2014). Elementos capazes de gerar bons resultados em tecidos biológicos possuem número atômico que varia de 67-83 (Mizutani & Suzuki, 2012).

Além disso, dois critérios fazem de um composto um bom agente de contraste. O mais importante deles é a possibilidade de aplicação em espécimes completos por submersão total, sem a necessidade de qualquer preparação específica ou secção do material. O segundo critério é relativo à penetração do agente de contraste no tecido, que deve se infiltrar facilmente através de camadas grossas de tecido biológico (Peterson et al., 2014).

Portanto, os melhores candidatos para o aumento do contraste em amostras biológicas de tecido exclusivamente mole são o iodo inorgânico, ósmio, tungstênio,

ouro e prata. Os mais comumente empregados são o lugol (iodo inorgânico), o nitrato de ósmio e o ácido fosfotúngstico. Alternativas aos metais acima citados utilizam-se da atenuação diferencial natural aos tecidos biológicos e, normalmente, dependem da desidratação do material, como é o caso do ponto crítico e do hexametildisilazane, que também podem ser utilizados para melhorar a qualidade do contraste produzido por outros compostos (Paterson et al., 2014). O anexo 1 fornece um resumo dos principais métodos de contraste e as metodologias padrão.

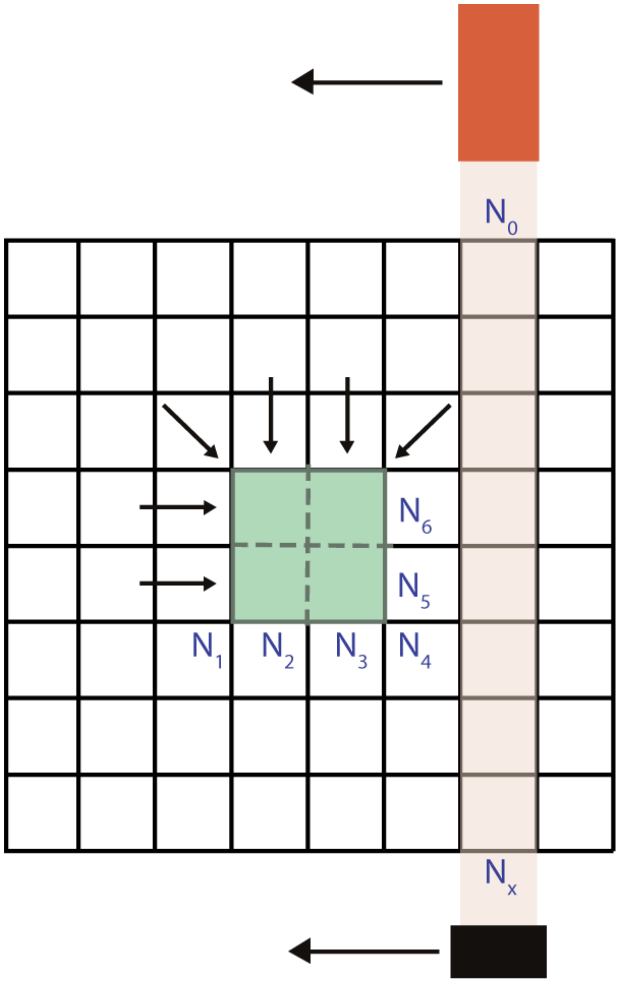
1.4.3. Aquisição e reconstrução: princípios básicos da µCT

Para entender os princípios básicos da µCT, será utilizado como modelo o primeiro tomógrafo, construído por Hounsfield (1973). A figura 6 esquematiza o aparelho e seu funcionamento. Basicamente, esta primeira geração de tomógrafos consistia de um tubo fonte de raios X e um detector, que estão alinhados de forma que os feixes de raios X emitidos passem em linha reta pelo objeto de estudo, alguns sendo absorvidos e outros chegando até o detector (figura 6). O feixe de raios X possui dimensões particulares que definem as dimensões do escaneamento da amostra, no caso do tomógrafo construído por Hounsfield, a dimensão era de 3 mm (no plano de corte) x 13 mm (perpendicular ao plano de corte). O sistema formado pela fonte e pelo detector movem-se linearmente através da amostra para coletar dados de toda a extensão do objeto. Este movimento é chamado de tradução e não está presente nos sistemas de CT atuais.

Portanto, o detector detectará a intensidade do feixe de raios X que chegam até ele (N_1), que será sempre menor que a intensidade conhecida que foi emitida pela fonte (N_0). Essa diminuição de intensidade se deve à absorção ocorrida naquela região específica do objeto e é chamada de atenuação (u). Portanto, o fenômeno anterior pode ser descrito da seguinte forma:

$$N_1 = N_0 - u$$

Figura 6. Funcionamento do microtomógrafo construído por Hounsfield (1973). A região em verde representa o objeto a ser escaneado e os valores N_{1-6} , a intensidade dos feixes de raios X atenuados pelo objeto. O sistema fonte-detector realiza dois movimentos, (a) o movimento linear pelo objeto e (b) o movimento de rotação ao redor do objeto.



Fonte: modificado de Goldman (2007)

Contudo, para que a imagem seja reconstruída, deve haver uma maior discriminação dos pontos de absorção de raios X. Desta forma, Hounsfield (1973) utilizou uma matriz tridimensional que divide o objeto de estudo (figura 6), onde os eixos X e Y definem o plano de corte e Z, a espessura do mesmo (estes eixos normalmente correspondem às dimensões dos feixes de raios X descritos acima). Portanto, a atenuação conferida ao objeto pode ser decomposta em um número igual ao número de quadrantes que o objeto ocupa. Desta forma temos:

$$N_1 = N_0 - (u_1 + u_2 + u_3 \ldots u_n)$$

Para que cada um destes quadrantes tenha sua atenuação definida, mais de um escaneamento deve ser feito em diferentes ângulos. Assim, diferentes equações podem ser compostas. Por exemplo, para um objeto composto por quatro quadrantes, seis equações podem ser deduzidas, no caso de quatro ângulos diferentes serem utilizados no escaneamento.

Ao final deste processo, são designados diferentes tons de cinza para os diferentes valores de atenuação, e então a imagem é formada. Apesar da necessidade do processo de tradução ter sido sanada por diferentes modelos de CT ao longo dos anos, e diferentes algoritmos terem aumentado a velocidade da determinação dos valores de atenuação, consequentemente, do processo de escaneamento, os princípios da tomografia computadorizada permanecem os mesmos.

1.4.4. Análise dos dados

Após o escaneamento e a reconstrução dos dados gerados nas matrizes mencionadas acima, eles precisam ser convertidos em imagens e há softwares específicos para processamentos de imagem 3D. Abel et al. (2012) lista os principais softwares utilizados na visualização de dados de tomografia computadorizada e suas funções. Dentre eles, destacam-se o VGStudio Max, o Amira e o ImageJ. Os dois primeiros softwares, por serem comerciais, possuem um grande número de funções e ferramentas, assim como uma interface mais intuitiva. O VGStudio Max, além de atuar na análise dos dados, também pode ser utilizado na reconstrução das imagens obtidas após o processo de aquisição. Ambos os softwares podem ser utilizados na visualização, processamento (análises morfométricas) e tratamentos das imagens, como, por exemplo, a segmentação (isolar regiões específicas de uma imagem, ex. sistema reprodutor), reconstrução de superfícies e etc. (FEI, 2017; Volume Graphics, 2017). Por outro lado, o ImageJ é um software “Open Source”, de domínio público, ou seja, não há direitos autorais associados a este programa, que pode ser alterado para que novas funcionalidades sejam incluídas (IMAGEJ, 2017). Esta característica faz com que este seja o mais versátil de todos os softwares disponíveis, contudo os plugins desenvolvidos para este programa são de difícil utilização, com interfaces pouco intuitivas.

Há outros Softwares livres que são utilizados na análise de dados, mas que contam com menos funções, como por exemplo o CTVox (Bruker), Seg3D e Blender (Bruker, 2017; Blender, 2017; Center for Integrative Biomedical, 2017). Contudo, se utilizados em conjunto, resultados similares aos softwares comerciais podem ser alcançados, dependendo da qualidade dos dados reconstruídos.

2. Materiais e métodos

2.1. Material analisado

Foram analisadas sanguessugas depositadas em duas coleções, a Coleção de Invertebrados Marinhos do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), onde também se encontram sanguessugas terrestres e de água doce, e a Coleção de Hirudíneos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CHI). Além do material depositado em museus, também houve algumas coletas de animais vivos.

2.2. Coleta e fixação

Os espécimes foram coletados ativamente. O coletor permaneceu no corpo d'água por aproximadamente 30-40 minutos, com a pele dos membros inferiores exposta, e realizou pequenos movimentos para que as sanguessugas detectassem a sua presença. A busca por espécimes na superfície da pele do coletor foi realizada a cada 2-3 minutos, para garantir que não houvesse ingestão de sangue pelo parasita. Quando o parasitismo foi efetivado, esperou-se que os indivíduos finalizassem a refeição, diminuindo o risco de infecção pelo coletor e de danificação do trato digestivo do animal.

Após coletados, os indivíduos foram anestesiados utilizando o aumento gradual de concentração de etanol, seguindo uma bateria de 4 etapas de concentração: 5%, 10%, 15% e 20%. Em seguida, os espécimes foram fixados individualmente em álcool 70% e 100%, e o muco secretado durante a fixação foi delicadamente removido, para melhor preservar o tegumento dos exemplares.

2.3. Análise dos dados

Os espécimes tiveram sua morfologia interna e externa analisadas utilizando quatro métodos: observação direta da morfologia externa sob estereomicroscópio e microscópio eletrônico de varredura, dissecção para análise da morfologia interna e microtomografia computadorizada. Para a observação dos vasos celômicos em Piscicolidae, foram realizadas lâminas histológicas em parafina, coradas com Hematoxilina de Meyer e Eosina; o protocolo utilizado é descrito no anexo 2.

Externamente, foram analisados a presença, disposição e localização dos tubérculos, órgãos de Lang, gonóporos e ânus. Foram utilizados o conceito de Castle-Moore (Castle, 1900; Moore, 1900) e a conotação de Moore (1899), para a determinação da anelação externa e dos limites externos dos segmentos. A localização externa dos órgãos é indicada pelo código do segmento e do anel externo (ex. XII a2), e, quando a posição é interanular, utiliza-se a conotação segmento+anel anterior/segmento+anel posterior (ex. XI b6/XII b1). Internamente, os limites dos segmentos não são delimitados, mas a indicação da posição ganglionar, ou interganglionar, é realizada pelo número do gânglio (posição ganglionar, XII) ou pela conotação número do gânglio anterior/número do gânglio posterior (posição interganglionar, ex. XI/XII). Os principais caracteres internos analisados estão relacionados ao trato digestivo, glândulas do complexo salivar, e sistemas reprodutores masculino e feminino. Os exemplares foram fotografados utilizando uma câmera AxioCan icc3, acoplada a um estereomicroscópio AxioScope.ai.

2.4. Microscopia eletrônica de varredura

Os espécimes foram desidratados com bateria de etanol (80%, 90%, 95% 100%) e submetidos ao ponto crítico. Em seguida, foram submetidos à metalização com ouro e à microscopia eletrônica de varredura, no Laboratório de Microscopia eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Foi utilizado o software Adobe Photoshop CS6 para o tratamento das imagens.

2.5. Microtomografia computadorizada

Dois microtomógrafos foram utilizados, um SkyScan 1272, com fonte de tungstênio Hamatsu e base móvel, e um SkyScan 1176, com fonte “PANalitical’s Microfocus Tube”, de base fixa. Dois métodos de contraste foram extensivamente utilizados nos espécimes estudados, o lugol 10% e o ácido fosfotúngstico 3%. As soluções foram preparadas seguindo protocolos sintetizados no anexo 1. As imagens foram reconstruídas com o software disponibilizado pelo fabricante do tomógrafo (NRecon 1.6.10.2, Bruker MicroCT, Kontich, Belgium). A tabela 1 mostra em detalhes os espécimes estudados, os métodos de contraste utilizados e os detalhes técnicos do escaneamento e reconstrução. Os dados foram analisados no software CTvox 3.3 e DATAVIEWER 1.5.

Tabela 1. Espécimes estudados e suas informações de coleta, dimensões e escaneamento.

Espécie (família)	Localidade	Dimensões	Área de escaneamento	Contraste	Tomógrafo	Parâmetros de escaneamento
Haementeria lutzi (Glossiphoniidae)	Botucatu, São Paulo, Fazenda Lageado	28 mm; 7 mm	Corpo inteiro	lugol	SkyScan 1176	8.71 µm; 33 kV; 336 µA; 35 min 24 s
Haementeria sp. 3 (Glossiphoniidae)	PETAR - Núcleo Santana, Iporanga, São Paulo	29 mm; 5 mm	Região anterior	lugol	SkyScan 1272	3.9 µm; 60 kV; 166 µA; 2 h 7 min 54 s
Placobdella sp 1. (Glossiphoniidae)	Estação Ecológica do Tapacurá, São Lourenço da Mata, Pernambuco	47 mm; 19 mm	Corpo inteiro	lugol	SkyScan 1176	12.4 µm; 37 kV; 520 µA; 22 min 30 s
Placobdella maculata (Glossiphoniidae)	Caracol, Parque Nacional Serra das Confusões, Piauí	11 mm; 4 mm	Corpo inteiro	Lugol	SkyScan 1272	4.4 µm; 60 kV; 166 µA; 32 min 11 s
Austrolobdella sp. (Piscicolidae)	Costa do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.	16 mm; 2 mm	Corpo inteiro	PTA	SkyScan 1272	3.9 µm; 35 kV; 140 µA; 3 h 09 min 09 s

Fonte: próprio autor

3. Resultados

Foram encontradas 14 espécies de sanguessugas parasitas da ordem Rhycobdellida para o território brasileiro, sendo duas espécies marinhas e 12 límnicas. Sete destas espécies não estão descritas na literatura, e os registros do gênero *Austrobdella* e de *Ozobranchus branchiatus* são os primeiros para o Atlântico Sul. O anexo 3 apresenta as espécies de Glossiphoniidae estudadas e resume seus principais caracteres.

3.1. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi eficaz para a análise dos tubérculos e dos detalhes na sua estrutura (figuras 9, 23, 28, 32), mas não para a observação dos órgãos de Lang. Em geral, a anelação externa não foi evidenciada neste método e, em algumas regiões do corpo, a visualização do limite de cada anel torna-se bastante limitada, especialmente na região da cabeça. Os gonóporos não puderam ser observados em nenhum exemplar submetido à microscopia eletrônica de varredura.

3.2. Tomografia computadorizada

Os únicos espécimes que não responderam adequadamente aos métodos tradicionais de contraste foram os membros de *Austrolobdella* sp. Não foi possível diferenciar os principais tecidos do corpo destes animais, como por exemplo o sistema digestório e o cordão nervoso ventral. O sistema celômico, cuja morfologia é muito importante para a taxonomia de Piscicolidae, não pôde ser delimitado, uma vez que o parênquima não foi diferenciado.

Foram obtidas boas resoluções para a maioria dos espécimes estudados, possibilitando a identificação e análise dos caracteres taxonômicos clássicos utilizados na taxonomia de hirudíneos. A tabela 3 resume a qualidade da representação dos principais caracteres nos espécimes estudados. Em geral, a superfície do corpo é bem definida e a anelação e ornamentação do tegumento podem ser facilmente observadas. No entanto, os poros presentes no corpo das sanguessugas podem estar inconspícuos nos resultados da µCT, como o gonóporo feminino e o poro bucal, que frequentemente são de difícil visualização.

Tabela 3. Qualidade dos escaneamentos de µCT para cada espécime.

Espécie	Localidade	Contraste	Morfologia externa	Morfologia interna
Haementeria lutzi	Botucatu, São Paulo, Fazenda Lageado	Iugol	Anelação: bem definida; poro bucal visível; poro anal visível; gonóporos visíveis	Cecos bem definidos; cordão nervoso visível, mas pouco definido; glândulas salivares definidas; átrio e ductos ejaculatórios visíveis
Haementeria sp. 3	PETAR - Núcleo Santana, Iporanga, São Paulo	Iugol	Anelação: visível apenas no ventre; poro bucal visível; gonóporos visíveis	Cecos visíveis; cordão nervoso visível, bem definido; glândulas salivares definidas; átrio e ductos ejaculatórios bem definidos; testículos inconspícuos
Placobdella sp. 1	Estação Ecológica do Tapacurá, São Lourenço da Mata, Pernambuco	Iugol	Anelação: bem definida; poro bucal visível; poro anal visivel; gonóporos dificilmente visualizados	Cecos visíveis; cordão nervoso visível, bem definido; glândulas salivares definidas; átrio e ductos ejaculatórios bem definidos; testículos inconspícuos
Placobdella maculata	Caracol, Parque Nacional Serra das Confusões, Piauí	Lugol	Anelação: bem definida; poro bucal visível; poro anal visivel; gonóporos dificilmente visualizados	Cecos visíveis; cordão nervoso visível, bem definido; glândulas salivares definidas; átrio e ductos ejaculatórios bem definidos; testículos inconspícuos
Austrolobdella sp.	Costa do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.	PTA	Anelação: pouco definida; poro bucal não visível; gonóporos não visiveis	Sem delimitação dos órgãos internos, tecidos adquirem aspecto granulado.

Fonte: próprio autor

Quanto à morfologia interna, as estruturas mais evidentes são os cecos gástricos. Isto ocorre, provavelmente, pela presença de hemoglobina no trato digestivo de espécies hematófagas. Os cecos intestinais, por outro lado, podem ser observados apenas por uma fina camada de tecido de interior oco. Glândulas salivares difusas são melhores observadas em comparação com glândulas compactas, devido à presença das mesmas por quase toda a extensão dorso-ventral do parênquima, enquanto as compactas se encontram bem delimitadas, embora as características importantes só possam ser observadas tridimensionalmente.

Os sistemas reprodutores masculino e feminino adquirem alto contraste, permitindo a fácil visualização das estruturas, inclusive do complexo conjunto de tubos ejaculatórios. A única exceção são os testículos, que, na maioria dos

espécimes, não são distinguíveis pela tomografia computadorizada. Os ovários tubulares de Glossiphoniidae são visíveis por toda a sua extensão. A base que contém o gonóporo feminino e o anel ao redor do cordão nervoso são facilmente identificados. O celoma é facilmente distinguível, por ser representado por uma região escura, formando os vasos celômicos laterais, ventral e dorsal, e especializações.

O lugol foi o único contraste que se mostrou eficiente para amostras de todas as dimensões como mostra a tabela 2. Apesar de ter produzido ótimos resultados, o PTA não se mostrou eficiente para amostras grandes e médias. Assim, não foi dado prosseguimento com o processo de escaneamento destas amostras. Em amostras pequenas, foi empregado o DMSO, para que se atingisse um bom índice de contraste.

3.3. Seção taxonômica

Família Glossiphoniidae Vaillant, 1890

Diagnose: corpo lanceolado, sublanceolado ou subcilíndrico, achatado dorso-ventralmente, não dividido em regiões distintas; ventosa anterior ventral; gonóporos separados por 1–4 anéis primários; faringe protraível; glândulas salivares conectadas à base da faringe; cecos gástricos em número variável, último par normalmente com trajeto descendente; quatro pares de cecos intestinais.

Chave para identificação dos gêneros de Glossiphoniidae registrados no território brasileiro.

1a. Segmentos da região mediana do corpo composto por 3 anéis primários sem subdivisões..... 2

1b. Segmentos da região com anelações secundárias..... 3

2a. Manchas metaméricas circulares em a2 ausentes; órgãos esofágicos ausentes; ductos ejaculatórios com porções ascendente e descendente; último par de cecos gástricos sem ramificações secundárias ..... *Helobdella*[1]

2b. Manchas metaméricas circulares em a2 presentes; órgãos esofágicos presentes; ductos ejaculatórios apenas com porção ascendente; último par de cecos gástricos com ramificações secundárias ..... *Placobdella* (em parte)

[1] espécies predadoras, frequentemente encontradas em foresia com anfíbios e répteis.

3a. Segmentos da região mediana do corpo compostos por dois anéis, tanto dorsal, quanto ventralmente, [(a1+a2)+(a3)]..... *Placobdella*[2]

3b. Segmentos da região mediana do corpo compostos por três anéis primários subdivididos, normalmente [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] na face ventral, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] na face dorsal ..... *Haementeria*

Haementeria Filippi, 1849

Diagnose: tubérculos dorsais presentes, dispostos em fileiras longitudinais; órgãos de Lang nos anéis a2; segmentos do meio do corpo compostos por 3 anéis primários subdivididos, normalmente face ventral [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] e face dorsal [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)], ou por 2 anéis, [(a1+a2)+(a3)]; gonóporos separados por 1 ou 2 anéis primários; dois pares de órgãos esofágicos esféricos, conectados ao esôfago por ductos; base do ovário formando anel ao redor do cordão nervoso ventral.

Comentários: a diagnose do gênero foi emendada para acomodar a espécie bianulada *Haementeria* sp. (Cordero, 1937), transferida para este gênero por Oceguera-Figueroa (2012). Mais detalhes são abordados nas discussões na sequência.

Chave para as espécies de *Haementeria* registradas para o território brasileiro[5]

1a. Segmentos da região mediana o com padrão de anelação diferente de fórmula [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre 2

1b. Segmentos da região mediana com fórmula [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre..... 5

[2] ver discussão sobre o gênero (pág. 103).

[5] as espécies não analisadas neste trabalho foram incluídas na chave baseado em descrições disponíveis na literatura (Ávida-Goulart, 1963, 1967; Christoffersen, 2007; Cordero, 1937a, b; Pinto, 1920a, 1923; Ringuelet, 1944, 1985; Souza, 1978; Weber, 1915).

2a. Segmentos da região mediana compostos por três anéis primários indivisos, [(a1)+(a2)+(a3)] ..... *H. steineri*[6] Holtz-Bolinger, 1891

2b. Segmentos da região mediana com fórmula [(a1+a2)+(a3)] no dorso e no ventre, ou [(a1)+(a2)+(a3)] no dorso e [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre..... 3

3a. Segmentos da região mediana com fórmula [(a1)+(a2)+(a3)] no dorso, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre 4

3b. Segmentos da região mediana com fórmula [(a1+a2)+(a3)], tanto no dorso quanto no ventre ..... *H. brasiliensis sensu* Cordero, 1937[7]

4a.Tubérculos dorsais em grande número, formando aproximadamente 30 fileiras longitudinais; glândulas salivares compactas ..... *H. ghilianii* Filippi, 1849

4b. Tubérculos dorsais ausentes; glândulas salivares difusas ..... *H. laevis*[8] (Weber, 1915)

5a. Gonóporo masculino em XII b2/a2, feminino em XII a2/b5 6

5b. Gonóporo masculino em XI b6/XII b1, feminino em XII a2/b5 9

6a. Um par de glândulas salivares..... *H.* sp. 4

6b. Dois pares de glândulas salivares 7

7a. Apenas uma fileira longitudinal de tubérculos dorsais por segmento, em a2 ..... *H. molesta*[9] (Cordero, 1934)

7b. Mais de uma fileira longitudinal de tubérculos dorsais por segmento 8

[6] a descrição original inclui caracteres típicos de *Helobdella*.

[7] a espécie foi transferida para *Haementeria* por Oceguera-Figueroa (2012), mas outras espécies espécies com o mesmo padrão de anelação estão atualmente alocadas em *Placobdella.*

[8] Weber (1915) descreve esta espécie sem uma descrição efetiva dos espécimes. A morfologia do trato digestivo e a presença de glândulas salivares difusas tornam duvidoso o posicionamento desta espécie em *Haementeria*.

[9] esta espécie carece de descrições da morfologia interna.

8a. Bulbo faríngeo presente; dois pares de glândulas salivares compactas, conectadas ao bulbo faríngeo por ductos independentes, primeiro par esférico, segundo par alongado e subdividido..... *H.* sp. 2
8b. Bulbo faríngeo ausente; dois pares de glândulas salivares alongadas, conectadas diretamente ao bulbo faríngeo, sem ductos..... *H.* sp. 1

9a. Tubérculos ventrais presentes, formando 4-6 fileiras longitudinais ..... *H. paraguayensis* (Weber, 1915)
9b. Tubérculos ventrais ausentes 10

10a. Fileira mediana de tubérculos dorsais ausente, ou com tubérculos apenas em a1 11
10b. Fileira mediana de tubérculos dorsais com tubérculos em todos os anéis primários 14

11a. Primeiro par de glândulas salivares alongado e subdividido..... *H.* cf. *brasiliensis* (Weber, 1915)
11b. Primeiro par de glândulas salivares cilíndrico, indiviso 12

12a. Ductos ejaculatórios formando estrutura espiralada antecedendo o átrio 13
12b. Estrutura espiralada ausente, parte final dos ductos ejaculatórios reta ..... *H. depressa* (Cordero, 1934)

13a. Par posterior de glândulas salivares reto ..... *H. vizottoi* Castro, 1971
13b. Par posterior de glândulas salivares, com curvas espiraladas na base ..... H. *lutzi* Pinto, 1920

14a. Dois pares de glândulas salivares compactas, primeiro par cilíndrico, conectado ao bulbo faríngeo por ductos independentes, segundo par alongado, conectado diretamente ao bulbo faríngeo, sem ductos ..... *H. tuberculifera*[10] (Grube, 1871)

14b. Dois pares de glândulas salivares compactas alongadas, conectados diretamente ao bulbo faríngeo ..... *H.* sp. 3

Haementeria cf. *brasiliensis* (Weber, 1915)

Material analisado: Brasil, localidade desconhecida, 06 espécimes (MZUSP 0217), data de coleta desconhecida.

Diagnose: um par de ocelos em vírgula, próximos entre si, normalmente fundidos; poro bucal na extremidade anterior do corpo; 6 linhas longitudinais de tubérculos grandes; 22 linhas longitudinais de tubérculos pequenos, presentes em cada anel primário do dorso e do ventre; gonóporos separados por 2 anéis primários; segmentos da região mediana do corpo compostos por 3 anéis primários, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no dorso, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no ventre; 2 pares de glândulas salivares; 7 pares de cecos gástricos, primeiro par ramificado, último par formando trajeto descendente; ductos ejaculatórios formando uma curva pré-atrial; 6 pares de sacos testiculares.

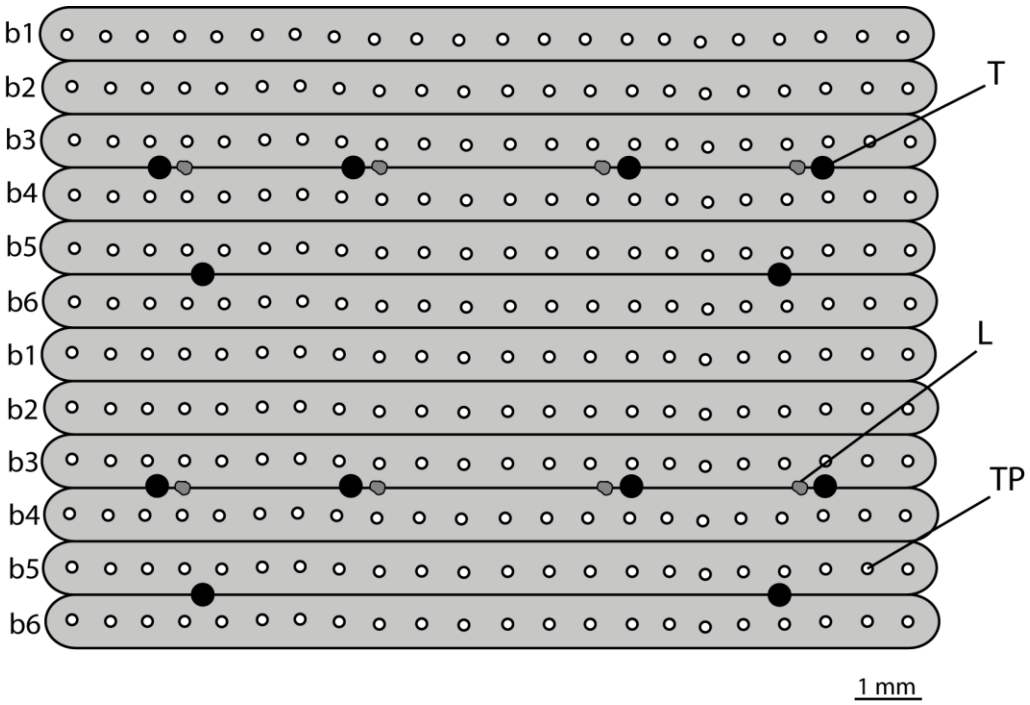
Formato do corpo: comprimento máximo 25-37 mm; largura máxima 10-14 mm; corpo lanceolado, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior triangular, bem desenvolvida; margens dos anéis evidentes; região anterior afilada; cabeça triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, ventral, largura máxima 2-5 mm.

Morfologia externa: corpo uniformemente marrom, depois de fixado, sem detalhes na pigmentação; 6 linhas longitudinais de tubérculos entre os anéis primários no dorso (figura 7), 1 par paramediano e outro paramarginal em cada a2; 1 par paramarginal em cada a3, fileira mediano-dorsal de tubérculos ausente; até 22 linhas longitudinais de tubérculos pequenos no ventre e dorsal de cada anel secundário; tubérculos inconspícuos na região anterior do corpo; dois pares de ocelos em III (figura 8D), em vírgula, próximos entre si, ou, mais frequentemente, fundidos, formando mancha

[10] Esta espécie carece de descrição da morfologia interna.

central única; glândula nucal ausente; escudo quitinoso ausente; poro bucal na região anterior da ventosa; gonóporos separados por 2 anéis primários (figura 8A), masculino em XI b6/XII b1, feminino em XII a2/b6; ânus em XVII, seguido de 1 anel pós anal (figura 8B); segmentos I-II unianulados, segmentos III-V bianulado, segmentos VI-XXVI com 3 anéis primários cada, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no dorso, segmento XXVII bianulado.

Figura 7. Esquema da região mediana do corpo de *Haementeria* cf*. brasiliensis*, vista dorsal. L: órgãos de Lang; T: tubérculos; TP: tubérculos pequenos.

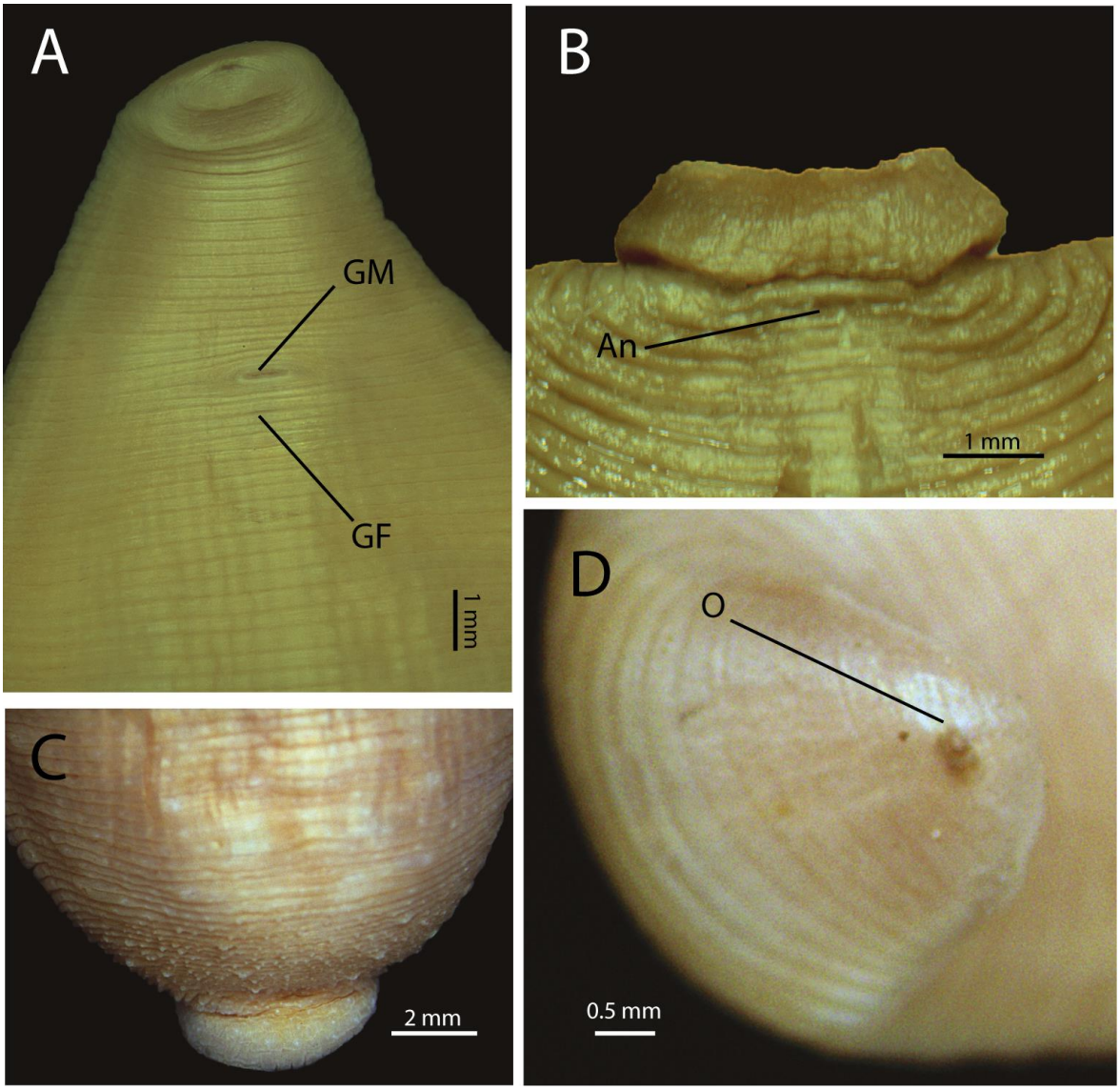


Fonte: próprio autor

Morfologia interna: faringe formando curva em XIII; bulbo faríngeo em XII; 2 pares de glândulas salivares, conectadas diretamente ao bulbo faríngeo; as do par anterior alongadas (figura 9B), subdivididas; par posterior também alongado, mas sem subdivisões; 2 pares de órgãos esofágicos cilíndricos em XII, conectados ao esôfago por 2 ductos independentes; 7 pares de cecos gástricos (figura 9A), primeiro par em XIII, com 3 ramos secundários; pares 2-6 simples, último par em XIX, formando um trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais simples; sistema reprodutor masculino formado por átrio localizado anteriormente ao gânglio XII (figura 9C), posicionado verticalmente em relação ao cordão nervoso ventral; porção ascendente

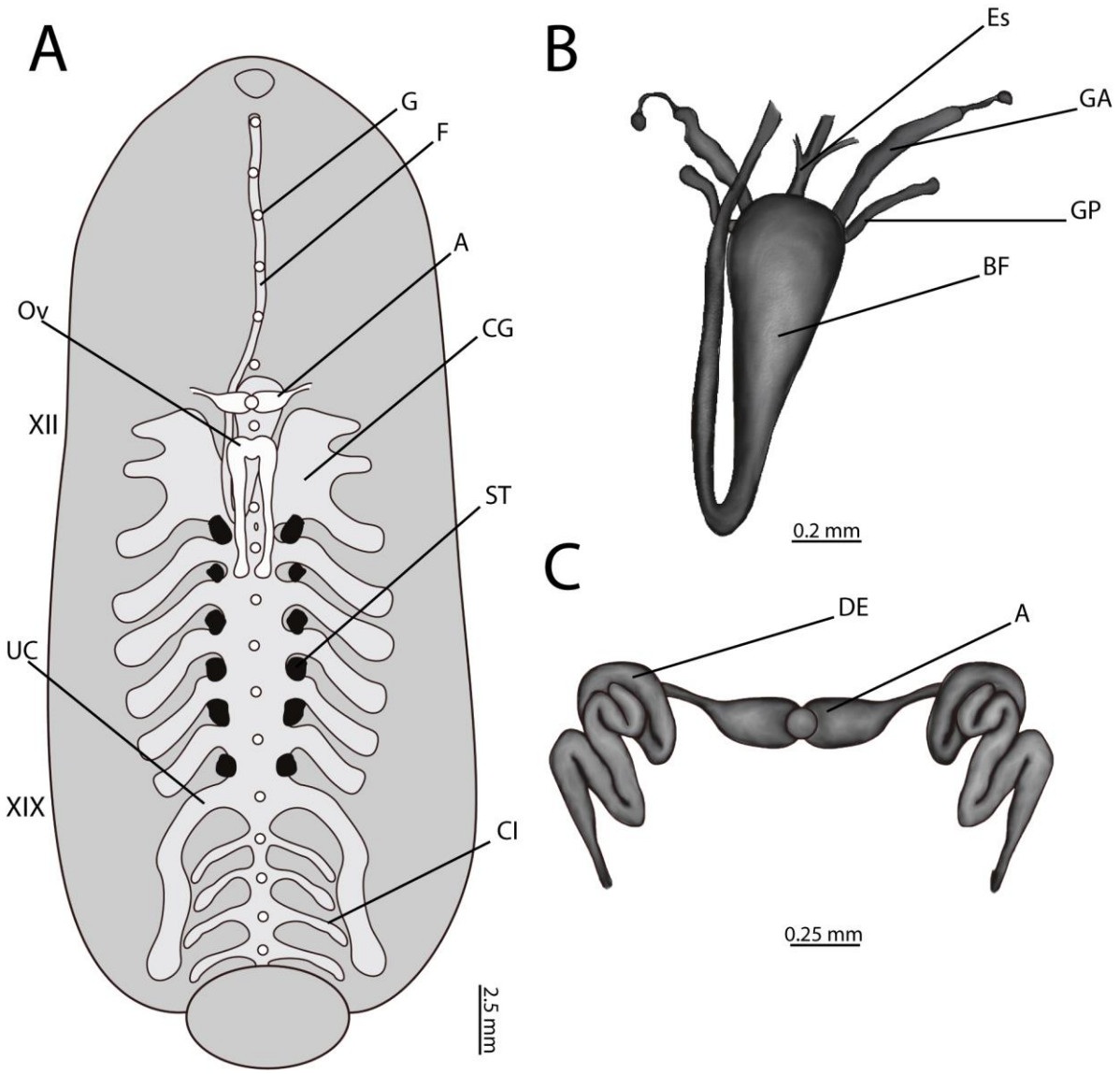
dos ductos ejaculatórios formando um estrutura em espiral (figura 9C); 6 pares de sacos testiculares (figura 9A), primeiro par em XIII, último par em XVIII/XIX; ovários simples, formando anel ao redor do cordão nervoso ventral.

Figura 8. *Hamenteria* cf. *brasiliensis.* A. Região anterior, vista ventral. B. Região posterior, vista dorsal. C. Região posterior, vista dorsal. D. Região da cabeça, vista dorsal. An: ânus; GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; O: ocelos.



Fonte: próprio autor

Figura 9. Morfologia interna de *Haementeria* cf*. brasiliensis*. A. Esquema da morfologia interna, vista ventral. B. Complexo salivar, vista ventral; C. Sistema reprodutor masculino, vista ventral. A: átrio; BF: bulbo faríngeo; CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; Es: esôfago; F: faringe; G: gânglios; GA: glândula salivar anterior; GP: glândula salivar posterior; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Comentários: *Haementeria brasiliensis* foi descrita por Weber (1915), em uma monografia não publicada formalmente, portanto a espécie não é válida. Ringuelet (1985), baseado apenas em caracteres externos, sinonimizou esta espécie com *H. depressa*, cujos membros se assemelham aos de *H. vizottoi* pela presença de seis pares de linhas longitudinais de tubérculos paramarginais e paramedianos, uma das quais presente apenas nos anéis a3. Contudo, a fileira mediano-dorsal de tubérculos está presente em membros de *H. vizottoi* (Souza, 1978) e ausente nos de *H. brasiliensis* (Weber, 1915) e nenhuma variação intraespecífica como esta é descrita por Souza (1978), ou observada nos exemplares estudados de nenhuma espécie. A morfologia interna de membros de *H. brasiliensis* é completamente desconhecida, sendo difícil afirmar com segurança que os espécimes cuja morfologia externa seja compatível com a descrição desta espécie realmente pertençam à mesma. No entanto, os exemplares estudados diferem de membros das outras espécies de *Haementeria* já descritas, principalmente pela morfologia das glândulas salivares anteriores, que são subdivididas. *Haementeria* sp. 3, descrita abaixo, também apresenta glândulas salivares subdivididas, porém estas correspondem ao par posterior.

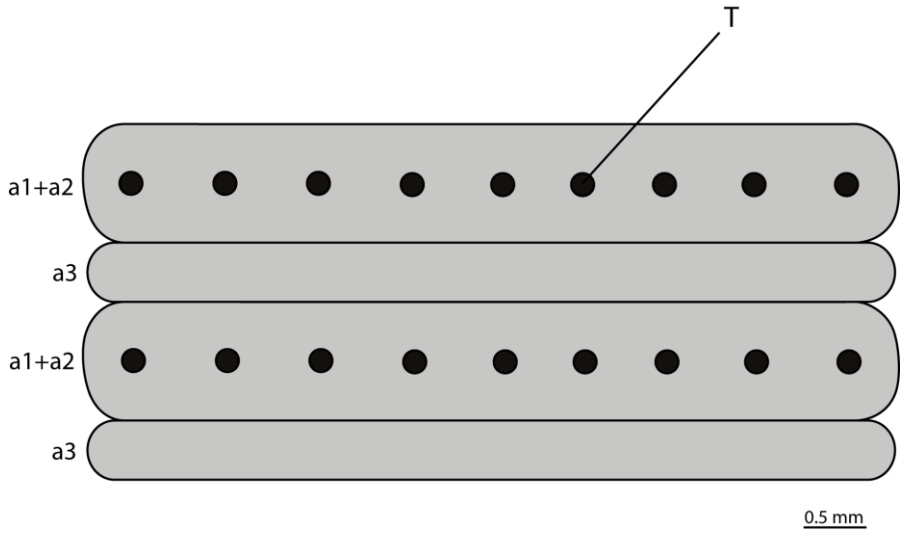
***Haementeria brasiliensis sensu* Cordero, 1937**

Material examinado: Sergipe: Poço Redondo, 16 espécimes (CHI-29), em *Phrynops geoffroanus*, 23/Jun/2015; Poço Redondo, 90 espécimes (CHI-30), em *Phrynops geoffroanus,* 30/Jun/2014; Poço Redondo, 2 espécimes (CHI-31), em *Phrynops geoffroanus,* 22/Jun/2014; Poço Redondo, 1 espécime (CHI-39), em *Phrynops geoffroanus,* 30/Jun/2014; Poço Redondo, 6 espécimes (CHI-41), em *Phrynops geoffroanus,* 30/Jun/2014; Poço Redondo, 1 espécime (CHI-47), em *Phrynops geoffroanus,* 24/Jun/2014; Poço Redondo, 5 espécimes (CHI-48), em *Phrynops geoffroanus,* 30/Jun/2014; Poço Redondo, 5 espécimes (CHI-49), em *Phrynops geoffroanus,* 30/Jun/2014; Poço Redondo, 2 espécimes (CHI-50), em *Phrynops geoffroanus,* 30/Jun/2014.

Diagnose: um par de ocelos em II, circulares, separados entre si; poro bucal na região anterior da ventosa; manchas paramarginais escuras ausentes em ambas as faces; 9 linhas longitudinais de tubérculos na superfície dorsal, com distribuição irregular; órgãos de Lang ausentes; gonóporos separados por um anel (a1+a2); segmentos da região mediana do corpo bianulados, [(a1+a2)>(a3)]; bulbo faríngeo ausente; 2 pares de glândulas salivares compactas; 2 pares de órgãos esofágicos, conectados ao esôfago por ductos independentes; 7 pares de cecos gástricos; curva pré-atrial presente; porção ascendente dos ductos ejaculatórios formando enovelado; 6 pares de sacos testiculares.

Formato do corpo: comprimento máximo 4-8 mm; largura máxima 2-4 mm; corpo lanceolado, achatado dorso-ventralmente, face ventral côncava; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis evidentes; região anterior afilada; cabeça triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, terminal, largura máxima 1-2 mm.

Figura 10. Esquema dos segmentos da região mediana do corpo de *Haementeria brasiliensis sensu* Cordero, 1937 T: tubérculos.

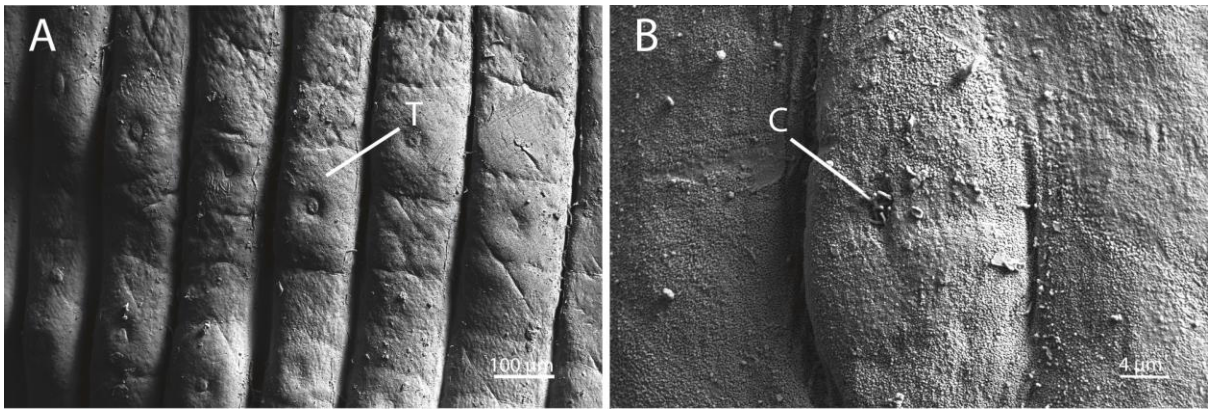


Fonte: próprio autor

Morfologia externa: corpo uniformemente amarelado, sem padrões de pigmentação característicos; manchas metaméricas ausentes; 7-9 linhas longitudinais de tubérculos ciliados no dorso (figuras 10 e 11), dispostos irregularmente; órgãos de Lang ausentes; um par de ocelos em III (figura 12D), circulares, completamente separados; poro bucal na margem anterior da ventosa; gonóporos separados por 1 anel (a1+a2) (figura 12E); masculino em XI a3/XII (a2+a3), feminino em XII

(a1+a2)/XII a3; ânus em XXVII (figura 12C), seguido por 1 anel pós-anal; segmentos I-IV unianulados; segmentos V-XXVII bianulado, anéis primários a1 e a2 fundidos em anel único, [(a1+a2)>(a3)], em ambas as faces.

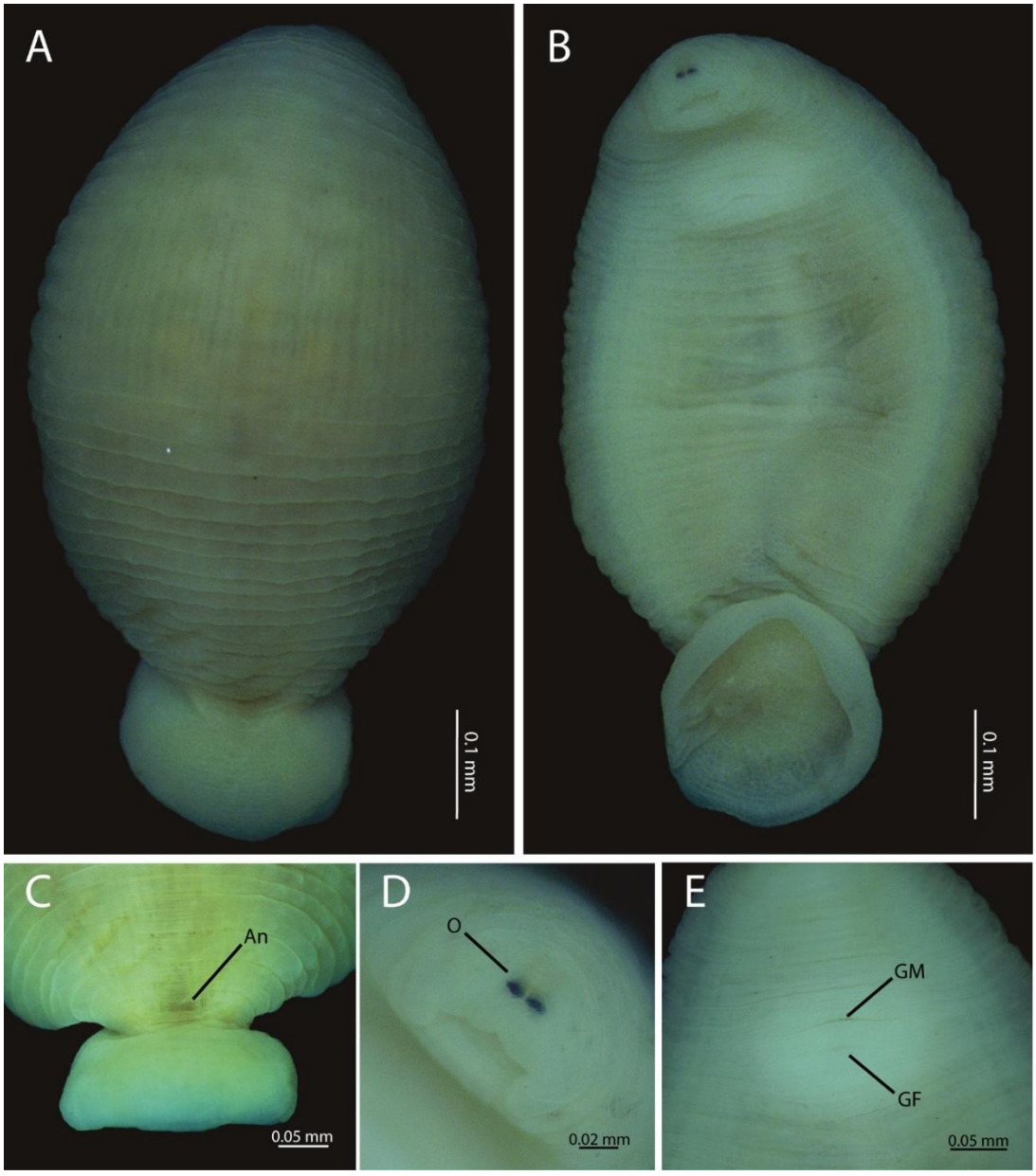
Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura, *Haementeria brasiliensis sensu* Cordero, 1937. A. tubérculos dorsais, morfologia geral. B. Cílios dos tubérculos dorsais. C: cílios; T: tubérculos.



Fonte: próprio autor

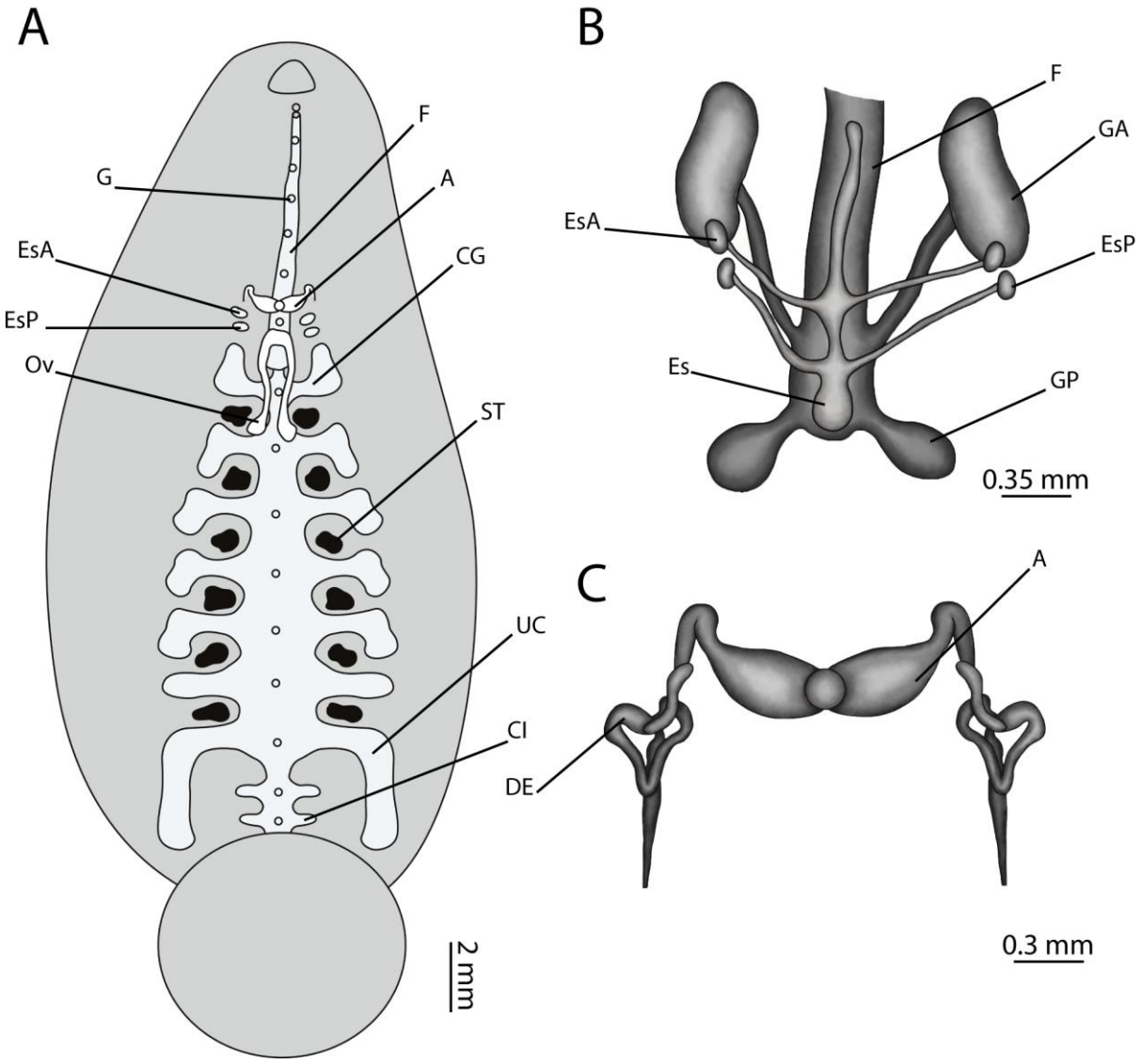
Morfologia interna: curva da base da faringe ausente; base da faringe em XII; bulbo faríngeo ausente; 2 pares de glândulas salivares compactas (figura 13B), par anterior em XII, ovalado, conectado à base da faringe por ductos salivares; par posterior esférico, conectado diretamente à base da faringe; 2 pares de órgãos esofágicos esféricos em XII (figura 13B), conectados ao esôfago por finos ductos independentes; 7 pares de cecos gástricos (figura 13A), primeiro par em XIII, não ramificado, base afilada, região distal dos pares 1-5 com leve trajeto descente, último par em XIX, com longo trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais simples; sistema reprodutor masculino formado por átrio anterior ao gânglio XII; ductos ejaculatórios enovelados, formados por um complexo de curvas em XII (figura 13C); curva pré-atrial presente, de comprimento variado; 6 pares de sacos testiculares (figura 13A), primeiro par em XIII/XIV, último par em XVIII/XIX; ovários simples, não ramificados, longos, formando anel ao redor do cordão nervoso ventral.

Figura 12. *Haementeria sensu* Cordero, 1937. A. Vista dorsal. B. Vista ventral. C. Região posterior mostrando o ânus, vista dorsal. D. Região da cabeça mostrando os ocelos, vista dorsal. E. Região genital mostrando os gonóporos, vista ventral. An: ânus; GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; O: ocelos.



Fonte: próprio autor

Figura 13. Esquema de *Haementeria brasiliensis* sensu Cordero, 1937 A. Morfologia geral, vista ventral, o complexo salivar e parte dos sistemas reprodutores masculino e feminino foram omitidos. B. Detalhe do complexo salivar, vista ventral. C. Detalhe do sistema reprodutor masculino, vista ventral. A. átrio; CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; Es: esôfago; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G: gânglios; GA: glândulas salivares anteriores; GP: gânglios salivares posteriores; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Comentários: *Haementeria brasiliensis sensu* Cordero, 1937 estava originalmente em *Oligobdella*, que foi sinonimizado com *Placobdella* (Siddall et al., 2005). A espécie foi formalmente transferida para *Haementeria* por Oceguera-Figueroa (2012), baseado em dados moleculares. Como o epíteto 'brasiliensis' já está ocupado por *H. brasiliensis* (Weber, 1915), um novo nome deve ser atribuído a esta espécie em uma publicação formal, razão pela qual ela é aqui tratada como *H. brasiliensis sensu* Cordero, 1937.

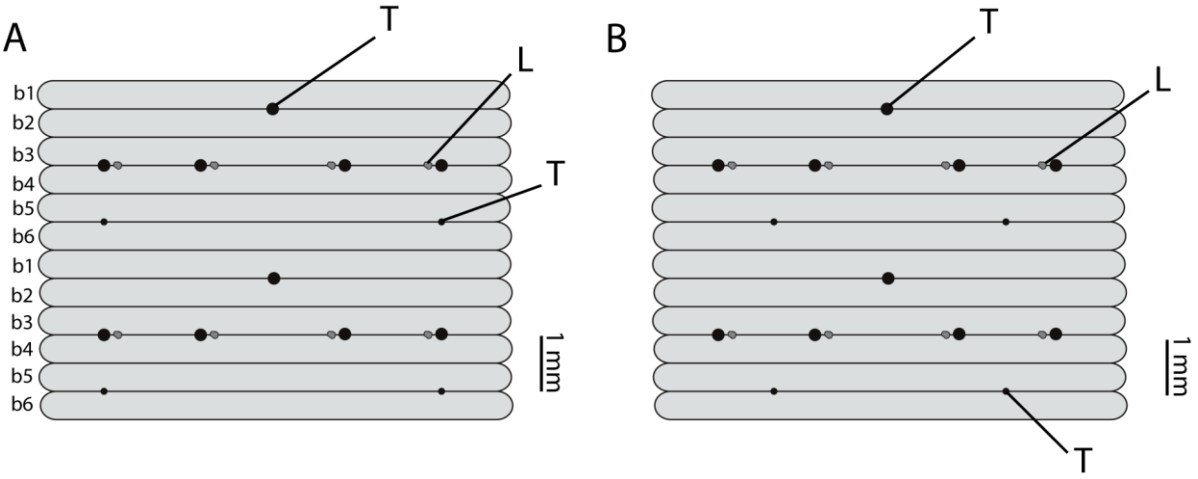
Outras espécies sul-americanas de *Oligobdella* continuam formalmente em *Placobdella*, como se segue abaixo. A morfologia interna de membros de *H. brasiliensis sensu* Cordero, 1937 não é conhecida, mas os trabalhos de Cordero (1937) e Ringuelet (1944, 1985) descreverem em detalhes a morfologia externa de animais desta espécie. Contudo, o desconhecimento sobre a anatomia interna torna difícil a identificação de indivíduos, mesmo que os caracteres externos sejam compatíveis com *H. brasiliensis sensu* Cordero, 1937. A ausência de fileiras longitudinais principais de tubérculos grandes é a principal característica de membros desta espécie e os diferencia das sanguessugas de todas as outras espécies pertencentes a este gênero, com exceção de *Placobdella* sp. 2, descrita abaixo (pág. 82).

Haementeria lutzi Pinto, 1920a

Material examinado: Goiás: Goiânia, um espécime (MZUSP 0224), 1997. Minas Gerais: Mariliéria, Parque Estadual do Rio Doce, três espécimes (MZUSP 0231), Jul 1985. São Paulo: Promissão, dois espécimes (MZUSP 0222), Jan 1968; Botucatu, Fazenda Lageado, quatro espécimes (MZUSP 0226), Dez 1985; Paulínia, um espécime (MZUSP 0220), Mar 1974. Rio Grande do Sul, Tapes, Capão da Mangueira, um espécime (MZUSP 0225), 1974.

Diagnose: um par de ocelos em vírgula, próximos entre si, às vezes fundidos; poro bucal na região anterior da ventosa; 6-7 linhas longitudinais de tubérculos; gonóporos separados por 2 anéis primários; somitos do meio do corpo compostos por 3 anéis cada, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso; 2 pares de glândulas salivares compactas sem subdivisões, par posterior cilíndrico; sete pares de cecos gástricos, curva pré-atrial presente, 6 pares de sacos testiculares.

Figura 14. Ornamentação dorsal dos segmentos de *Haementeria lutzi*. A. tubérculos a3 formando uma única fileira longitudinal com os tubérculos marginais de a2. B. tubérculos de a3 entre as fileiras marginais e paramedianas de tubérculos em a2. L: órgãos de Lang; T: tubérculos.



Fonte: próprio autor

Formato do corpo: comprimento 16-44 mm; largura máxima 6-12 mm; corpo sub-lanceolado, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margem dos anéis primários evidentes; região anterior afilada; cabeça triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, largura máxima 2-4 mm.

Morfologia externa: corpo uniformemente amarelo, sem ornamentação na pigmentação; poros epidérmicos em toda a superfície do corpo (figura 16D); 5-7 linhas longitudinais de tubérculos (figuras 14 e 15D), uma mediana em cada a1; duas linhas paramedianas e duas marginais, em cada a2, às vezes linhas paramarginais posicionadas marginalmente, formando 5 linhas longitudinais; duas submarginais, em cada a3, cílios ausentes, ornamentação formada por 4-6 papilas (figura 9); 4 linhas longitudinais de órgãos de Lang em a2, em formato de barra (figuras 14 e 16A), um par paramarginal, um par paramediano; um par de ocelos em II ou II/III (figura 15A), formato de vírgula, próximos entre si, às vezes fundidos, formando uma mancha central; poro bucal na região anterior da ventosa; gonóporos separados por 2 anéis primários (figura 15B), masculino em XIb6/XIIb1, feminino em XIIa2/XIIb5; ânus em XVII (figura 15F), seguido por 2 anéis pós anais; segmentos I-II compostos por 1 anel cada; segmentos III-IV com 2 anéis cada; segmentos V-XXV compostos por 3 anéis

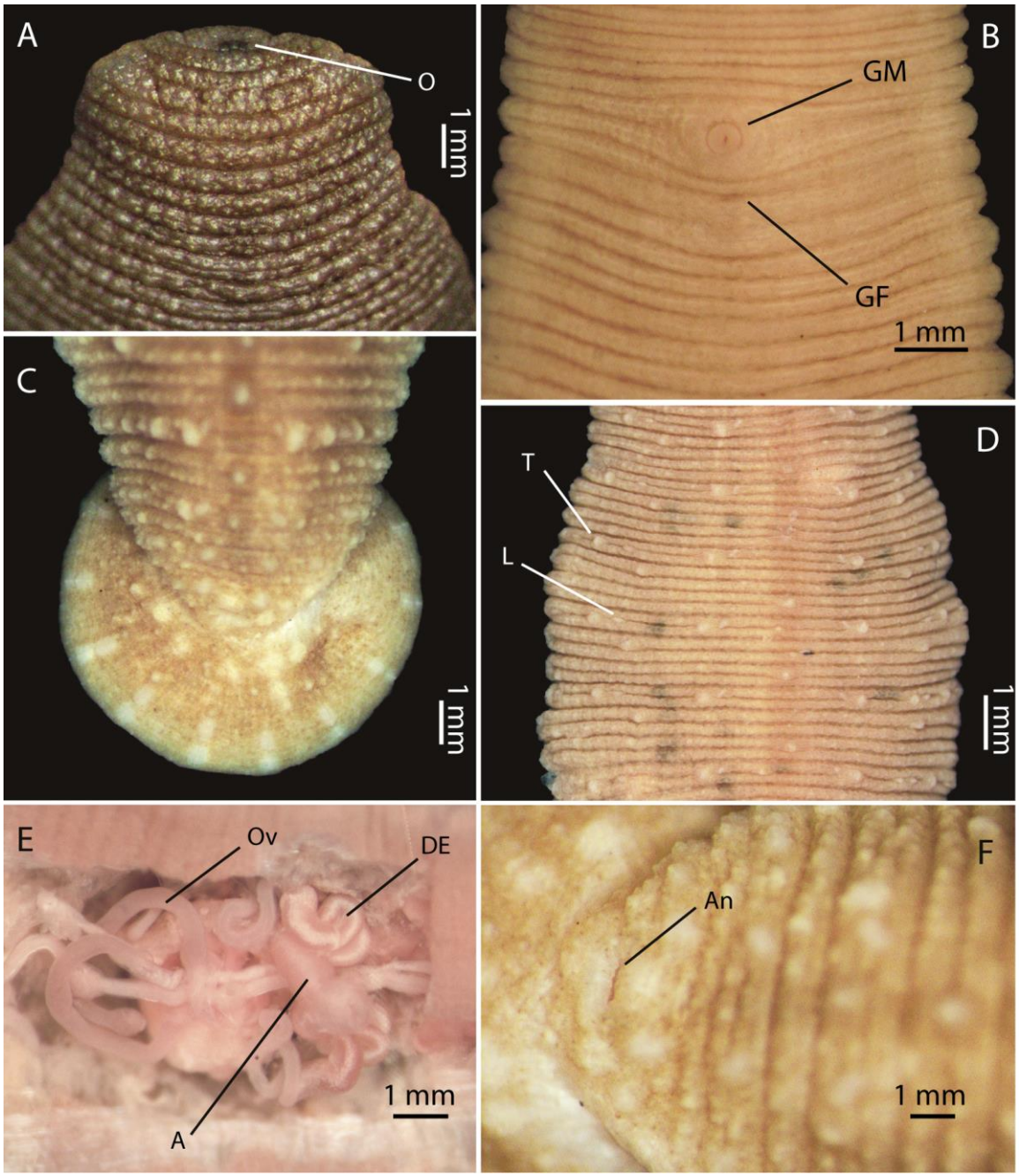
primários, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre (figura 17A), [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso (figura 17F); segmentos XXVI-XXVII também bianulados.

Morfologia interna: faringe formando uma curva em XII/XIII, às vezes reta; base da faringe em XII; 2 pares de glândulas salivares em massas compactas, par anterior em X ou XI, cilíndrico, glândulas grossas e curtas, ou finas e longas, ductos conectados à porção lateral da base da faringe, sem subdivisões; par posterior em XII, tubulares, enoveladas, conectadas à porção lateral da região globular da faringe, sem subdivisões; 2 pares de órgãos esofágicos em XII (figura 18C), conectados ao esôfago por um par de ductos comuns, que se ramifica na região mais distal, primeiro par cilíndrico, segundo par esférico; sete pares de cecos gástricos (figuras 17C e 18A), primeiro par em XIII, com ramificação anterior, último par em XIX, formando trajeto descendente; quatro pares de cecos intestinais, divertículos secundários ausentes; sistema reprodutor masculino formado por átrio anterior a XII, posição vertical; ductos ejaculatórios formados por porção ascendente, dilatada em XII, às vezes porção descendente dos ductos ejaculatórios ausente; curva pré-atrial dos ductos ejaculatórios presente, formando estrutura em espiral; porção ascendente dos ductos ejaculatórios altamente enovelada (figuras 17E e 18B); seis pares de sacos testiculares (figura 18A), primeiro par em XII/XIV, último par em XVIII/XIX; ovários simples, formando um grosso anel ao redor do cordão nervoso ventral (figura 17C).

Distribuição geográfica: região central do Brasil, estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Pinto, 1923).

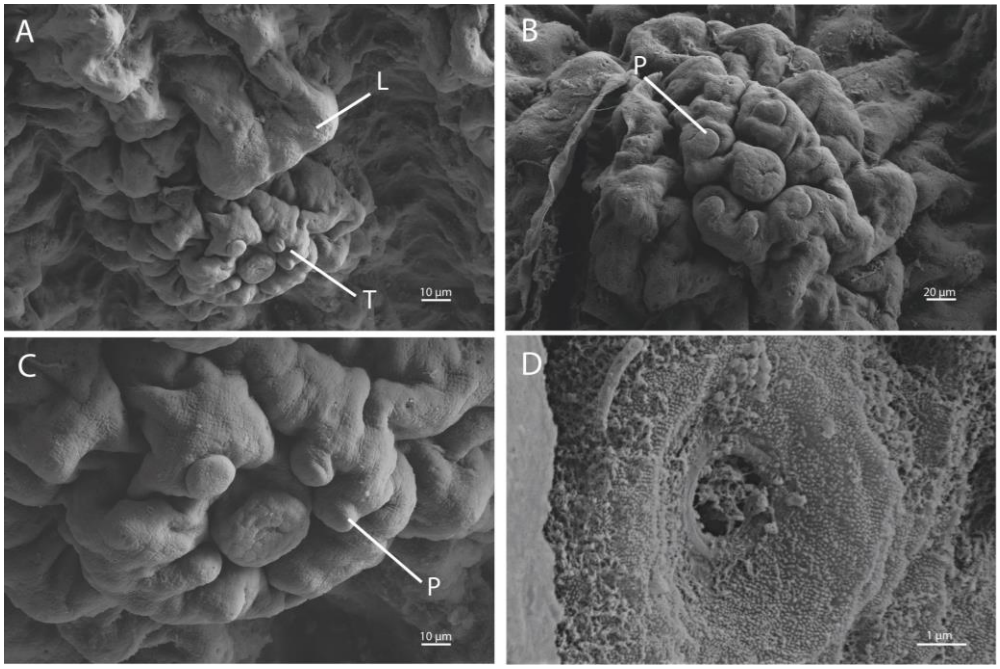
Comentários: *Haementeria lutzi* foi descrita baseada no padrão metamérico formado pelas papilas. De acordo com Pinto (1920a), há três linhas laterais e uma mediana de papilas no dorso. Apesar de não ter sido mencionado por Pinto (1920, 1923), algumas variações foram observadas em relação a estes caracteres. Estas variações tornam difícil a identificação de indivíduos pertencentes a esta espécie, já que os padrões podem se sobrepor em diferentes espécies do gênero, como por exemplo, *H. vizottoi* Castro, 1971, *H. depressa* (Blanchard, 1849) e *H. tuberculifera* (Grube, 1871).

Figura 15. Morfologia externa e interna de *Haementeria lutzi.* A. região da cabeça, evidenciando a posição dos ocelos. B. região genital com os gonóporos evidentes. C. extremidade posterior, com a ventosa discoide. D. vista dorsal da região do meio do corpo mostrando tubérculos e os anéis secundários subdivididos. E. dissecção ventral da região genital, com o sistema reprodutor masculino e feminino expostos. F. extremidade posterior, evidenciando o ânus. A: átrio; An: ânus; DE: ductos ejaculatórios; GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; L: órgãos de Lang; O: ocelos; Ov: ovários; T: tubérculos.



Fonte: próprio autor

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura, *Haementeria lutzi*. A. Tubérculo em a2 e órgão de Lang. B. Tubérculo composto por 4 papilas. C. Tubérculo composto por 6 papilas. D. Poro epidérmico. L: órgão de Lang; P. papila; T: tubérculo.

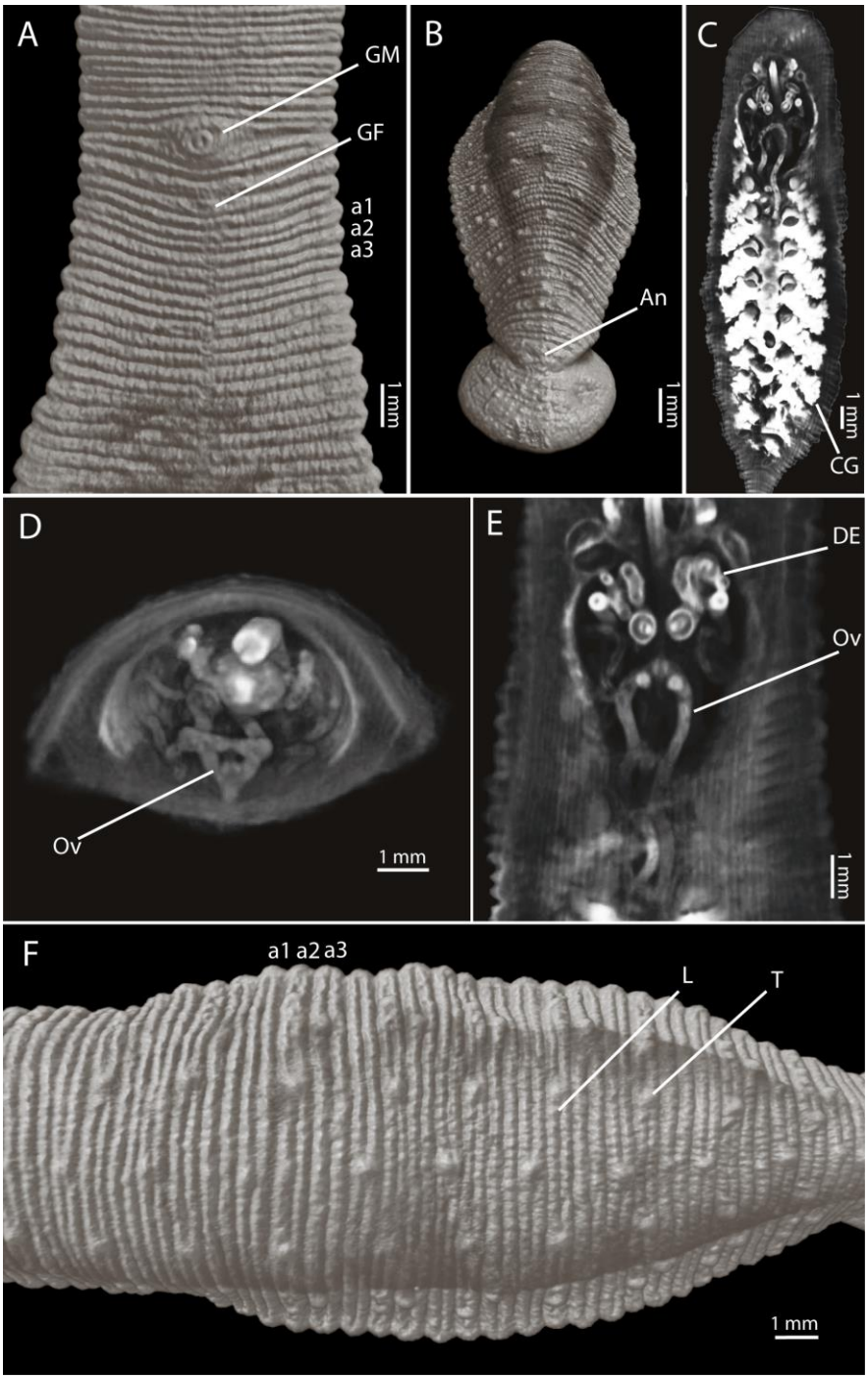


Fonte: próprio autor

Algumas variações na ornamentação da face dorsal de *H. depressa* podem ser facilmente confundidas com *H. lutzi*, especialmente aquelas caracterizadas por Souza (1978) por apresentarem uma fileira mediana de papilas. Internamente, ambas espécies são muito similares, mas em *H. lutzi* os ductos dos órgãos esofágicos são independentes, enquanto em *H. depressa* há a presença de um único ducto comum, que conecta estes órgãos ao esôfago (Souza, 1978).

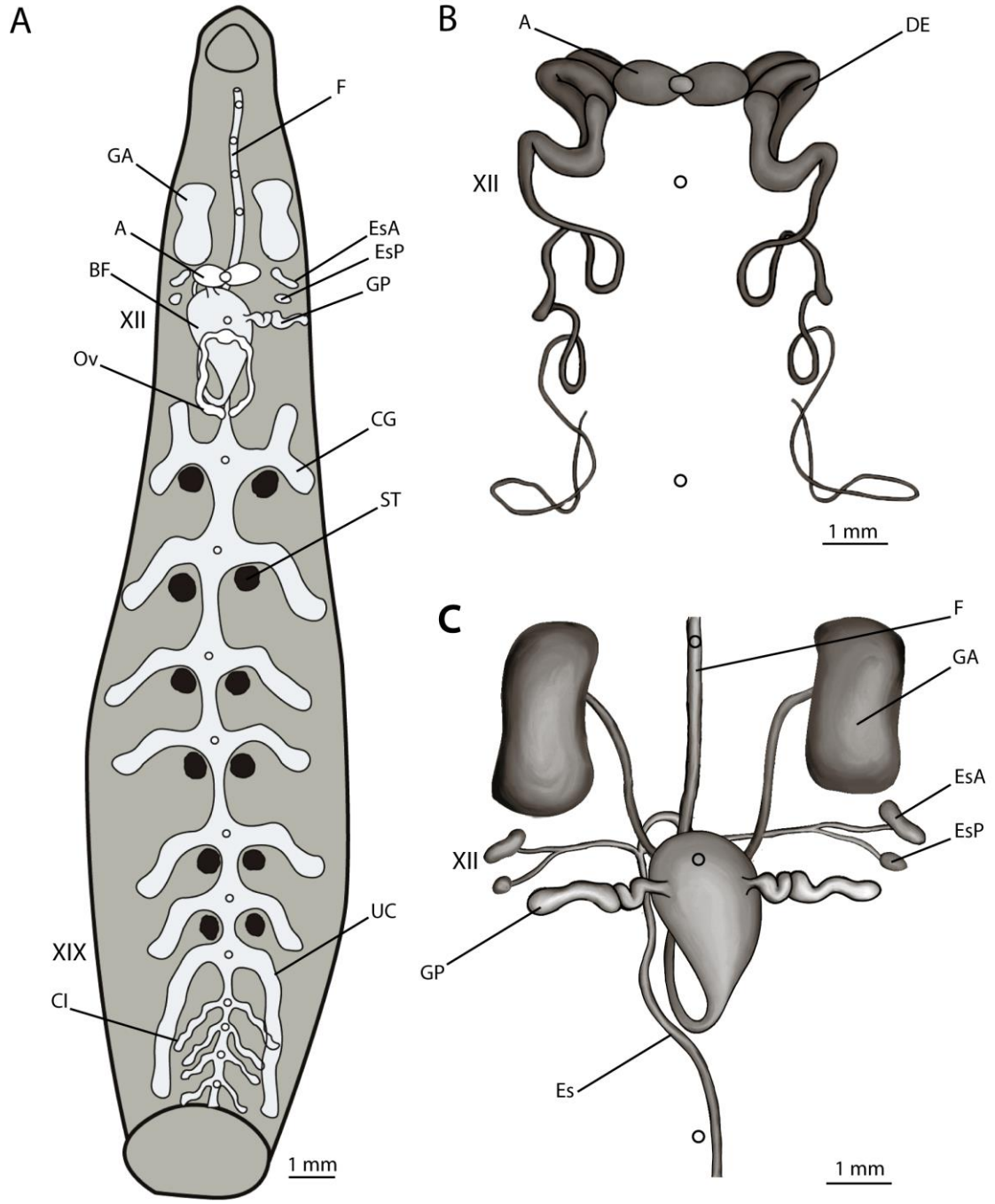
Haementeria tuberculifera pode ser facilmente diferenciada de *H. lutzi* pela presença de uma linha longitudinal de tubérculos em todos os anéis do segmento. Tal padrão não foi encontrado em nenhum dos espécimes estudados, ou na literatura disponível (Ringuelet, 1944, 1985; Souza, 1978). *Haementeria vizottoi* também apresenta sete linhas longitudinais de papilas na região dorsal, mas suas posições são diferentes, como descrito abaixo. Contudo, o sistema reprodutor é similar em ambas as espécies, os ductos ejaculatórios formam uma estrutura espiralada, seguida por uma curva muito dilatada, em relação ao restante da extensão dos ductos, mas, em membros de *H. vizottoi*, estas curvas estão posicionadas verticalmente, enquanto nos de *H. lutzi*, elas são horizontais.

Figura 17. Tomografia computadorizada, *Haementeria lutzi.* A. Face ventral da região genital, anéis primários indicados pelas abreviações a1, a2 e a3. B. vista dorsal da extremidade posterior. C. corte horizontal da região posterior do corpo. D. Corte transversal da região genital. E. corte horizontal da região genital. F. face dorsal, anéis primários indicados pelas abreviações a1, a2 e a3, tubérculos, órgãos de Lang. An: ânus; CG: cecos gástricos; DE: ductos ejaculatórios; GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; L: órgãos de Lang; Ov: ovários; T: tubérculos.



Fonte: próprio autor

Figura 18. Esquema da morfologia interna de *Haementeria lutzi*. A. Sistema digestório e reprodutor, vista ventral, partes de complexo salivar e do sistema reprodutor masculino foram omitidos. B. sistema reprodutivo, vista ventral. C. Sistema digestório e glândulas salivares, segmentos XI-XIII. A: átrio; BF: bulbo faríngeo; CG: ceco gástrico; CI: ceco intestinal; DE: ductos ejaculatórios; Es: esôfago; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; GA: glândulas salivares anteriores; GP: glândulas salivares posteriores; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Haementeria vizottoi Castro, 1971

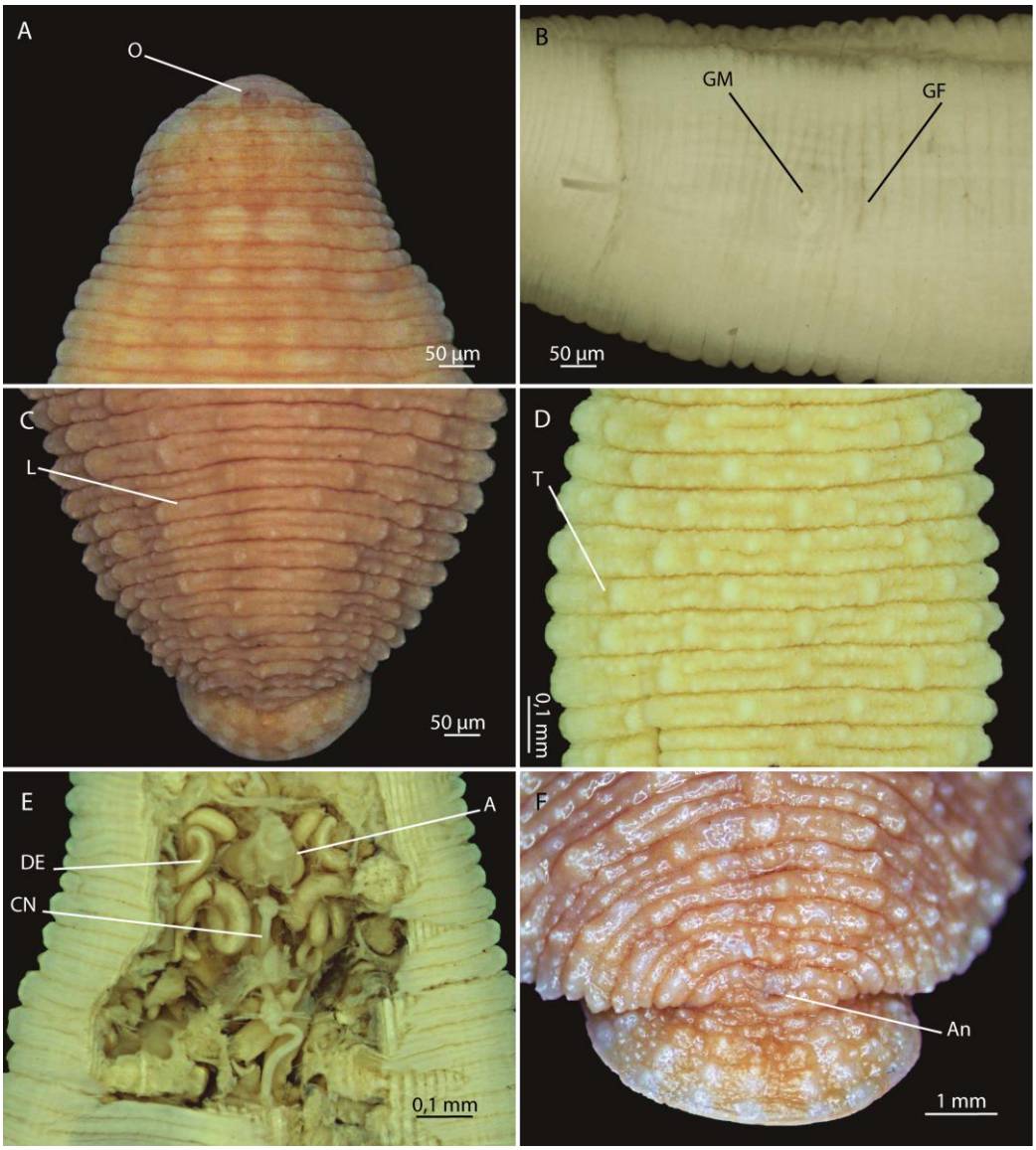
Material examinado: Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, um espécime (MZUSP 0209), Dez 2008; Niterói, um espécime (MZUSP 0230), Ago 1971.

Diagnose: um par de ocelos em virgula, próximos entre si; poro bucal na região anterior da ventosa; 7 linhas longitudinais de tubérculos grandes no dorso, com linha mediana de tubérculos de tamanho mediano; 10-12 linhas longitudinais de tubérculos pequenos no dorso; 4 linhas longitudinais de órgãos de Lang; gonóporos separados por dois anéis primários; segmentos do meio do corpo formados por 3 anéis primários, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso; 2 pares de glândulas salivares, par anterior cilíndrico, par posterior tubular, sem subdivisões; 7 pares de cecos gástricos; curva pré-atrial dos ductos ejaculatórios presente; 6 pares de sacos testiculares.

Formato do corpo: comprimento 34-36 mm; largura máxima 6-12 mm; corpo sublanceolado, dorso-ventralmente achatado; ventosa posterior bem desenvolvida; triangular; margem dos anéis primários evidentes; região anterior afilada; cabeça distinta do resto do corpo, triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, largura máxima 5 mm.

Morfologia externa: corpo uniformemente amarelo quando fixado, sem detalhes de pigmentação; 6 fileiras de tubérculos grandes no dorso (figuras 19D e 20C), 2 paramedianas e 2 paramarginais nos anéis a2, e 2 paramarginais nos anéis a3, que podem estar localizadas na margem do anel; fileira longitudinal mediano-dorsal de tubérculos em b1 e b4, por vezes incompleta; 10-12 fileiras longitudinais dorsais de tubérculos pequenos, em todos os anéis; 4 linhas longitudinais de órgãos de Lang (figura 20C); 1 par de ocelos em III (figura 19A), em vírgula, próximos entre si; poro bucal na região anterior da ventosa anterior; gonóporos separados por dois anéis primários (figura 19B), masculino em XI b6/XII b1, feminino em XII a2/b5; ânus em XVII, seguido de um anel; segmento I composto por 1 anel, segmento II com 2 anéis; segmentos III-XXVI com 3 anéis primários cada, ([(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso; segmento XXVII composto por 2 anéis.

Figura 19. Morfologia externa de *Haementeria vizottoi*. A. região da cabeça evidenciando a posição dos ocelos. B. região genital com os gonóporos evidentes. C. vista dorsal da região posterior. D. vista dorsal da região mediana do corpo. E. vista ventral da região genital dissecada, evidenciando o sistema reprodutor masculino. F. vista dorsal da região posterior, evidenciando a localização do ânus. A: átrio; An: ânus; CN: cordão nervoso ventral; DE: ductos ejaculatórios; GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; L: órgãos de Lang; O. ocelos; T. tubérculos.



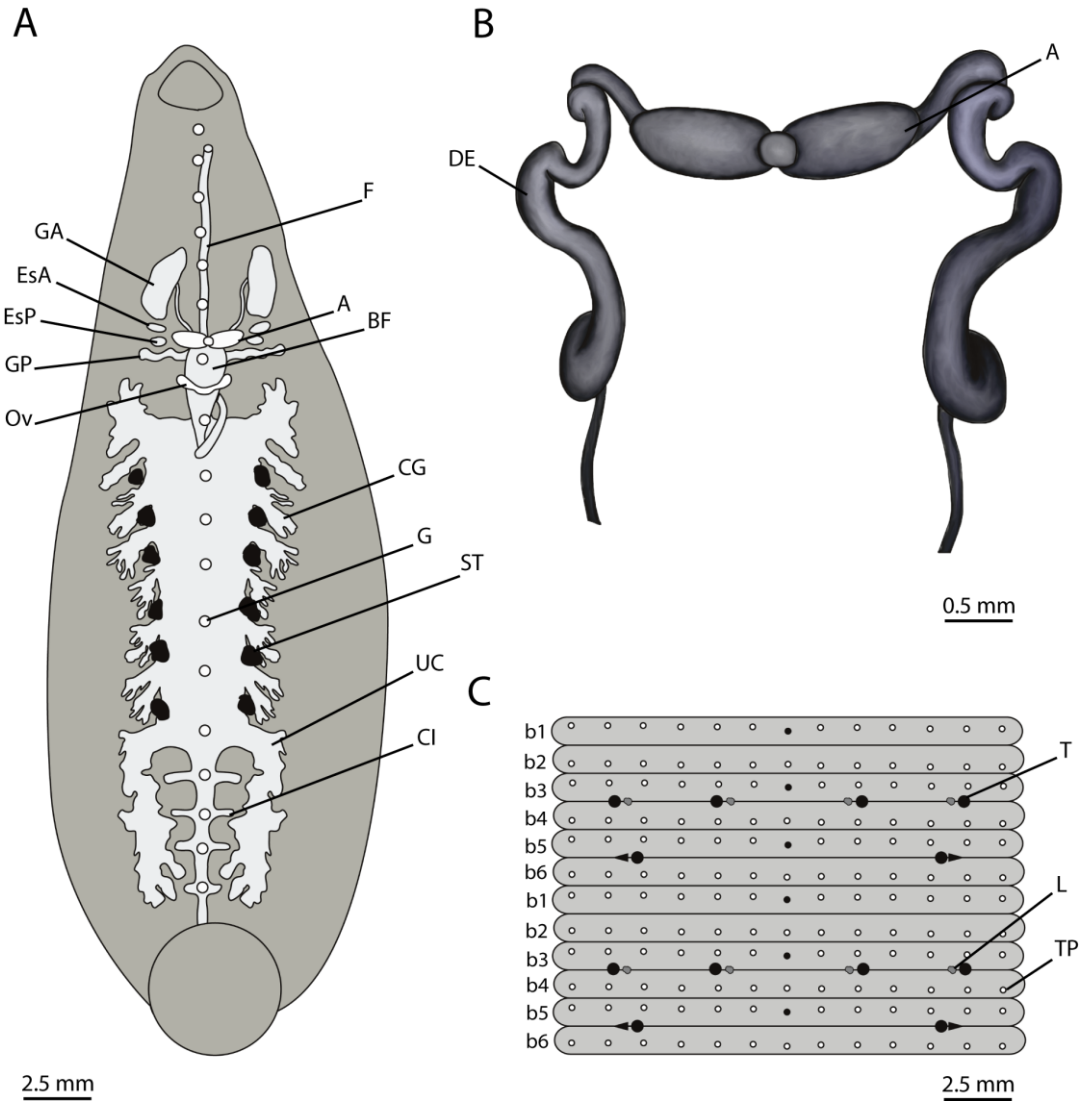
Fonte: próprio autor

Morfologia interna: faringe formando uma curva em XII/XIII; base da faringe formando bulbo em XII; 2 pares de glândulas salivares (figura 20A); par anterior cilíndrico, em XI, conectados por um par de ductos salivares comuns; par posterior em XII, tubular, sem dobras, conectado à porção lateral do bulbo, na base da faringe, sem subdivisões; 2 pares de órgãos esofágicos em XI/XII; 7 pares de cecos gástricos arborescentes, primeiro par ramificado, em XIII, último par em XIX, com trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais não ramificados; sistema reprodutor masculino formado por átrio localizado anteriormente ao gânglio XII (figuras 19E e 20B), posicionado verticalmente; ductos ejaculatórios formados por porção ascendente dilatada em XII/XIII; extremidade anterior dos ductos ejaculatórios formando estrutura em espiral; 6 pares de sacos testiculares, primeiro par em XIII/XIV, último par em XVIII/XIX; ovários simples, formando um grosso anel em volta do cordão nervoso ventral.

Distribuição geográfica: sudeste do Brasil, estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Ringuelet, 1985).

Comentários: *Haementeria vizottoi* é muito similar a *H. lutzi* e a diferenciação entre membros destas espécies é ainda mais dificultada pela omissão de importantes caracteres anatômicos, nas descrições originais de ambas. De acordo com Castro (1971), cinco linhas longitudinais principais de tubérculos são encontradas na superfície dorsal do corpo de *H. vizottoi*. Portanto, a morfologia dos espécimes estudados é compatível com a descrição original. No entanto, a variação estudada pode levar a erros de identificação com *H. lutzi.* Neste caso, há um par extra de tubérculos em cada anel a2 que coincide com a fileira paramarginal. Porém, a fileira mediana, a mais proeminente, é sempre composta por tubérculos em a1, a2 e ausente em a3, um caractere que diferencia estes animais de membros de *H. lutzi* (Castro, 1971). Souza (1978) reconheceu um par extra de tubérculos nos anéis a2, porém a posição descrita é ligeiramente diferente da observada neste estudo (ver figura 12C). Poucas diferenças podem ser encontradas no sistema reprodutor das duas espécies, uma exceção é a posição da região expandida, que antecede a espiral dos ductos ejaculatórios, que é vertical em membros de *H. vizottoi* e horizontal nos de *H. lutzi*.

Figura 20. *Haementeria vizottoi.* A. morfologia interna, vista ventral, partes do sistema reprodutor masculino e feminino foram omitidos . B. sistema reprodutor masculino, vista ventral. C. esquema da face dorsal dos segmentos da região mediana do corpo, setas indicam a variação na posição dos tubérculos nos anéis primários a3. A: átrio; BF: bulbo faríngeo; CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios: EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G: glânglios; GA: glândulas salivares anteriores; GP: glândulas salivares posteriores; L: órgãos de Lang; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; T: tubérculos; TP: tubérculos pequenos.



Fonte: próprio autor

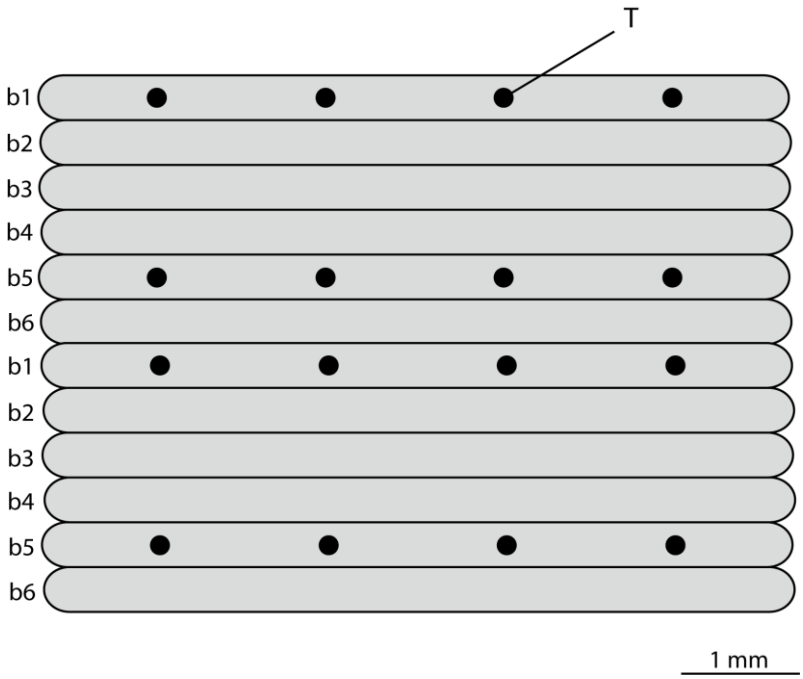
Os espécimes identificados como *H. vizottoi* se assemelham a membros de *H. depressa* (Blanchard, 1849), na posição da fileira mediano-dorsal de tubérculos, na qual os tubérculos estão apenas em a1. Por outro lado, o sistema reprodutor apresenta diferenças importantes, como, por exemplo, a ausência de uma estrutura em espiral, compondo os ductos ejaculatórios, em exemplares de *H. depressa* (Souza, 1978). Membros de *H. tuberculifera* (Grube, 1871) podem ser facilmente diferenciados dos de *H. vizottoi* por apresentarem sete pares de sacos testiculares, ao invés de seis, como exemplares da maioria das espécies deste gênero, inclusive *H. vizottoi*.

***Haementeria* sp. 1**

Material examinado: Mato Grosso do Sul: Miranda, 06 espécimes, 14/Mai/2015; Miranda, 1 espécime, Out/2015.

Diagnose: um par de ocelos circulares, próximos entre si; 4 pares de fileiras longitudinais de tubérculos não pigmentados no dorso; gonóporos separados por 1 anel primário; segmentos da região mediana do corpo compostos por 3 anéis primários cada, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso; 2 par de glândulas salivares tubulares, indivisas; 7 pares de cecos gástricos não ramificados, último par formando trajeto descendente; ductos ejaculatórios formando curva pré-atrial; 6 pares de sacos testiculares.

Figura 21. Segmentos da região mediana do corpo de *Haementeria* sp. 1, vista dorsal. T: tubérculos.



Fonte: próprio autor

Formato do corpo: comprimento máximo 4-13 mm: largura máxima 5-6 mm; corpo lanceolado, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis evidentes; região anterior afilada; cabeça conspícua, triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, largura máxima 4 mm.

Morfologia externa: corpo amarronzado; 4 pares de linhas longitudinais de machas escuras, 1 paramediana, 1 paramarginal, 1 marginal e 1 mediana, interrompida pelos ocelos; margem de cada a2 pigmentada; áreas despigmentadas ausentes; quatro linhas longitudinais de tubérculos despigmentados em cada b1 e b5 (figura 21), 2 paramedianas, 2 paramarginais; órgãos de Lang ausentes; 1 par de ocelos em III (figura 22C), circulares, próximos entre si; glândula nucal ausente; escudo nucal ausente; poro bucal na região anterior do corpo; gonóporos separados por 1 anel primário (figura 22E), masculino em XII b2/a2, feminino em XII a2/b5; ânus em XVI/XVII, seguido por 2 anéis primários; segmentos I-II unianulados; segmentos III-IV bianulados; segmentos V-XXV com 3 anéis primários cada, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso; segmentos XXVI-XXVII bianulados.

Morfologia interna: base da faringe em XII/XIII, reta; bulbo faríngeo ausente; 2 pares de glândulas salivares em XII (figura 23C), tubulares, sem subdivisões, conectadas

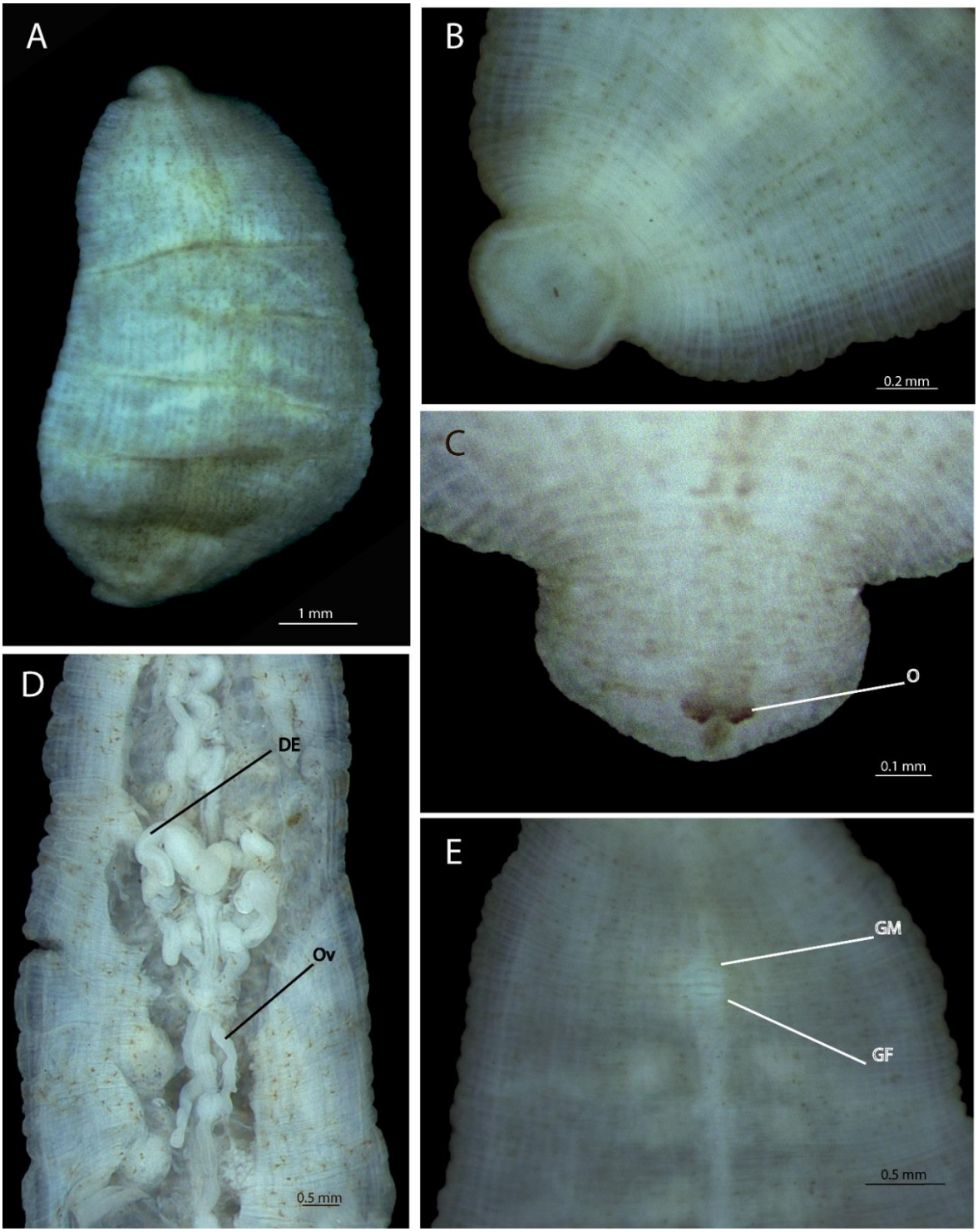
diretamente à base da faringe; 2 pares de órgãos esofágicos esféricos, em XIII (figura 23C), conectados ao esôfago por ductos independentes; 7 pares de cecos gástricos (figura 23A), primeiro par ramificado, pares 2-7 sem ramificações, último par com trajeto descendente; sistema reprodutor masculino formado por átrio anterior ao gânglio XII (figura 23B), posicionado verticalmente; ductos ejaculatórios com porção ascendente dilatada em XIII, curva em XII/XIII; volta pré-atrial ausente; porção anterior dos ductos ejaculatórios formando uma estrutura em S (figuras 22D e 23B); 6 pares de sacos testiculares (figura 23A), primeiro par em XIII/XIV, último par em XVIII/XIX; ovários curtos (figura 22D), simples, formando um anel ao redor do cordão nervoso ventral.

Comentários: Como mostra a figura 17, espécimes pertencentes a *H.* sp. 1 assemelham-se externamente a membros de espécies pertencentes ao gênero *Trachybdella*, especialmente quanto ao formato do corpo e posição dos gonóporos. Porém, a subdivisão dos anéis primários e os ovários formando um anel ao redor do cordão nervoso ventral deixam claro o posicionamento desta espécie em *Haementeria*, de acordo com a definição de Oceguera-Figueroa (2012).

Dentre as espécies conhecidas de *Haementeria*, aquela cujos membros mais se assemelham aos de *H.* sp. 1 é *H. molesta*, pobremente descrita por Cordero (1934) e redescrita por Ringuelet (1985). Assim como *H.* sp. 1, exemplares de *H. molesta* possuem quatro fileiras de tubérculos marginais e paramarginais dorsais, porém todos os tubérculos estão dispostos em a2 e há uma fileira mediano-dorsal de tubérculos. A posição dos gonóporos também é bastante semelhante entre membros de ambas espécies, os masculinos e os femininos separados por apenas 1 anel primário. Tendo em vista a variação encontrada em outras espécies pertencentes a este gênero, não é possível afirmar a separação entre *H.* sp. 1 e *H. molesta*, sem a observação de exemplares tipo desta última espécie, incluindo o estudo detalhado da morfologia interna.

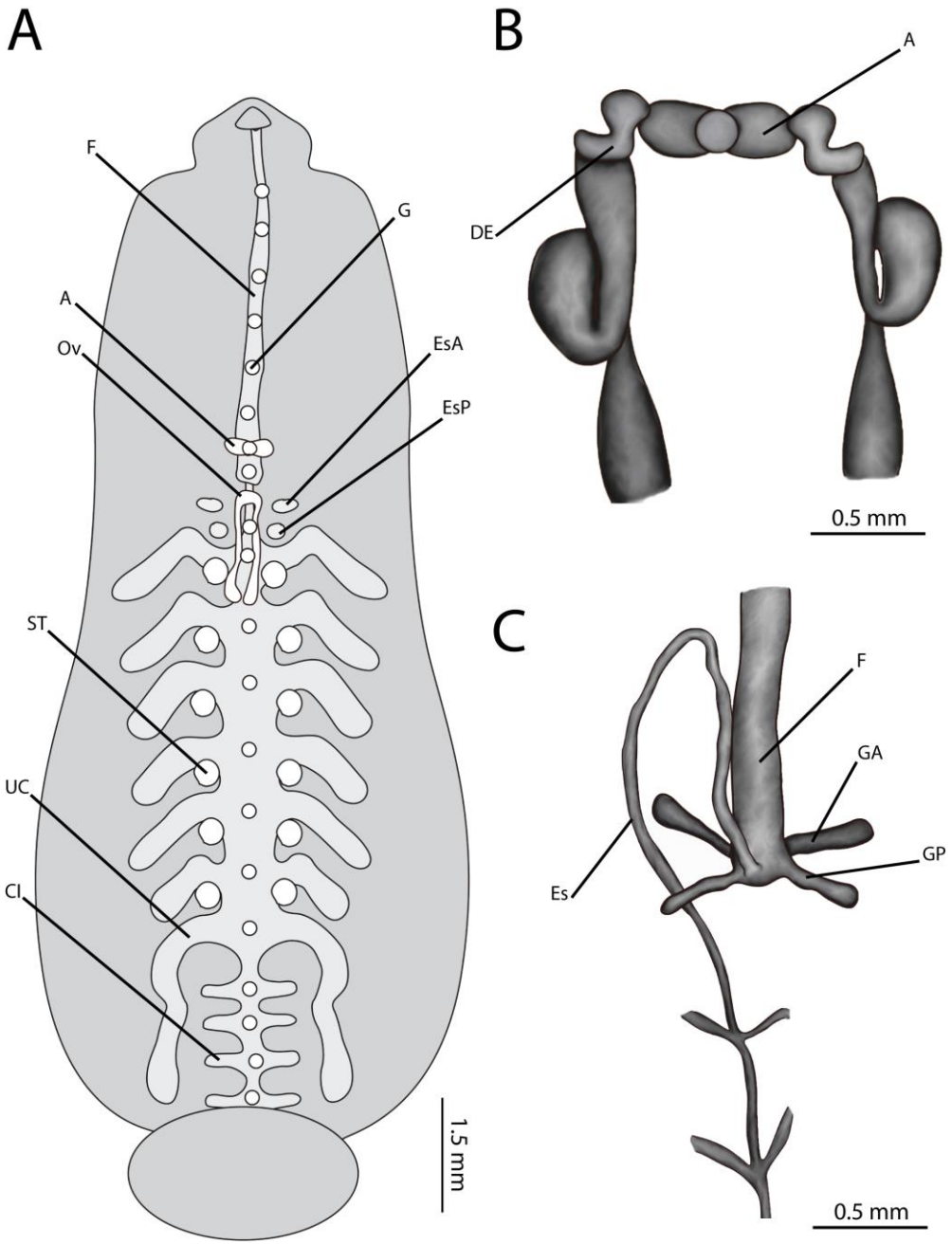
Membros de *H. eichhorniae* (Ringuelet, 1978) também são externamente semelhantes a indivíduos de *H.* sp. 1, porém internamente a morfologia das glândulas salivares é um caractere importante na diferenciação destas sanguessugas, já que as *H.* sp. 1 não apresentam ductos salivares distintos da massa compacta de glândulas associada à base da faringe. Este é um caractere que diferencia estes animais, não só de membros de *H. eichhorniae*, mas de grande parte das espécies do gênero.

Figura 22. *Haementeria* sp. 1. A. Vista dorsal. B. Região anterior, vista ventral. C. Região da cabeça, vista dorsal. D. Morfologia interna, dissecção ventral. E. Região genital, vista ventral. DE: ductos ejaculatórios; GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; O: ocelos; Ov: ovários.



Fonte: próprio autor

Figura 23. Esquema da morfologia interna de interna de *Haementeria* sp. 1. A. Morfologia interna geral, vista ventral, complexo salivar e parte do sistema reprodutor masculino omitidos. B. Detalhe do sistema reprodutor masculino, vista ventral. C. Detalhe do complexo salivar, vista ventral. A: átrio; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; Es: esôfago; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G: gânglios; GA: glândulas salivares anteriores; GP: glândulas salivares posteriores. Ov: ovários; ST: sacos testiculares; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

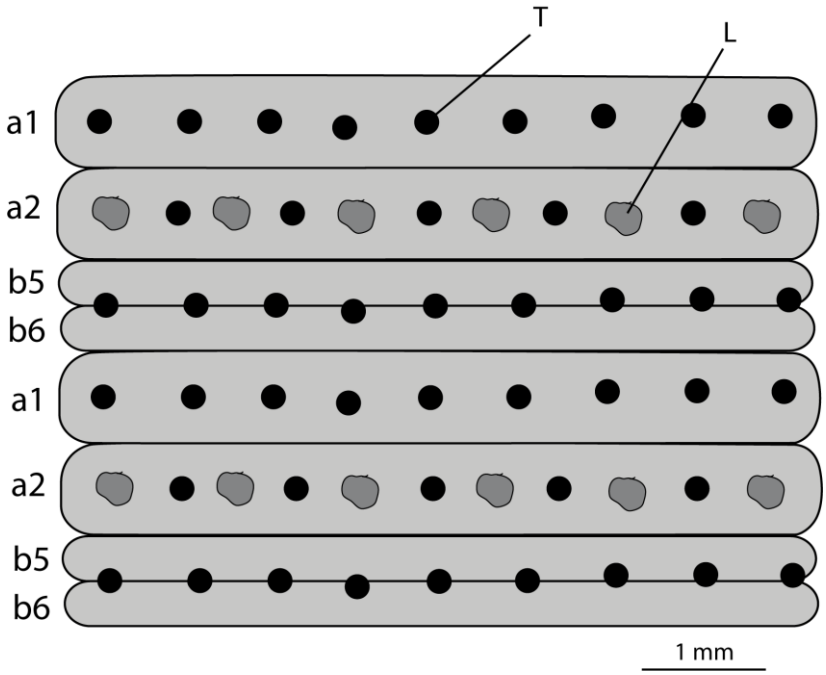
Haementeria sp. 2

Material examinado: Mato Grosso do Sul: Miranda, 01 espécime, Out/2011.

Diagnose: um par de ocelos em III, em vírgula, próximos entre si; 8-9 tubérculos em cada anel primário; 6 linhas longitudinais de órgãos de Lang na superfície dorsal dos a2; gonóporos separados por um anel primário; segmentos da região mediana do corpo compostos por três anéis primários, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(a1)+(a2)+(b5+b6)] no dorso; 2 pares de glândulas salivares, par anterior esférico, par posterior alongado, subdividido em duas subunidades; 7 pares de cecos gástricos, primeiro par bifurcado, último par não formando trajeto descendente; curva pré-atrial dos ductos ejaculatórios ausente; 6 pares de testículos.

Formato do corpo: comprimento máximo 18 mm; largura máxima 7 mm; corpo lanceolado, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis evidentes; cabeça afilada, conspícua, triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, largura máxima 3 mm.

Figura 24. Segmentos da região mediana do corpo de *Haementeria* sp. 3, vista dorsal. L: órgãos de Lang; T: tubérculos.

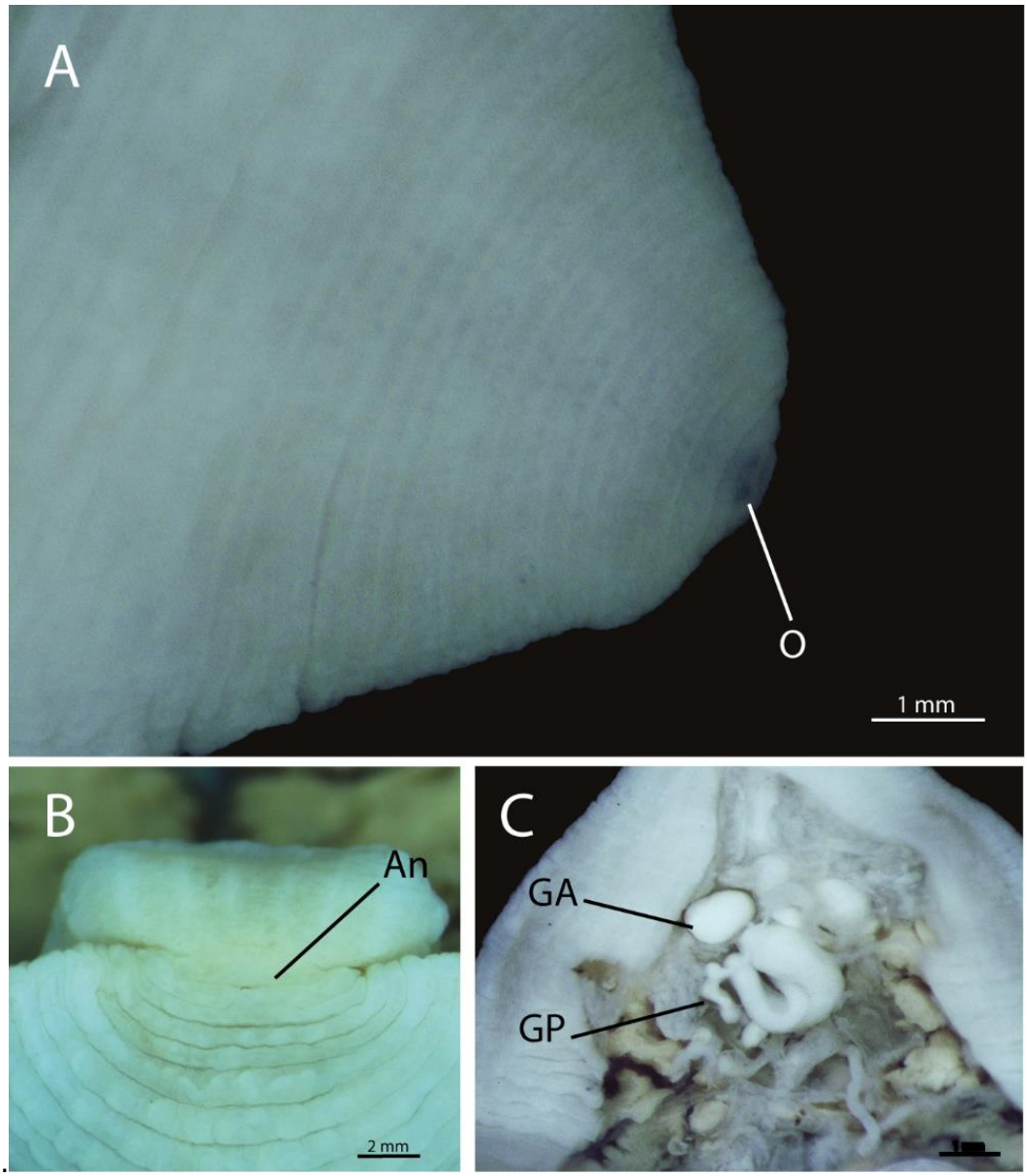


Fonte: próprio autor

Morfologia externa: corpo esverdeado, sem detalhes de pigmentação no dorso ou no ventre; 5-9 tubérculos em cada anel primário (figura 24), sem padrão metamérico; 6 linhas longitudinais de órgãos de Lang, em cada a2 (figura 24); um par de ocelos em III (figura 25A), em vírgula; órgão nucal ausente; escudo nucal ausente; poro bucal na porção anterior da ventosa anterior; gonóporos separados por um anel primário, masculino em XII b2/a2, feminino em XII a2/b5; segmentos I-V compostos por um total de 8 anéis; segmento VI com 3 anéis primários, [(a2)+(a1)+(b5+b6)], anel primário a3 com uma subdivisão pouco marcada no dorso e no ventre; segmentos VII-XXIII com 3 anéis primários, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(a1)+(a2)+(b5+b6)] no dorso; segmentos XIV-XVII compostos por 3 anéis primários, [(a1)+(a2)+(a3)] no dorso e no ventre.

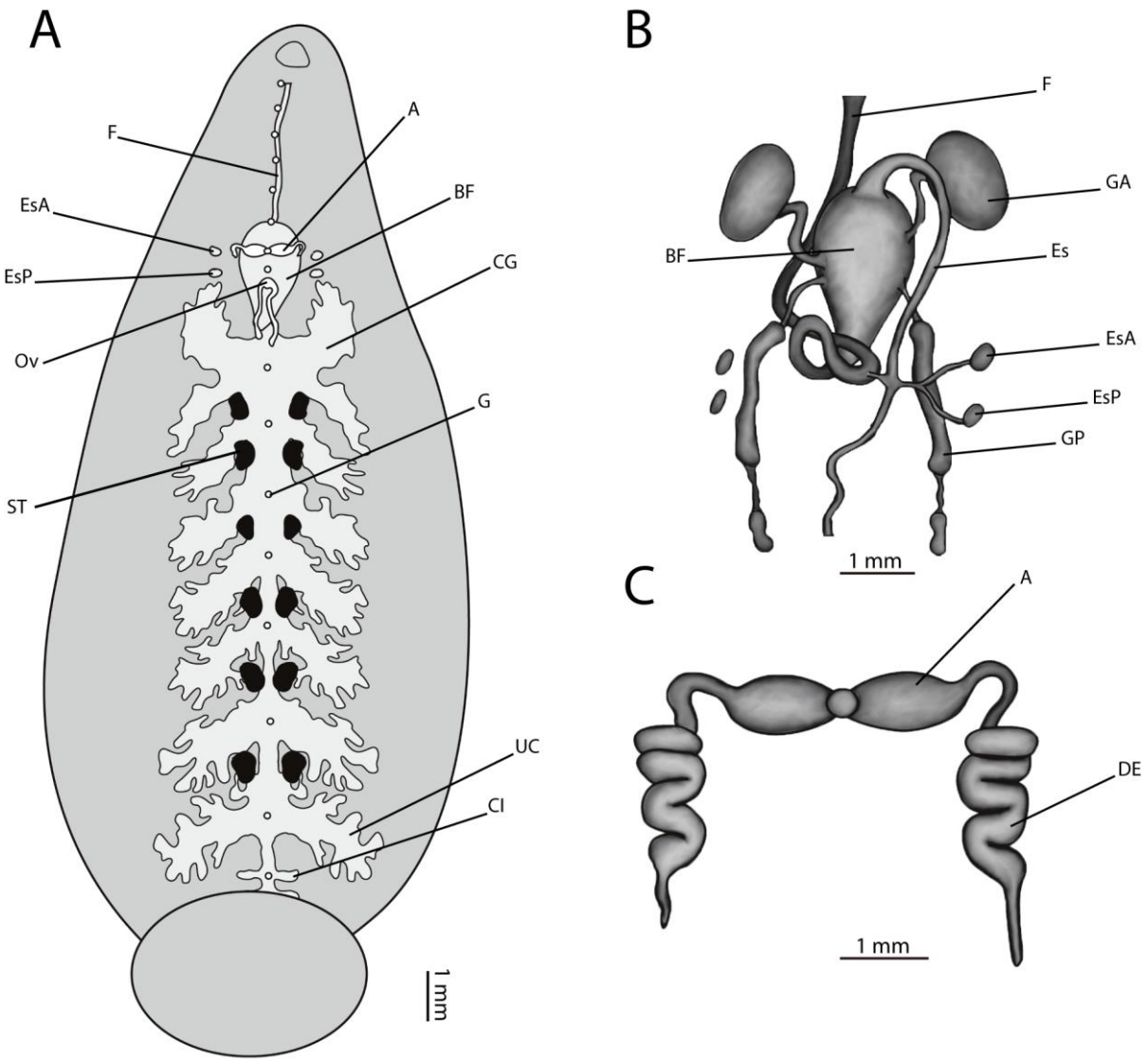
Morfologia interna: faringe formando uma curva em XII; bulbo faríngeo em XII; dois pares de glândulas salivares compactas em XI/XII (figuras 25C e 26B); par anterior esférico, conectado ao bulbo faríngeo por um par de ductos independentes; par posterior alongado, conectado por ductos ao bulbo faríngeo, subdivido em duas subunidades; 2 pares de órgãos esofágicos em XII, conectados ao esôfago por 1 par de ductos comuns; 7 pares de cecos gástricos arborescentes (figura 26A), primeiro par bifurcado, último par sem trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais; sistema reprodutor masculino formado por átrio, localizado anteriormente ao gânglio XII; curva pré-atrial ausente (figura 26C); porção ascendente dos ductos ejaculatórios formando um complexo sistema de curvas (figura 26C); 6 pares de sacos testiculares (figura 26A), primeiro par em XIII/XIV, último par em XVIII/XIX; ovários simples, formando um grosso anel ao redor do cordão nervoso ventral.

Figura 25. *Haementeria* sp. 2. A. Região da cabeça, vista dorsal. B. ventosa posterior, vista dorsal. C. Dissecção da região das glândulas salivares, vista ventral. An: Ânus; GA: Glândulas salivares anteriores; GP: Glândulas salivares posteriores; O: ocelos.



Fonte: próprio autor

Figura 26. Esquema da morfologia interna de *Haementeria* sp. 2. A. Morfologia interna geral, vista ventral, complexo salivar e parte do sistema reprodutor masculino omitidos. B. Complexo salivar, vista ventral. C. Sistema reprodutor masculino, vista ventral. A: átrio; BF: bulbo faríngeo; CG: ceco gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; Es: esôfago; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G. gânglios; GA: glândulas salivares anteriores; GP: glândulas salivares posteriores; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Comentários: o número e disposição dos tubérculos dorsais de *H.* sp. 2, assim como a ausência de subdivisões dorsais dos anéis primários a1 e a2, fazem com que membros desta espécie sejam muito similares aos de espécies de *Trachybdella*. Porém, a presença de glândulas salivares compactas os diferencia de todos os animais daquele gênero. Dentre membros de *Haementeria*, este padrão de disposição dos tubérculos não é encontrado em nenhuma outra espécie, porém a subdivisão das glândulas salivares é compartilhada por indivíduos identificados neste estudo como *H.* cf. *brasiliensis*, embora em indivíduos desta última espécie as glândulas subdivididas sejam as do par anterior, enquanto nos de *H.* sp. 2, o par posterior é que se encontra subdividido.

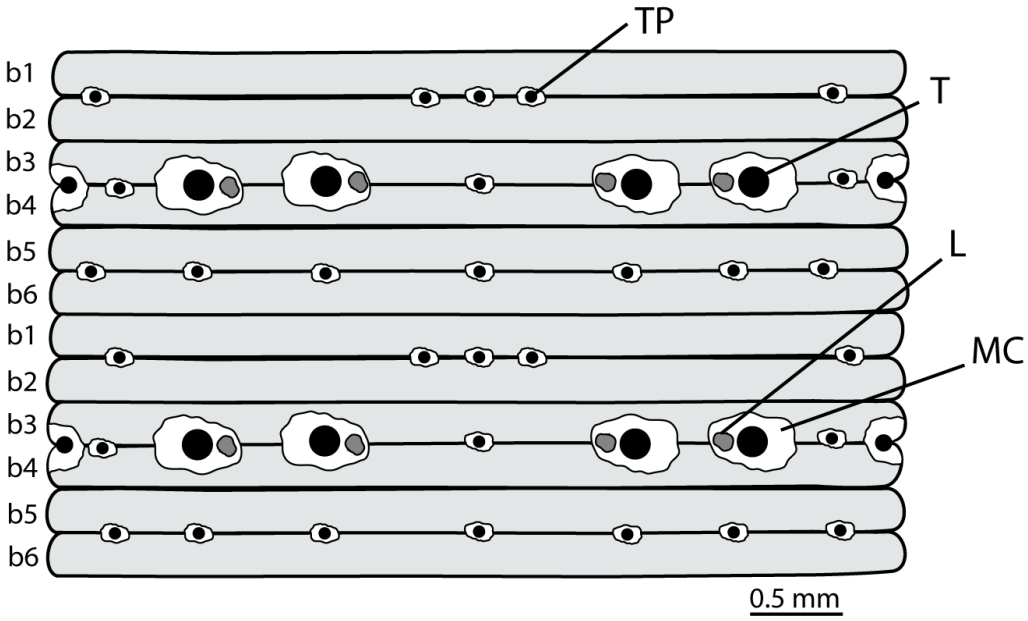
Haementeria sp. 3

Material examinado: São Paulo, Iporanga, PETAR – Núcleo Santana (S 24 32' 44.9'' W 48 40' 53.8'), 4 espécimes, 17/Dez/2015.

Diagnose: um par de ocelos em vírgula, separados entre si; poro bucal na região anterior da ventosa; nove linhas longitudinais de pequenas manchas despigmentadas no dorso; seis linhas longitudinais de áreas despigmentadas em cada a2; 10 linhas longitudinais de tubérculos ciliados (figura 27 e 29); 1 linha longitudinal mediano-dorsal de tubérculos achatados (figura 27); gonóporos separados por 2 anéis primários; segmentos da região mediana do corpo trianulados, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso; dois pares de glândulas salivares, tubulares, indivisas; 7 pares de cecos gástricos arborescentes; ductos ejaculatórios simples, sem curvas no trajeto ascendente.

Formato do corpo: comprimento máximo 11-29 mm; largura máxima 3-5 mm; corpo sublanceolado, às vezes subcilíndrico, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis evidentes; região anterior afilada; cabeça distinta, triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, largura máxima 2 mm.

Figura 27. Segmentos da região mediana do corpo de *Haementeria* sp. 3. L: órgãos de Lang; MC: manchas circulares; T: tubérculos; TP: tubérculos pequenos.

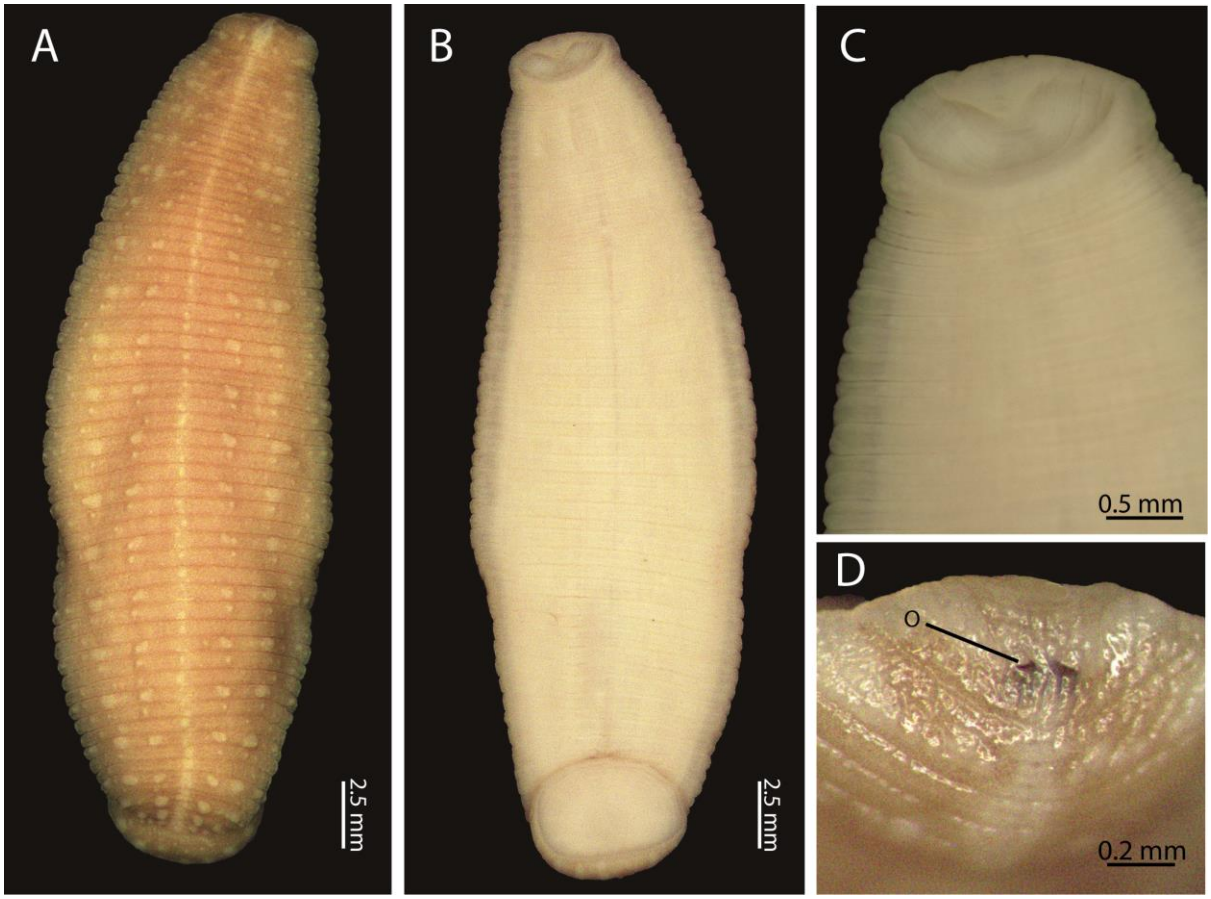


Fonte: próprio autor

Morfologia externa: corpo azulado quando vivo; cílios distribuídos irregularmente pela superfície do corpo, linha longitudinal mediano-dorsal de pequenas manchas circulares despigmentadas em cada anel primário; 1 par de linhas longitudinais paramedianas de pequenas manchas circulares despigmentadas em cada anel primário; 1 par de linhas longitudinais de pequenas áreas despigmentadas em cada anel a1; 2 pares de linhas longitudinais em cada anel a3, 1 par paramediano e outro paramarginal; 3 pares de linhas longitudinais de grandes manchas circulares despigmentadas em a2, 1 par paramediano, 1 par paramarginal e outro marginal; tubérculos dorsais dispostos sobre as machas circulares despigmentadas; 1 linha longitudinal mediana de tubérculos ciliados achatados em cada anel primário; 1 par de tubérculos ciliados longitudinais paramarginais em cada anel primário; 1 par de linhas longitudinais paramedianas de tubérculos ciliados em cada a1; 2 pares de linhas longitudinais de tubérculos ciliados em cada a3, 1 par paramediano e outro paramarginal; 3 pares de linhas longitudinais de tubérculos ciliados em cada a2, 1 par paramediano, 1 par paramarginal e outro marginal; 4 pares de órgãos de Lang, 2 par paramediano e 2 paramarginais; 1 par de ocelos em IV, em vírgula, separados um do outro; órgão nucal ausente, escudo nucal ausente, poro bucal localizado na margem anterior da ventosa; gonóporos separados por 2 anéis primários, masculino em XI

b6/XII b1, feminino em XII a2/b5; ânus em XVII, seguido de 1 anel pós anal; segmentos I-II unianulados, segmentos III-IV bianulados, segmentos V-XXIV trianulados, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso, segmentos XXV-XXVI bianulados.

Figura 15. *Haementeria* sp. 3. A. Vista dorsal. B. Vista ventral. C. Ventosa anterior, vista ventral. D. Região genital, vista ventral. O: ocelos.

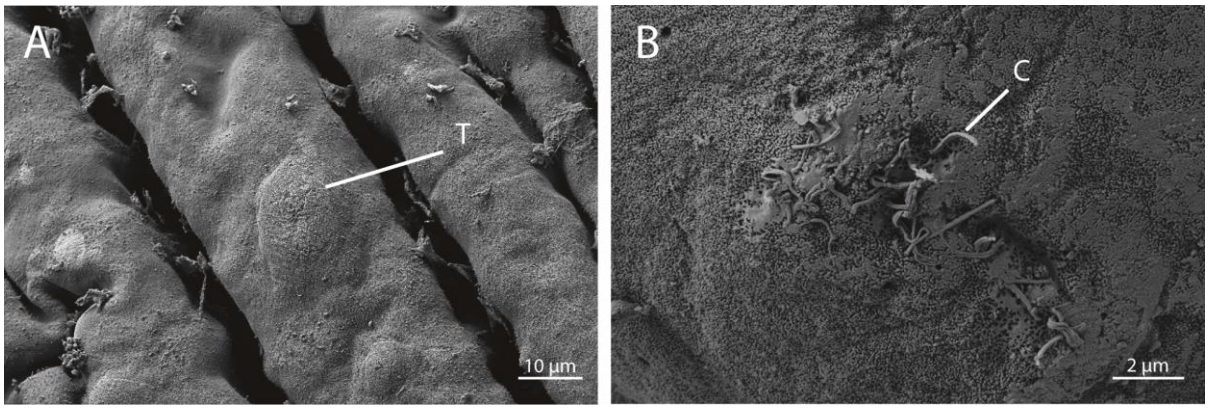


Fonte: próprio autor

Morfologia interna: base da faringe em XII; bulbo faríngeo em XII; 2 pares de glândulas salivares compactas em XII, tubulares (figuras 30B e 31D), indivisas, par anterior longo, par posterior curto; 2 pares de órgãos esofágicos em XII (figuras 30B e 31C), conectados ao esôfago por ductos independentes, par anterior cilíndrico, par posterior esférico; 7 pares de cecos gástricos arborescentes (figura 31A), primeiro par bifurcado em XIII, último par formando trajeto descendente; 4 pares de cecos gástricos; sistema reprodutor masculino formado por átrio anterior ao gânglio XII, base afilada, pouco desenvolvido (figuras 30C e 31A); curva pré-atrial dos ductos

ejaculatórios ausente; ductos ejaculatórios simples (figura 30C), sem curvas no trajeto ascendente; 6 pares de sacos testiculares (figura 30A); ovários simples, formando anel ao redor do cordão nervoso ventral (figura 31B).

Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura de *Haementeria* sp. 3. A. tubérculos da superfície dorsal. B. Detalhe do tubérculo dorsal, mostrando a disposição em linha dos tufos de cílios. C: cílios. T: tubérculos.

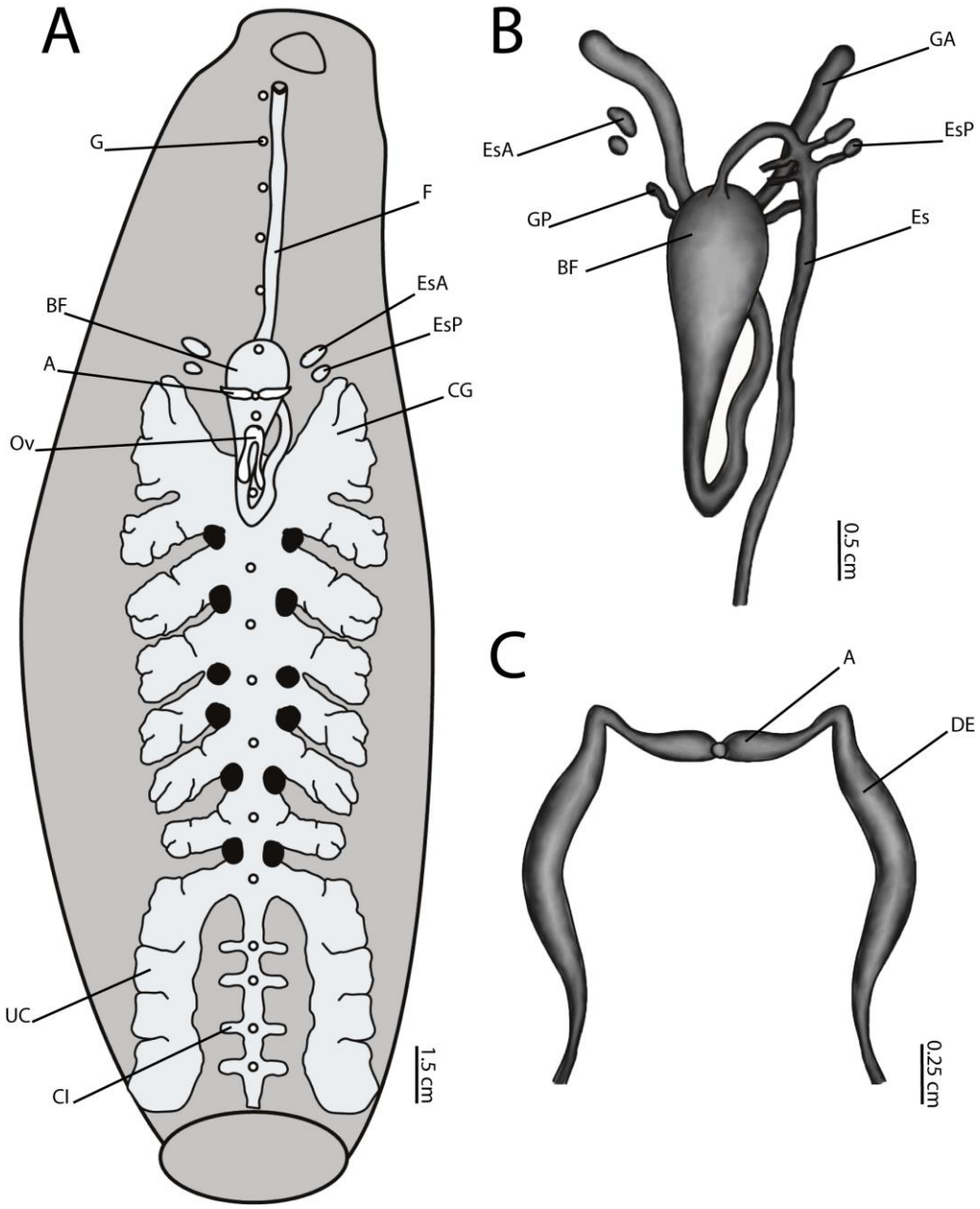


Fonte: próprio autor

Comentários: membros de duas espécies se assemelham externamente aos de *H.* sp. 3, pelo complexo padrão de disposição dos tubérculos dorsais. Exemplares de *H. eichhorniae* Ringuelet, 1978 e de *H. helleri* (Weber, 1915) possuem uma fileira longitudinal ininterrupta de tubérculos na linha mediano-dorsal do corpo e tubérculos laterais nos anéis primários a1 e a2, em disposição alternada. Contudo, membros de *H. helleri* possuem dois pares de tubérculos em a1, enquanto os de *H.* sp. 3 possuem apenas um par; além disto, os tubérculos em membros de *H. helleri* são todos aproximadamente do mesmo tamanho.

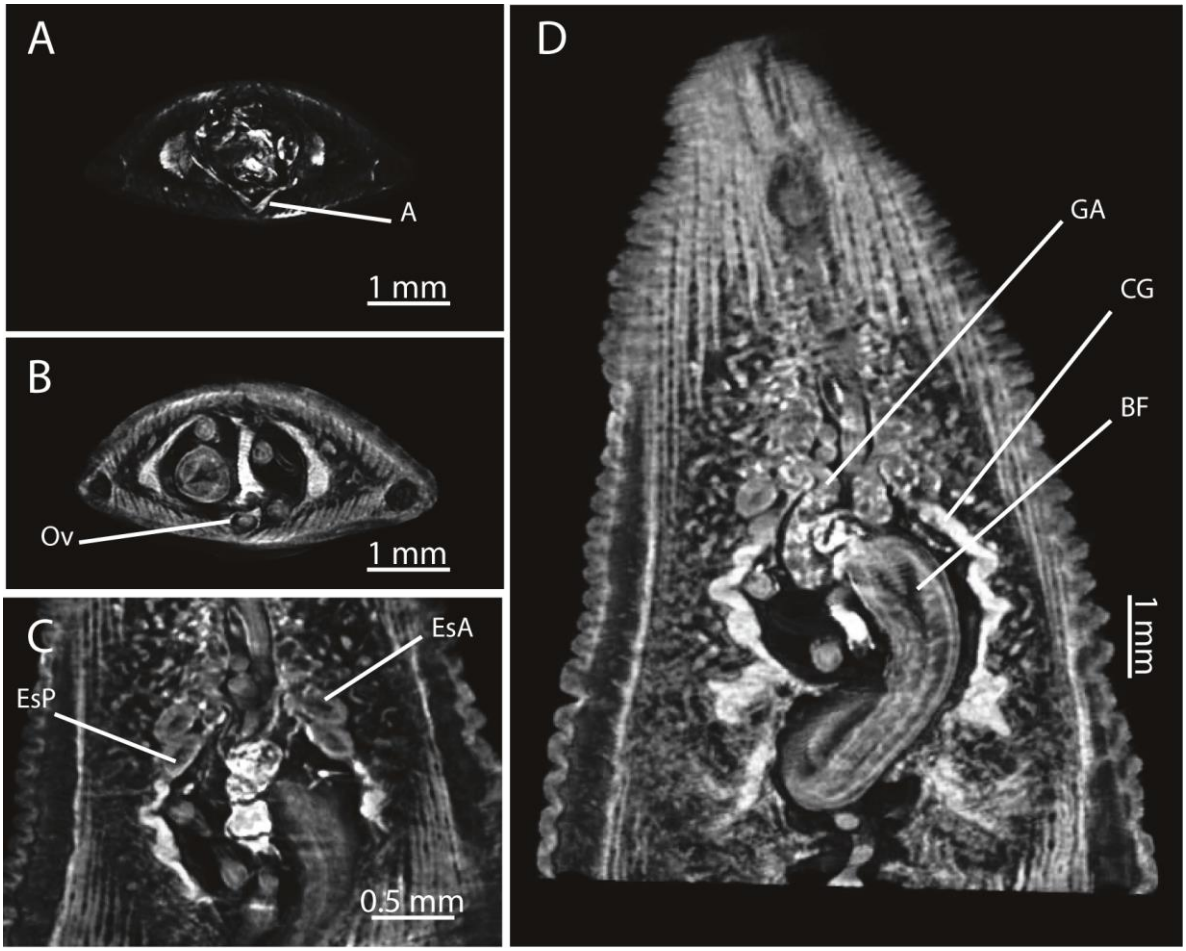
Indivíduos pertencentes a *H. eichhorniae* apresentam um padrão de disposição de tubérculos muito similar ao de membros de *H.* sp. 3, porém diferem quanto à morfologia interna. As glândulas salivares posteriores de sanguessugas desta espécie são globosas (Ringuelet, 1978, 1985), diferentes das glândulas alongadas de exemplares de *H.* sp. 3. Também há diferenças marcantes em relação aos ductos ejaculatórios, que são retos em membros de *H.* sp. 3, enquanto nos de *H. eichhorniae*, assim como nos espécimes de todas as demais espécies deste gênero, os ductos apresentam um trajeto ascendente e outro descendente (Ringuelet, 1978,1985).

Figura 30. Esquema de *Haementeria.* sp. 3. A. Morfologia interna geral, vista ventral, complexo salivar e parte do sistema reprodutor masculino omitidos. B. detalhe do complexo salivar, vista ventral. C. Detalhe do sistema reprodutor masculino, vista ventral. A: átrio; BF: bulbo faríngeo; CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; Es: esôfago; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G: gânglios; GA: glândulas salivares anteriores; GP: glândulas salivares posteriores; Ov: ovários; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Figura 31. Tomografia computadorizada de *Haementeria* sp. 3. A. Corte transversal com a parede do corpo atenuada digitalmente mostrando a base do átrio. B. Corte transversal mostrando o anel da base do ovário. C. Corte horizontal mostrando os dois pares de órgãos esofágicos. D. Corte horizontal mostrando a região das glândulas salivares. A: átrio; BF: bulbo faríngeo; CG: cecos gástricos; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; GA: glândulas salivares anteriores; Ov: ovários.



Fonte: próprio autor

Haementeria sp. 4.

Material examinado: Mato Grosso do Sul: Miranda, 04 espécimes, Out 2011.

Diagnose: um par de ocelos em III, circulares, próximos entre si, parcialmente cobertos por tegumento; poro bucal terminal, na região anterior da ventosa oral; tubérculos ausentes; gonóporos separados por 1 anel primário; segmentos da região mediana do corpo trianulados, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso; 1 par de glândulas salivares cilíndricas, indivisas; 7 pares de cecos gástricos, primeiro par não bifurcado, último par formando trajeto descendente; ductos ejaculatórios formando curva pré-atrial; 6 pares de sacos testiculares.

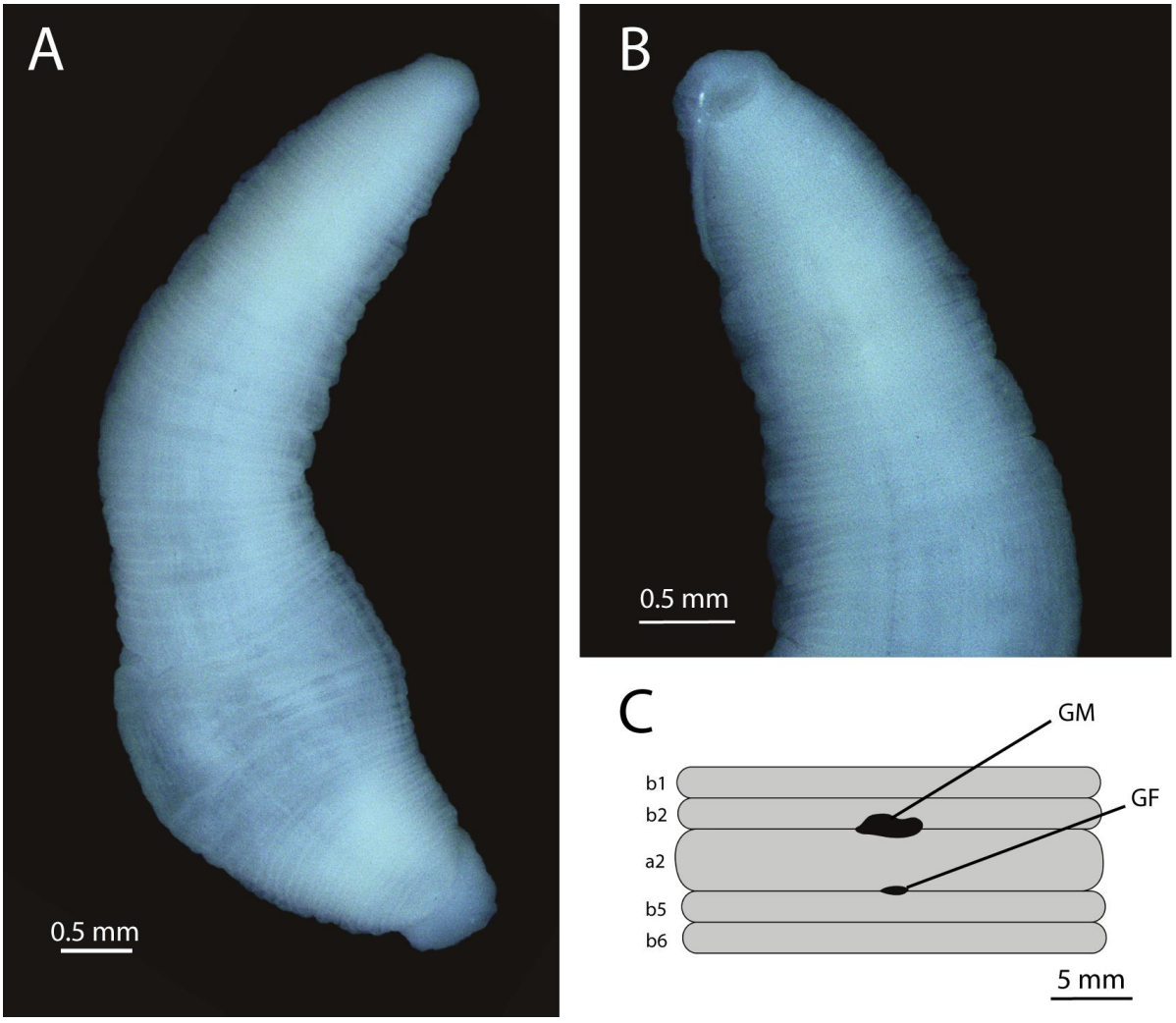
Formato do corpo: comprimento 6-9 mm; largura máxima 2-3 mm; corpo sublanceolado, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis evidentes; região anterior afilada; ventosa posterior bem desenvolvida, largura máxima 1-2 mm.

Morfologia externa: corpo uniformemente amarelado; sem padrões de pigmentação no dorso ou no ventre; tubérculos ausentes no dorso e no ventre; órgãos de Lang ausentes; um par de olhos em III, circulares, próximos entre si, parcialmente cobertos por tegumento; glândula nucal ausente; escudo nucal ausente; poro bucal terminal, na região anterior; gonóporos separados por 1 anel primário (figura 32C), masculino em XI b6/XII b1, feminino em XII b2/a2; 1 anel pós anal; segmentos I-V com total de 7 anéis; segmentos VI-XXIV trianulados, [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)] no ventre, [(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)] no dorso, segmentos XXV-XVII bianulados.

Morfologia interna: faringe formando uma curva em XII; bulbo faríngeo em XII; 1 par de glândulas salivares compactas (figura 33B), cilíndricas, grossas, indivisas, conectadas à região lateral do bulbo faríngeo por um ducto comum; 2 pares de órgãos esofágicos em XII/XIII (figura 33B), conectados ao esôfago por ductos independentes, par anterior arredondado, par posterior cilíndrico; 7 pares de cecos gástricos sem ramificações (figura 33A), primeiro par em XIII, último par em XIX, formando trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais, voltados anteriormente; sistema reprodutor masculino formado por átrio anterior ao gânglio XII (figura 33C); ductos ejaculatórios formando curta curva pré-atrial; porção ascendente dos ductos ejaculatórios com 6 curvas (figura 33C), estendidas de XII à XIII; 6 pares de sacos

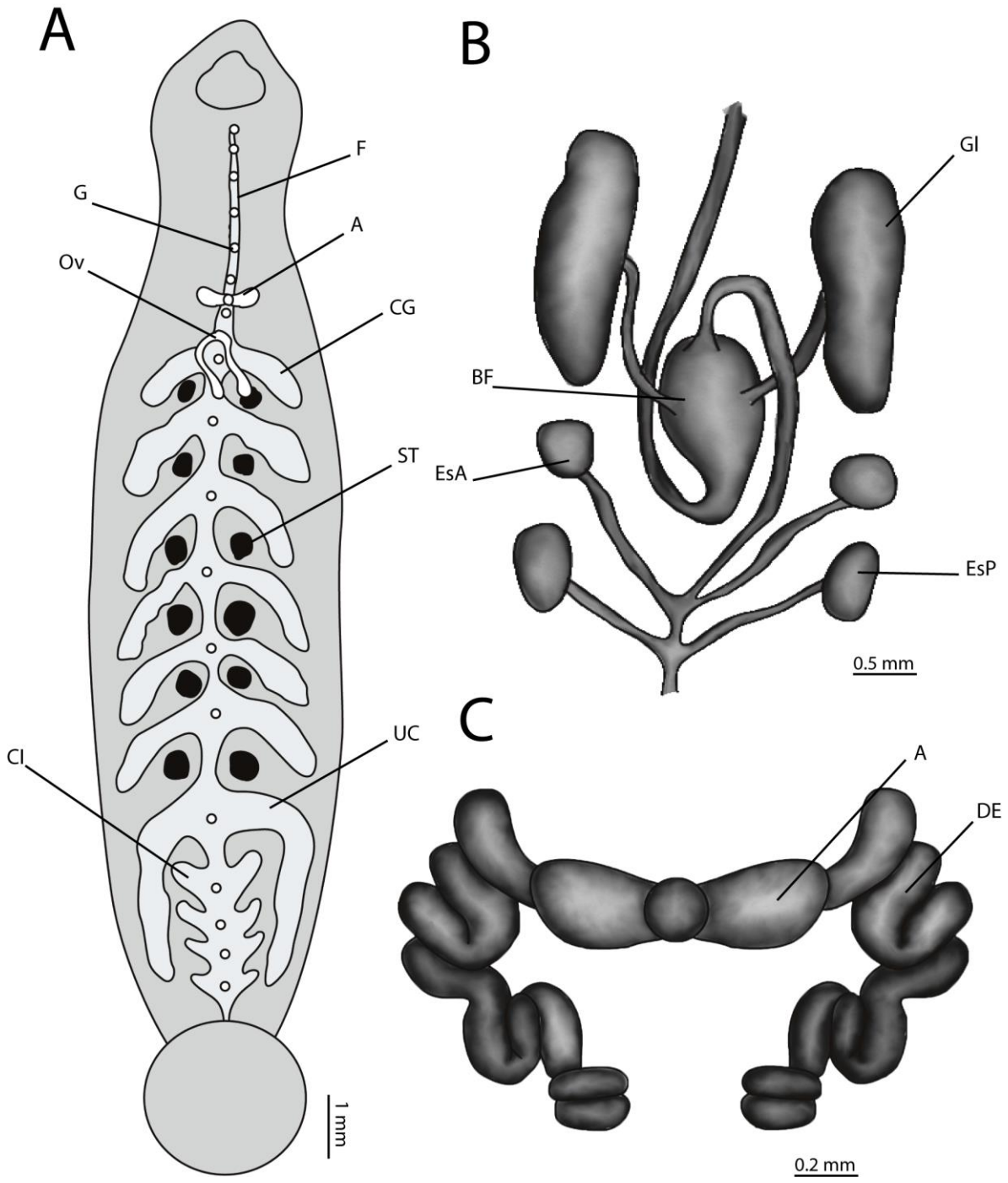
testiculares (figura 33A); ovários simples, formando anel ao redor do cordão nervoso ventral.

Figura 32. *Haementeria* sp. 4. A. Vista dorsal. B. Região anterior, vista ventral. C. Esquema do segmento XII mostrando os gonóporos, vista ventral. GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino.



Fonte: próprio autor

Figura 33. Esquemas de *Haementeria* sp. 4. A. morfologia geral, vista ventral, complexo salivar e parte do sistema reprodutor masculino omitidos. B. Detalhe do complexo salivar, vista ventral. C. Detalhe do sistema reprodutor masculino, vista ventral. A: átrio; BF: bulbo faríngeo CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G: gânglios; Gl: glândulas salivares; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Comentários: Membros de *H.* sp. 4 podem ser confundidos com animais pertencentes ao gênero *Helobdella*, devido ao tamanho e localização dos gonóporos. Porém, o padrão de anelação típico de *Haementeria* e o complexo salivar justificam o posicionamento da espécie neste gênero. Dos membros de *Haementeria* que apresentam gonóporos separados por apenas 1 anel, membros de *H. molesta* (Cordero, 1934) também têm o dorso pouco ornamentado, com apenas uma fileira mediano-dorsal de tubérculos pouco salientes, além dos órgãos de Lang; todavia, nos animais desta espécie, os gonóporos são separados pelo anel XII a1 e há dois pares de glândulas salivares, enquanto em exemplares de *H.* sp.5 os gonóporos são separados pelo anel XII a2 e há um único par de glândulas salivares compactas. Com relação a este último caractere, a espécie norte-americana *H. officinalis* de Filippi, 1849 é a única outra do gênero cujos membros possuem apenas um par de glândulas salivares. Contudo, há muitas diferenças entre membros de *H. officinalis* e de *H.* sp. 5, como, por exemplo, a posição dos gonóporos, o número de sacos testiculares e a conexão dos órgãos esofágicos com o esôfago (Ringuelet, 1976, 1985).

Placobdella Blanchard, 1893

Diagnose: tubérculos dorsais presentes, dispostos em fileiras longitudinais ou sem padrão metamérico; órgãos de Lang ausentes; segmentos da região mediana do corpo compostos por 2 ou 3 anéis, faces ventral e dorsal [(a1+a2)+(a3)] ou [(a1)+(a2)+(a3)]; gonóporos separados por 1 anel primário; 1 par de órgãos esofágicos alongados, conectados diretamente ao esôfago; ovários ramificados, anel ao redor do cordão nervoso ventral ausente.

Comentários: a diagnose acima é baseada nas espécies norte-americanas do gênero e inclui os caracteres morfológicos apontados por Oceguera-Figueroa (2012). As espécies abaixo não possuem os caracteres típicos deste gênero, porém seus gêneros originais, *Trachybdella* e *Oligobdella*, foram sinonimizados com *Placobdella* por Cordero (1936) e Siddall et al. (2005), respectivamente. Os caracteres morfológicos apresentados sugerem uma forte relação destas espécies com *Haementeria*. Para maior detalhamento, ver a seção 4.4 e 4.3.

Chave para identificação das espécies de *Placobdella* registradas no território brasileiro[11]

1a. Segmentos da região mediana do corpo formados por 2 anéis [(a1 + a2) + (a3)] 2

1b. Segmentos da região mediana do corpo compostos por 3 anéis [(a1) + (a2) + (a3)] 3

2a. Sulco transversal em (a1 + a2) ausente..... *P.* sp. 2

2b. Sulco transversal em (a1 + a2) presente..... *P. columbiensis* (Ringuelet, 1972a)

3a. Gonóporo masculino em XI a3/XII (a1+a2), gonóporo feminino em XII a3/XIII (a1+a2) 5 fileiras longitudinais de tubérculos ..... *P. striata* Oka, 1932

3b. Gonóporo masculino em XI a3/XII (a1+a2), gonóporo feminino XII (a1+a2)/a3 no mínimo 7 fileiras longitudinais de tubérculos 4

4a. Sete fileiras longitudinais de tubérculos grandes, fileiras adicionais de tubérculos pequenos podem estar presentes; cinco pares de sacos testiculares 5

4b. Nove fileiras longitudinais de tubérculos grandes, fileiras adicionais de tubérculos pequenos estão presentes; 6 pares de sacos testiculares ..... *P.* sp. 1

5a. Sete fileiras longitudinais de tubérculos grandes, pouco visíveis, sem tubérculos pequenos entre os tubérculos principais..... *P. maculata* (Weber, 1915)

5b. Sete fileiras longitudinais de tubérculos grandes, entremeados por inúmeros tubérculos pequenos..... *P. bistriata* (Pinto, 1912b)

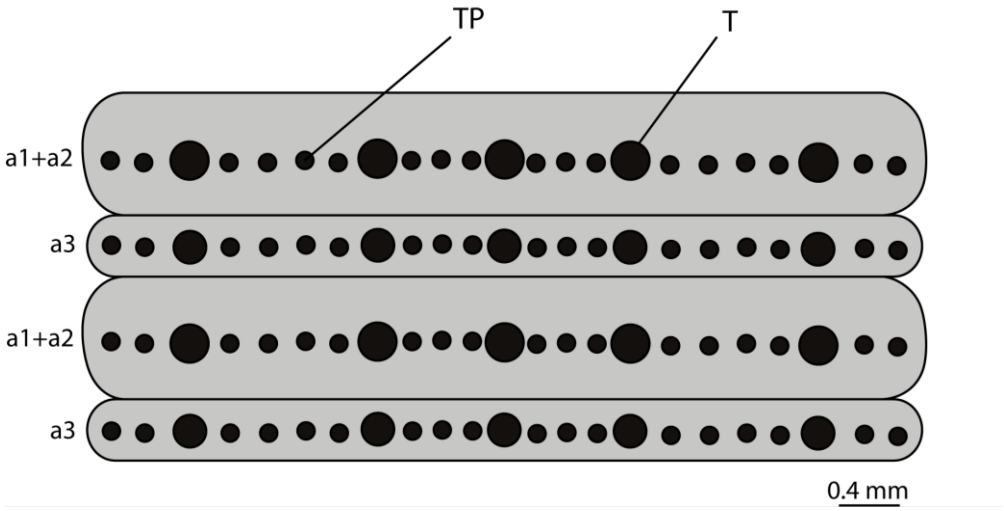
[11] as espécies não analisadas neste trabalho foram incluídas na chave baseado na literatura (Cordero, 1936; 1937; Pinto, 1923; 1920b; Ringuelet, 1972a; 1985).

Placobdella columbiensis (Ringuelet, 1972a)

Material examinado: Roraima: Parque Nacional do Viruá, 1 espécime (MZUSP 205), data de coleta desconhecida.

Diagnose: um par de ocelos em II, próximos entre si, praticamente fundidos, formando mancha ocelar única; poro bucal na região anterior da ventosa; manchas paramarginais escuras ausentes, em ambas as faces; 15-18 linhas longitudinais de pequenos tubérculos no dorso; 5 fileiras longitudinais de tubérculos grandes no dorso de (a1+a2) e a3, 1 fileira mediano dorsal, 1 par paramediano e 1 par lateral; órgãos de Lang ausentes; gonóporos separados por 1 anel (a1+a2); segmentos da região mediana do corpo bianulados, [(a1+a2)>(a3)], sulco transversal nos anéis (a1+a2).

Figura 34. Ilustração dos segmentos da região mediana do corpo de *Placobdella columbiensis*, vista dorsal. T: tubérculos; TP: tubérculos pequenos.



Fonte: próprio autor

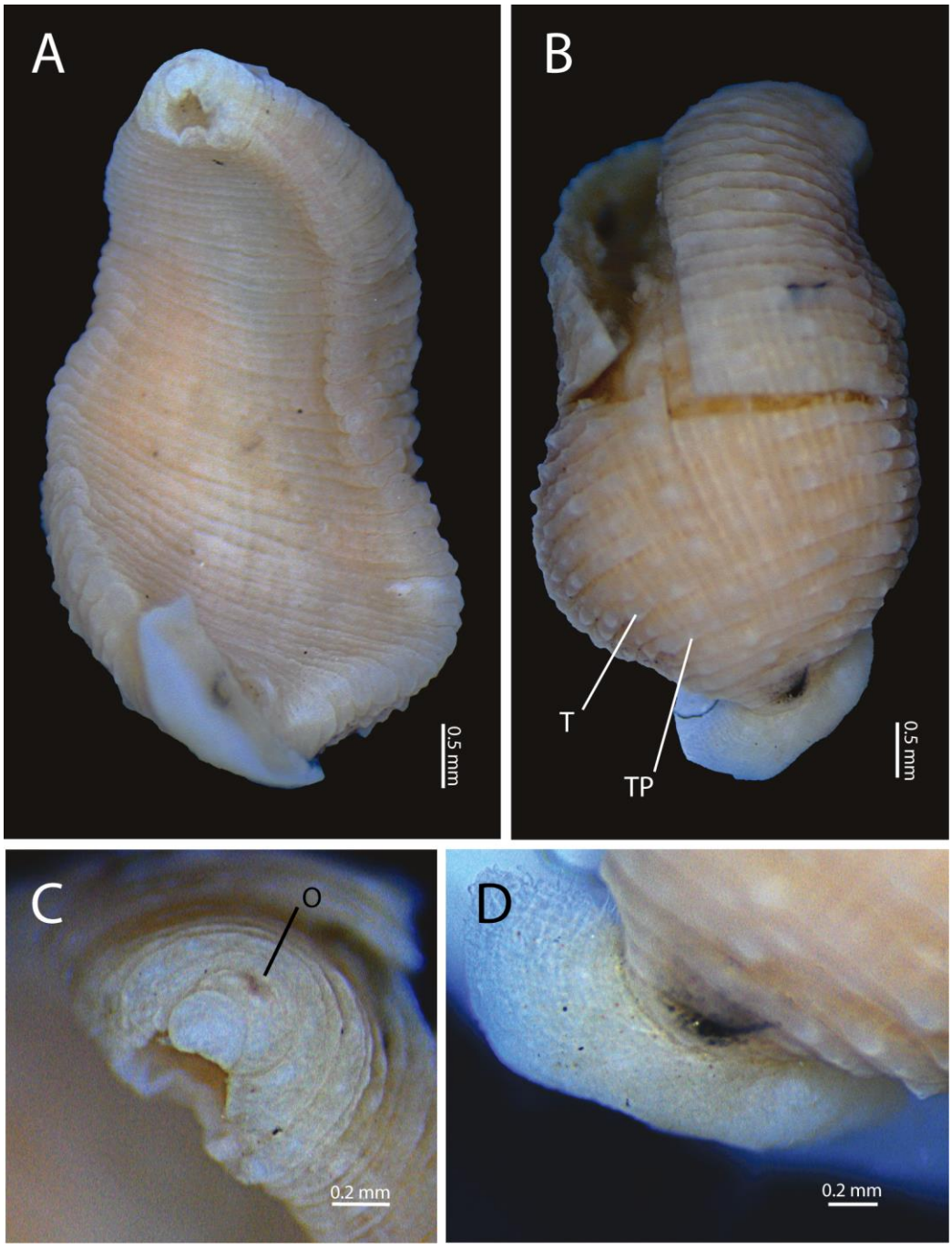
Formato do corpo: comprimento máximo 6 mm; largura máxima 4 mm; corpo lanceolado, achatado dorso-ventralmente, face ventral côncava; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis evidentes; região anterior afilada; cabeça triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, terminal.

Morfologia externa: corpo uniformemente amarelado, sem detalhes na pigmentação; manchas metaméricas ausentes em ambas as faces; 5 fileiras longitudinais de tubérculos dorsais grandes nos anéis (a1+a2) e a3, 1 mediano-dorsal, 1 par paramediano e 1 par paramarginal; 15-18 fileiras longitudinais de pequenos

tubérculos dorsais, entre as fileiras principais de tubérculos grandes (figuras 34 e 35B); órgãos de Lang ausentes; um par de ocelos em II, praticamente fundidos, formando mancha ocelar mediana única (figura 35C); poro bucal na região anterior da ventosa; gonóporos separados por 1 anel (a1+a2), masculino em XI a3/XII (a1+a2), feminino em XII (a1+a2)/a3; ânus em XVII, seguido por um anel pós anal (figura 35D); segmentos I-IV unianulados; segmentos V-XXVII bianulado, [(a1+a2)>(a3)] em ambas as faces, com sulco transversal dorsal, nos anéis (a1+a2).

Comentários: duas espécies bianuladas da América do Sul apresentam padrões complexos de disposição de tubérculos no dorso: *P. cheloniae* (Ringuelet, 1978) e *P. columbiensis* (Ringuelet, 1972a). A primeira, apresenta 7-9 fileiras de tubérculos longitudinais nos anéis (a1+a2) e a3, sendo uma mediano-dorsal, dois pares paramedianos e 2-3 pares laterais. Além disso, Ringuelet (1978, 1985) descreveu três pares de sensilas em formato de tubérculos diminutos na segunda metade dos anéis (a1+a2), provavelmente correspondendo aos órgãos de Lang, que são facilmente observáveis em *Haementeria*, gênero ao qual aqueles animais devem estar proximamente relacionados, caso espécies bianuladas da América do Sul formem um clado monofilético de posicionamento semelhante aquele obtido por Oceguera-Figueroa (2012). Para membros de *P. columbiensis*, Ringuelet (1972a, 1985) descreveu sete fileiras longitudinais de tubérculos, cinco fileiras nos anéis (a1+a2) e duas fileiras nos anéis a3. Porém, o número e localização das fileiras principais de tubérculos nos anéis a3 são imprecisas, já que os tubérculos principais são facilmente confundidos com os tubérculos pouco pronunciados presentes por toda a superfície do corpo de animais pertencentes a esta espécie. Outro caractere importante descrito em Ringuelet (1972a) é o sulco transversal presente no dorso dos anéis (a1+a2), que serve como evidência da fusão dos anéis a1 e a2, típica de membros do atualmente não-válido gênero *Oligobdella*. Apesar dos tubérculos presentes em a3 do indivíduo estudado estarem deslocados em relação à descrição original apresentada por Ringuelet (1972a), esta variação ocorre em um caractere pouco fixado de acordo com o próprio autor. A morfologia interna desta espécie não foi descrita neste trabalho, pois o único espécime disponível (MZUSP 205) já se encontrava muito dissecado, impossibilitando as observações.

Figura 35. *Placobdella columbiensis*. A. Vista ventral. B. Vista dorsal. C. Região da cabeça, vista dorsal. D. Região posterior, vista dorsal. O: ocelos; T: tubérculos grandes; TP: tubérculos pequenos.



Fonte: próprio autor

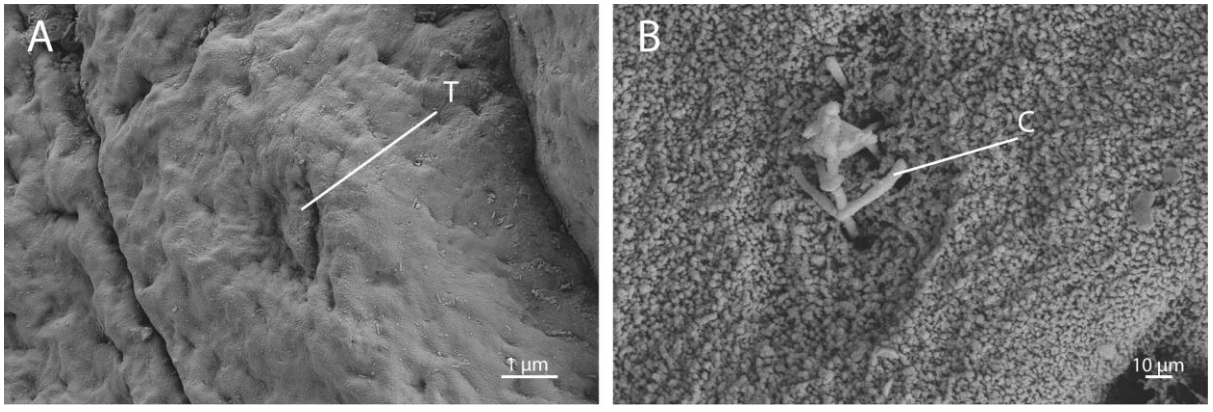
Placobdella maculata Weber, 1915

Material examinado: Piauí: Caracol, Parque Nacional das Confusões, 33 espécimes (MZUSP 0234), Jan 2002.

Diagnose: um par de ocelos em III, puntiformes, bem separados entre si; poro bucal na região anterior da ventosa; mancha escura semicircular na região nucal; um par de manchas paramarginais escuras no ventre de cada a2; 7 linhas longitudinais de tubérculos; gonóporos separados por 1 anel primário; segmentos da região mediana do corpo formados por 3 anéis primários, [(a1)+(a2)+(a3)]; glândulas salivares difusas; 7 pares de cecos gástricos, primeiro par ramificado anteriormente, pares 2-6 simples, último par formando trajeto descendente ramificado; ductos ejaculatórios pouco dobrados, 5 pares de sacos testiculares.

Formato do corpo: comprimento máximo 7-13 mm; largura máxima 2-6 mm; corpo lanceolado, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis evidentes; região anterior afilada; cabeça triangular; mais fina do que o resto do corpo; ventosa posterior bem desenvolvida, ventral, largura máxima 3-6 mm.

Figura 36. Microscopia eletrônica de varredura de *Placobdella maculata*. A. Morfologia dos tubérculos dorsais. B. Cílios presentes na região central de cada tubérculo dorsal. C: cílios; T: tubérculo.



Fonte: próprio autor

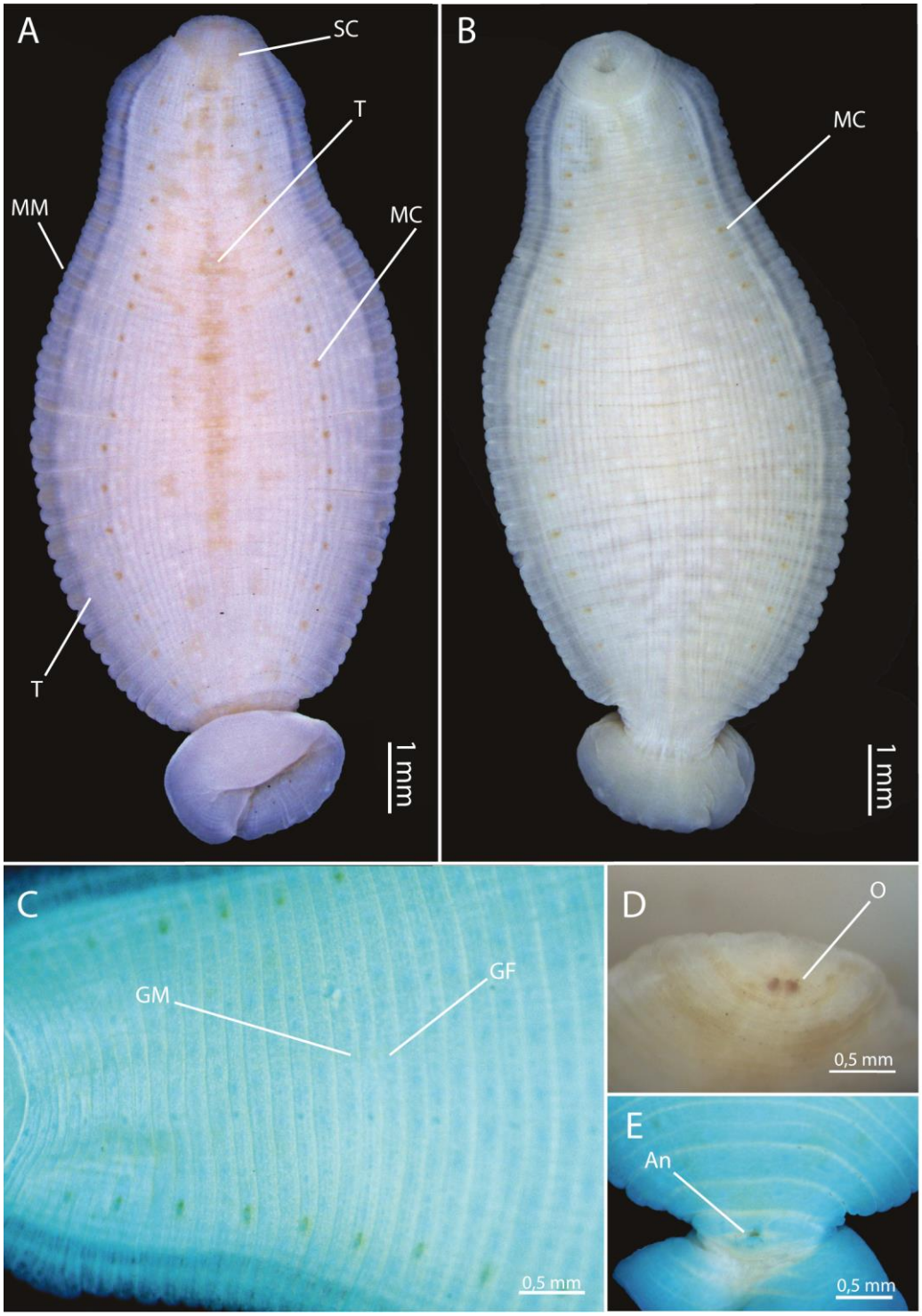
Morfologia externa: corpo uniformemente amarelado; manchas marginais escuras no dorso e no ventre em cada a2 dos segmentos pós nucais (figuras 37A, 37B e 38C); mancha escura semicircular na região nucal (figura 37A); 1 par de manchas paramarginais escuras no ventre, em cada a2; 7 linhas longitudinais de tubérculos

ciliados (figuras 36, 37A e 38C), 1 linha mediano-dorsal e 2 pares paramedianos, em todos os anéis primários, um par paramarginal nos a2; órgãos de Lang ausentes; um par de ocelos em III (figura 37D), puntiformes, bem separados entre si; poro bucal subterminal, na borda anterior da ventosa; gonóporo masculino em XII a1/a2; gonóporo feminino em XII a2/a3, separados por 1 anel primário (figura 37C); ânus em XXVII (figura 37E), seguido de 1 anel pós-anal; segmentos I-III unianulados; segmento IV bianulado, segmentos V-XXIV trianulados, [(a1)+(a2)+(a3)], segmentos XXV-XXVII bianulados.

Morfologia interna: base da faringe em XII/XIII; bulbo faríngeo ausente; glândulas salivares difusas, estendidas de X a XII; ducto comum das glândulas salivares em X/XI; dois pares de órgãos esofágicos esféricos conectados ao esôfago por tubos independentes finos (figura 38A, 39C e 39D), par anterior em X, par posterior em XI; 7 pares de cecos gástricos (figura 38A e 39A), primeiro par em XIII, com um ramo secundário, último par em XIX, formando trajeto descendente, de XIX a XXIII, ramificado em 4 lobos; 4 pares de cecos intestinais curtos; sistema reprodutor masculino formado por átrio localizado anteriormente ao gânglio XII, posicionado dorso-ventralmente; curvas pré-atriais dos ductos ejaculatórios ausentes (figura 38B); porção ascendente dos ductos ejaculatórios formada por 2 dobras em XII; 5 pares de sacos testiculares (figura 38A), primeiro par em XIII/XIV, último par em XVII/XVIII; ovários simples, curtos, formando um anel em volta do cordão nervoso ventral.

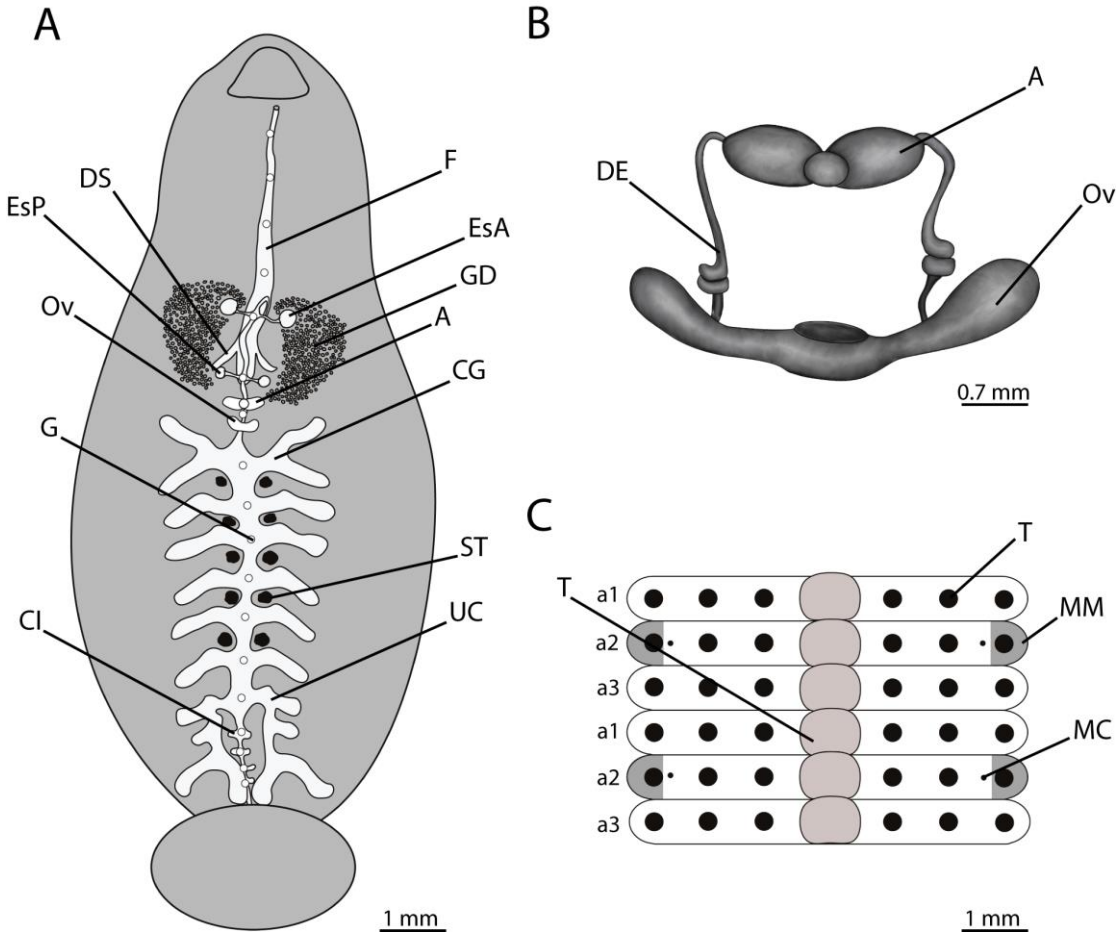
Distribuição geográfica: PERU. Rio Pacaya (Shain et al., 2007). BRASIL. Piauí, Caracol. Rio Grande do Sul, Porto Alegre (Ávida-Goulart, 1963).

Figura 37. *Placobdella maculata*. A. vista dorsal. B. vista ventral. C. vista ventral da região genital mostrando os gonóporos, animal corado com azul de metila. D. região da cabeça, mostrando os ocelos. E. região posterior mostrando o ânus, animal corado com azul de metila. An: ânus; GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; MC: manchas circulares; MM: manchas marginais; O: ocelos; SC: manchas semicirculares; T: tubérculos.



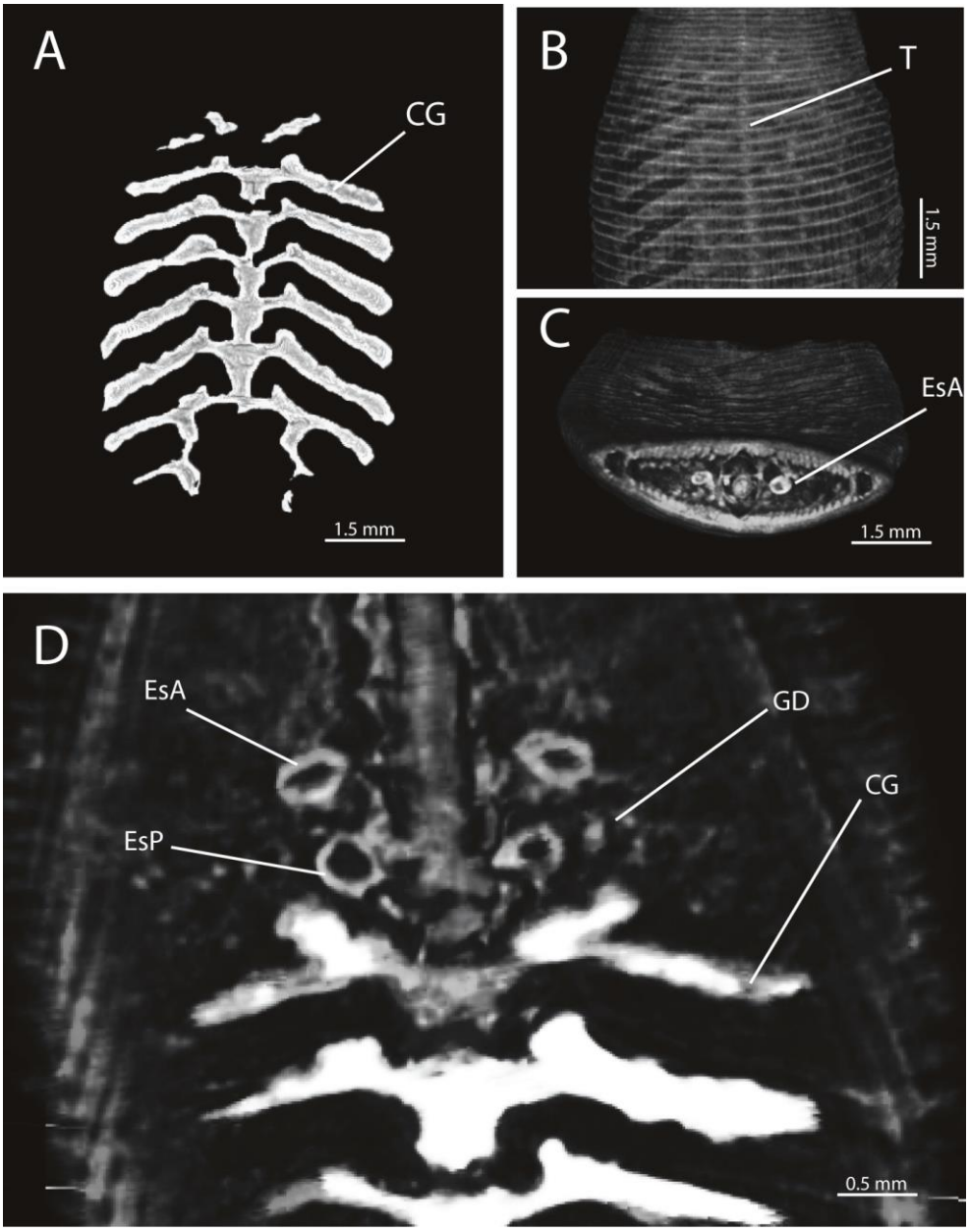
Fonte: próprio autor

Figura 38. *Placobdella maculata*. A. esquema da morfologia interna, vista ventral, parte do sistema reprodutor masculino omitida (não representada). B. sistemas reprodutores masculino e feminino. C. esquema dos segmentos da região mediana do corpo. A: átrio; CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; DS: ductos salivares; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G: gânglios; GD: glândulas salivares difusas; MC: manchas circulares; MM: manchas marginais; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; T: tubérculos; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Figura 39. Tomografia computadorizada, *Placobdella maculata*. A. Vista dorsal dos cecos gástricos isolados. B. vista dorsal dos segmentos da região mediana do corpo, mostrando a disposição dos tubérculos. C. corte transversal mostrando os órgãos esofágicos anteriores. D. Corte horizontal da região do segmento XII. CG: cecos gástricos; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; GD: glândulas salivares difusas; T: tubérculos.



Fonte: próprio autor

Comentários: Membros de *P. maculata* são semelhantes a animais identificados como *Placobdella* por Ringuelet (1985), cujas diferenças interespecíficas são muito sutis. Membros de *P. bistriata* (Pinto, 1920b) possuem sete linhas longitudinais de tubérculos grandes intercaladas com seis linhas longitudinais de tubérculos pequenos, em todos os anéis primários, na face dorsal, e nenhum tubérculo pigmentado é descrito no ventre nos animais desta espécie. Membros de *P. striata* Oka, 1932 não tiveram a sua morfologia interna descrita, contudo seus gonóporos são separados por dois anéis primários, diferenciando-os facilmente exemplares de *P. maculata*, onde os gonóporos são separados por apenas um anel. Os caracteres apresentados pelos espécimes examinados neste estudo são consistentes com os de membros de *P. maculata*, de acordo com a descrição de Ringuelet (1985).

***Placobdella* sp. 1**

Material examinado: Ceará: Jardim, 31 espécimes, em *Mesoclemmys tuberculata* (CHI 06, CHI 07), 2011. Paraíba: Alhandra, Fábrica de Cimentos Elizabeth 1 espécime, em *Caiman latirostris* (CHI 15), 2015; Pernambuco: Serra Talhada, 2 espécimes, em *Phrynops geoffroanus* (CHI 02, CHI 23), 2014; Camaragibe, Privê Vermont, 66 espécimes, em *Phrynops geoffroanus* (CHI 05), 2014; Camaragibe, Privê Vermont, 1 espécime, em *Phrynops geoffroanus* (CHI 10), 2010; Sergipe: Poço Redondo, 16 espécimes, em *Mesoclemmys tuberculata* (CHI 35), 2014; Tobias Barreto, 4 espécimes, em *Mesoclemmys tuberculata* (CHI 36, CHI 37, CHI 38), 2014.

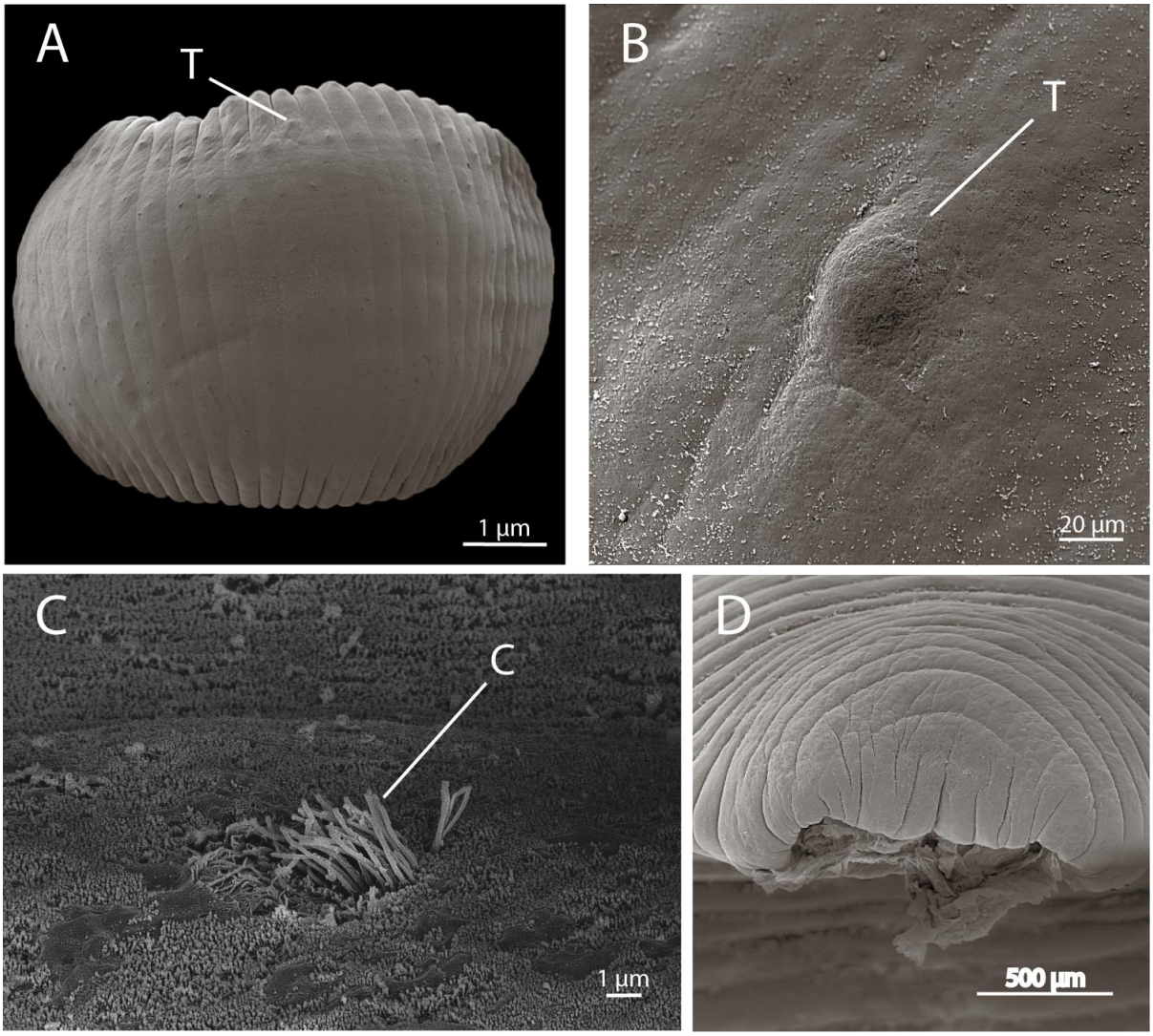
Diagnose: um par de ocelos em II, em virgula, bem separados entre si; poro bucal na região anterior da ventosa; mancha escura semicircular na região nucal; 1 par de manchas paramarginais escuras no ventre e no dorso de cada a2; 9 linhas longitudinais de tubérculos grandes; 1 par de linhas longitudinais de órgãos de Lang em a2; gonóporos separados por 1 anel primário; segmentos da região mediana do corpo formados por 3 anéis primários, [(a1)+(a2)+(a3)]; glândulas salivares difusas; 7 pares de cecos gástricos, primeiro par bifurcado, pares 2-6 simples, último par formando trajeto descendente ramificado; curva pré-atrial presente; 6 pares de sacos testiculares.

Formato do corpo: comprimento máximo 5-47 mm; largura máxima 4-19 mm; corpo lanceolado, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis triangulares, destacadas do corpo; cabeça arredondada; ventosa posterior ventral, terminal, largura máxima 2-5 mm.

Morfologia externa: um par de manchas circulares dorsais e ventrais em a2 (figuras 41A, 41C e 42C); 9 linhas longitudinais de tubérculos ciliados grandes, intercalados por inúmeros tubérculos pequenos (figuras 40B, 40C, 40A e 42C), 1 linha mediano-dorsal, 1 par paramediano, 2 pares paramarginais e 1 par marginal em cada anel primário, tubérculos da fileira paramarginal externa dos a2 deslocados para a margem; órgãos de Lang em cada a2, entre os tubérculos marginais e paramarginais, sobrepostos às manchas circulares; tubérculos ventrais presentes, sem padrão definido; um par de ocelos em II, em vírgula, bem separados entre si; poro bucal na margem anterior da ventosa anterior; gonóporos separados por 1-1.5 anel primário (figura 41E), masculino em XII a1/a2 ou XII a1, feminino em XII a2/a3; ânus em XVII, no meio do anel; segmento I unianulado, retangular; segmento II também unianelado; segmentos III-IV bianulados; segmento V trianulado, com divisão entre a1 e a2 pouco marcada; segmentos VI-XXIII trianulados, ([a1]+[a2]+[a3]); segmentos XXIV-XXV bianulados, ([a1]+[a2+a3]); segmentos XVI-XVII unianulados.

Morfologia interna: faringe formando uma curva em XII; base da faringe em XII; bulbo faríngeo ausente; glândulas salivares difusas de X a XIII, conectadas à base da faringe por 1 par de ductos comuns, estendendo-se de X a XII; 2 pares de órgãos esofágicos, em X e XI (figura 42A e 43B), esféricos, conectados ao esôfago por 1 par de ductos comuns finos; 7 pares de cecos gástricos (figura 42A), primeiro par em XIII, com ramificação ascendente, pares 2-6 não ramificados, último par de cecos gástricos ramificados em 3 lobos secundários, formando trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais simples; sistema reprodutor masculino formado por átrio localizado anteriormente ao gânglio XII (figuras 41B, 41F, 43D); ductos ejaculatórios altamente variáveis (figuras 41B, 41F e 42B), formados apenas por porção ascendente, com curva curta em XII, às vezes com segunda curva em XII/XIII; ductos ejaculatórios formando uma ampla curva pré-atrial; 6 pares de sacos testiculares de XIII/XIV a XVIII/XIX (figura 42A), pouco conspícuos; ovários simples (figura 41B), posteriores a XII, base formando anel ao redor do cordão nervoso ventral (figura 43D).

Figura 40. Microscopia eletrônica de varredura de *Placobdella* sp. 1. A. Face dorsal do corpo, mostrando a disposição dos tubérculos. B. Morfologia geral do tubérculo. C. Detalhe da morfologia do tubérculo mostrando o tufo de cílios no ápice. D. região da cabeça mostrando o formato do primeiro segmento do corpo. C: cílios; T: tubérculos.



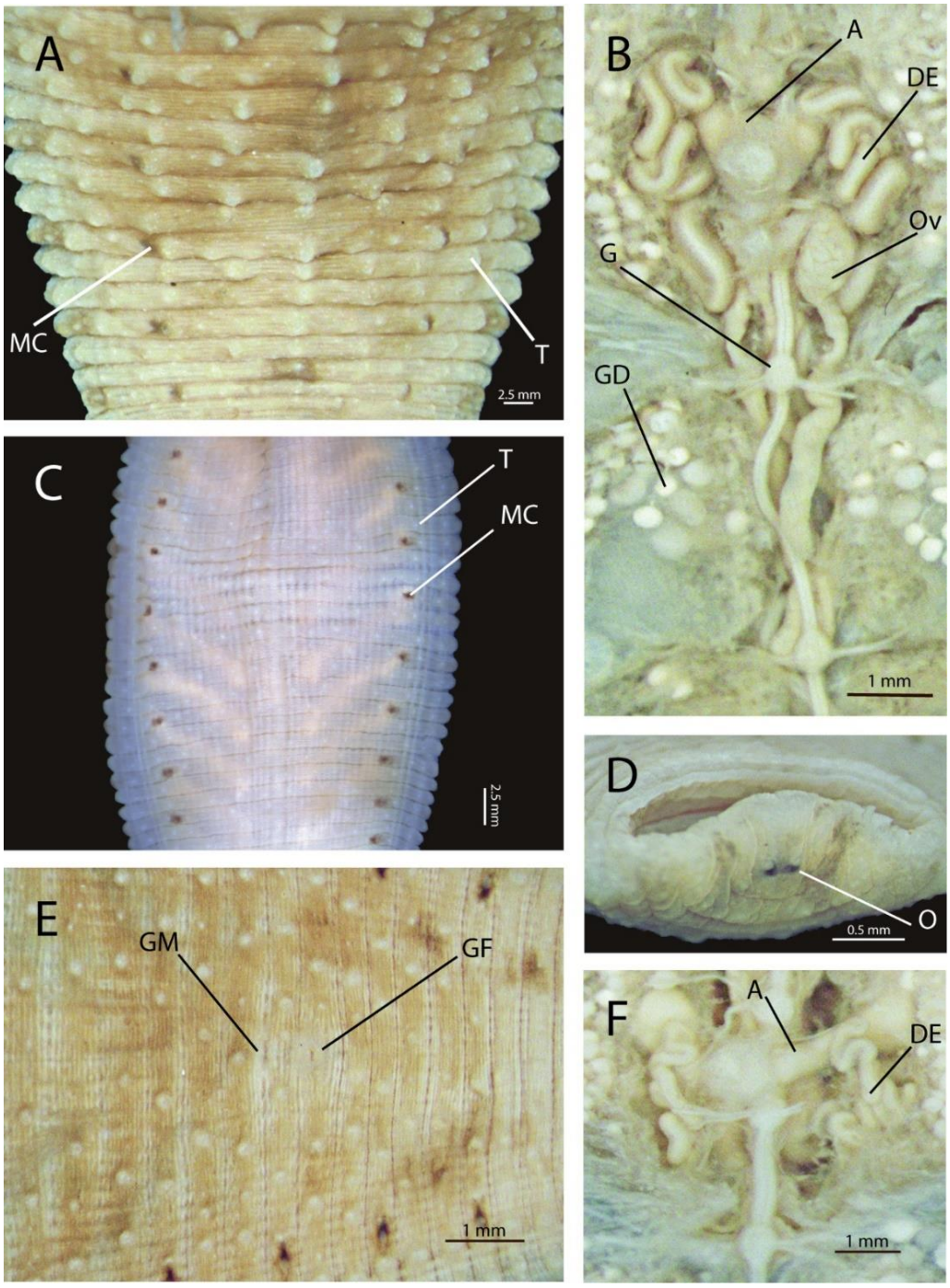
Fonte: próprio autor

Comentários: membros de *P.* sp. 1 assemelham-se a indivíduos identificados por Ringuelet (1985) como pertencentes a três espécies do gênero *Placobdella*: *P. striata, P. bistriata* e *P. maculata*. Estas espécies apresentam glândulas salivares difusas no parênquima, uma característica incomum para as sanguessugas parasitas encontradas na América do Sul. Contudo, membros de *P. striata* diferem dos de *P.* sp. 1 pela posição dos gonóporos masculino e feminino, que são separados por dois anéis, ao invés de 1-1.5 anel, e por apresentarem cinco pares de sacos testiculares (Ringuelet, 1985), ao invés de 6, como em membros de *P.* sp. 1.

Poucos estudos tratam da morfologia de *P. maculata*, portanto as comparações feitas neste trabalham baseiam-se principalmente nas observações dos espécimes estudados. Externamente, membros de *P*. *maculata* possuem sete linhas longitudinais de tubérculos, enquanto os de *P.* sp. 1 apresentam nove linhas longitudinais. Há, ainda, diversas diferenças internas que distinguem os indivíduos destas duas espécies, como por exemplo o formato dos ductos ejaculatórios, que são complexos em membros de *P.* sp. 1 e com apenas duas voltas nos de *P. maculata.*

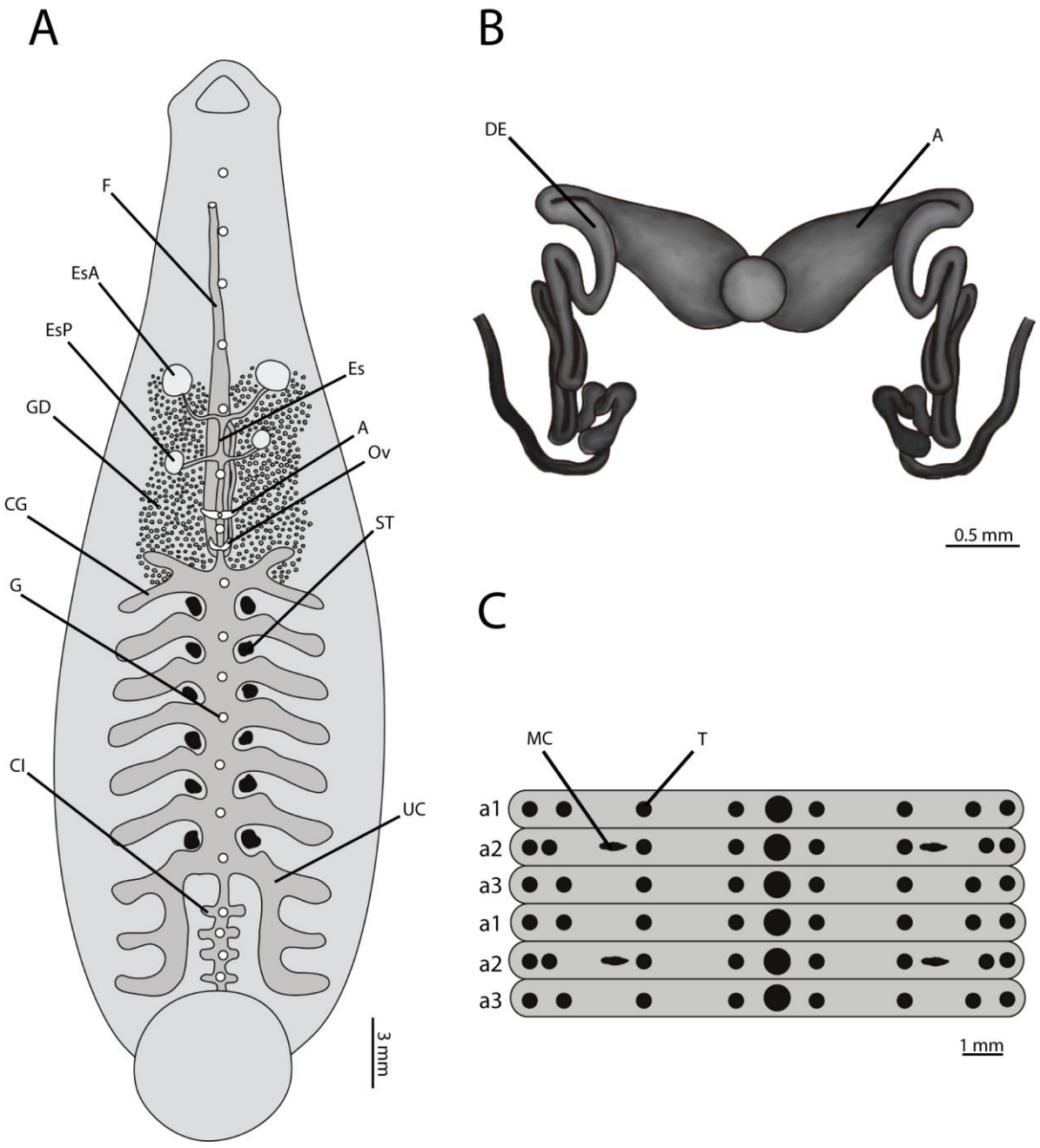
Das três espécies citadas, cujos representantes se assemelham aos de *P.* sp. 1*,* os de *P. bistriata* são os que têm a morfologia melhor descrita, principalmente graças ao trabalho de Cordero (1936), no qual o autor redescreve três espécies descritas por César Pinto. Segundo o autor, há sete fileiras longitudinais de tubérculos de forma regular em todos os anéis primários, descrição consistente com a de Pinto (1920, 1923). Em exemplares de *P.* sp 1., por outro lado, há nove fileiras longitudinais de tubérculos.

Figura 41. *Placobdella* sp. 1. A. Vista dorsal dos segmentos da região mediana do corpo. B. Dissecção ventral da região genital. C. vista ventral dos segmentos da região mediana do corpo. D. Face dorsal da região da cabeça. E. vista ventral da região genital, mostrando a posição dos gonóporos. F. dissecção ventral da região genital, mostrando a variação dos ductos ejaculatórios (comparar com figura 40B). A: átrio; DE: ductos ejaculatórios; G: gânglios; GD: glândulas salivares difusas: GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; MC: manchas circulares; O: ocelos; Ov: ovários; T: tubérculos.



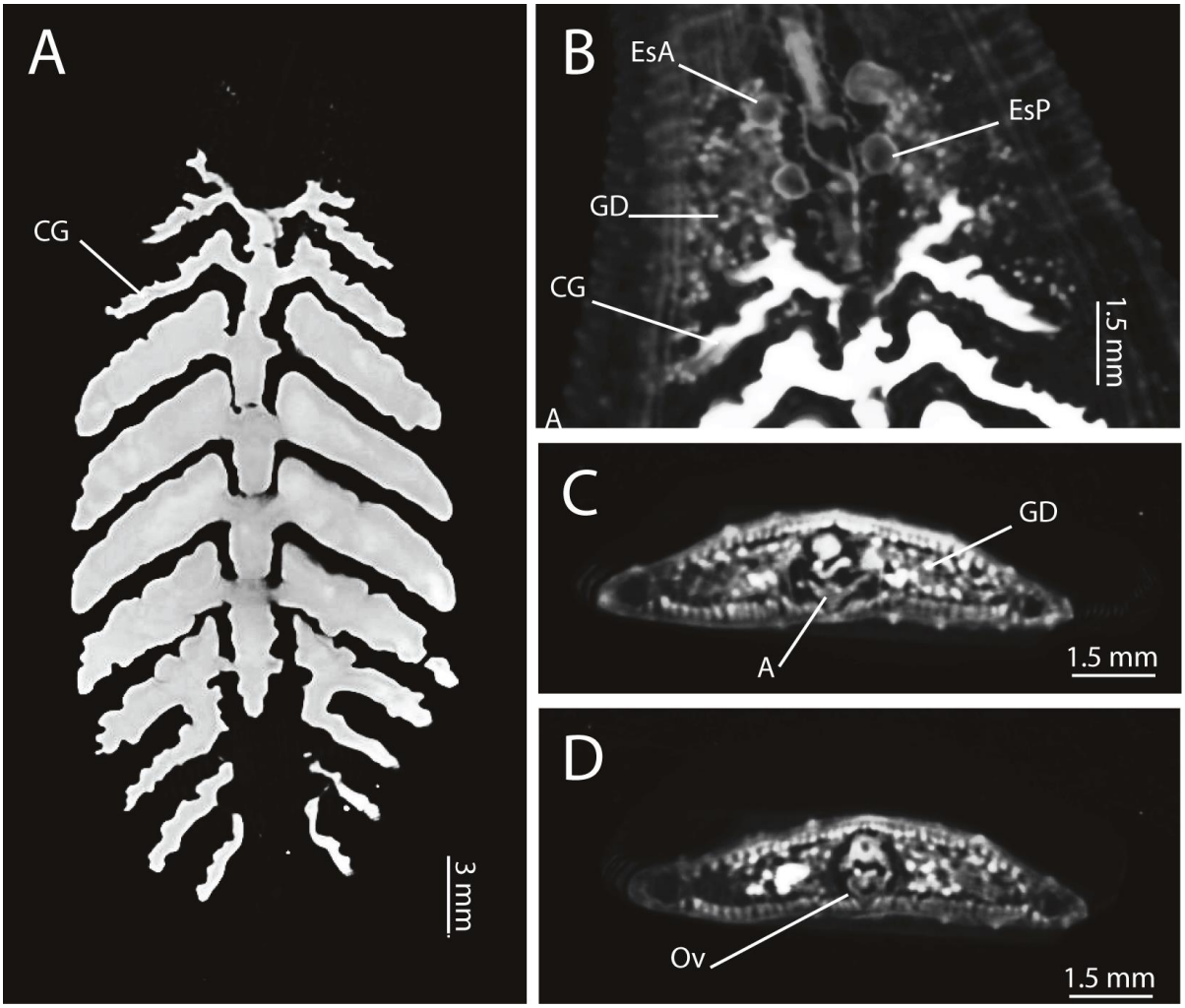
Fonte: próprio autor

Figura 42. *Placobdella* sp 1. A. Esquema da morfologia interna, vista ventral, partes dos sistemas reprodutores masculino e feminino omitidas. B. Esquema do sistema reprodutor masculino. C. Esquema da face dorsal dos segmentos da região mediana do corpo. A: átrio; CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; Es: esôfago; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G: gânglios; GD: glândulas salivares difusas; MC: manchas circulares; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; T: tubérculos; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Figura 43. Tomografia computadorizada de *Placobdella* sp. 1. A. Vista ventral dos cecos gástricos. B. Região do complexo salivar, vista ventral. C. Corte transversal da região genital, mostrando o átrio. D. Corte transversal da região genital, mostrando a base do ovário. A: átrio; CG: cecos gástricos; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; GD: glândulas salivares difusas; Ov: ovários.



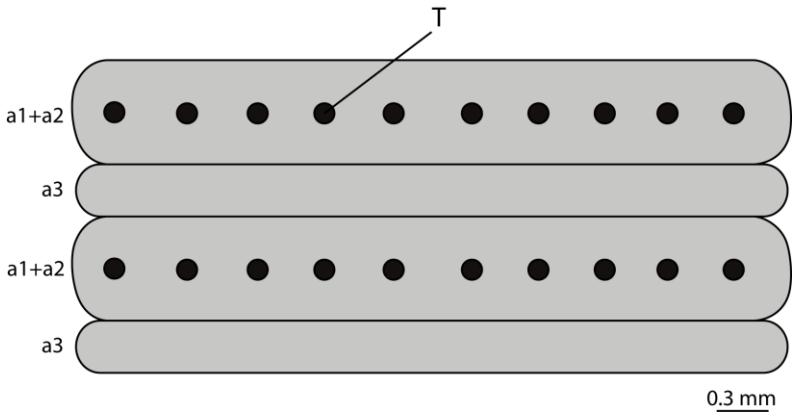
Fonte: próprio autor.

Placobdella sp. 2

Material examinado: Roraima: Parque Nacional do Viruá, 4 espécimes (MZUSP 206), data de coleta desconhecida. Roraima: Parque Nacional do Viruá, 5 espécimes (MZUSP 207), data de coleta desconhecida.

Diagnose: um par de ocelos em II, circulares, separados entre si; poro bucal na região anterior da ventosa; manchas paramarginais escuras ausentes em ambas as faces; 8-10 linhas longitudinais de tubérculos no dorso; órgãos de Lang ausentes; gonóporos separados por 1 anel (a1+a2); segmentos do meio do corpo bianulados, [(a1+a2)>(a3)]; bulbo faríngeo presente; 2 pares de glândulas salivares compactas; 2 pares de órgãos esofágicos conectados ao esôfago por ductos comuns; 6 pares de cecos gástricos; curva pré-atrial ausente; porção ascendente dos ductos ejaculatórios formando 4 curvas; 6 pares de sacos testiculares.

Figura 44. Esquema dos segmentos da região mediana do corpo de *Placobdella* sp. 2. T: tubérculos.



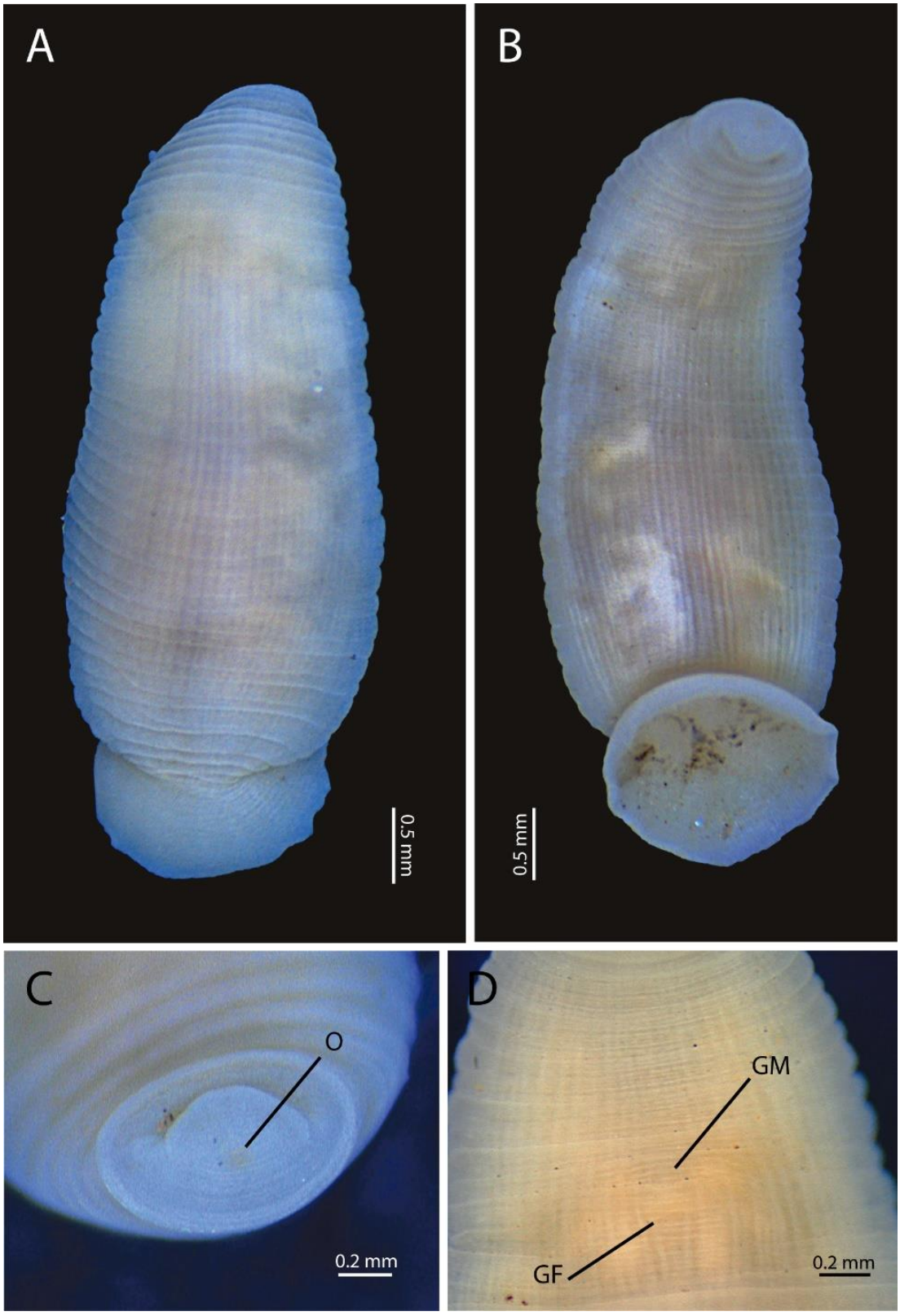
Fonte: próprio autor

Formato do corpo: comprimento máximo 4-7 mm; largura máxima 1-4 mm; corpo lanceolado, achatado dorso-ventralmente, face ventral côncava; ventosa anterior bem desenvolvida, triangular; margens dos anéis evidentes; região anterior afilada; cabeça triangular; ventosa posterior bem desenvolvida, terminal, largura máxima 1-3 mm.

Morfologia externa: corpo uniformemente amarelado, sem detalhes na pigmentação; manchas metaméricas ausentes no dorso e no ventre; 8-10 linhas longitudinais de tubérculos nos anéis (a1+a2) (figura 44); tubérculos ausentes no ventre; órgãos de Lang ausentes; um par de ocelos em II (figura 45C), quase inconspícuos, circulares, próximos entre si; poro bucal na região anterior da ventosa; gonóporos separados por um anel (a1+a2) (figura 45D), masculino em XI a3/XII (a1+a2), feminino em XII (a1+a2)/a3; ânus em XXVII seguido de 1 anel pós-anal; segmentos I-IV unianulados; segmentos V-XXVII: bianulados, anéis primários a1 e a2 fundidos em anel único, [(a1+a2)>(a3)], em ambas as faces.

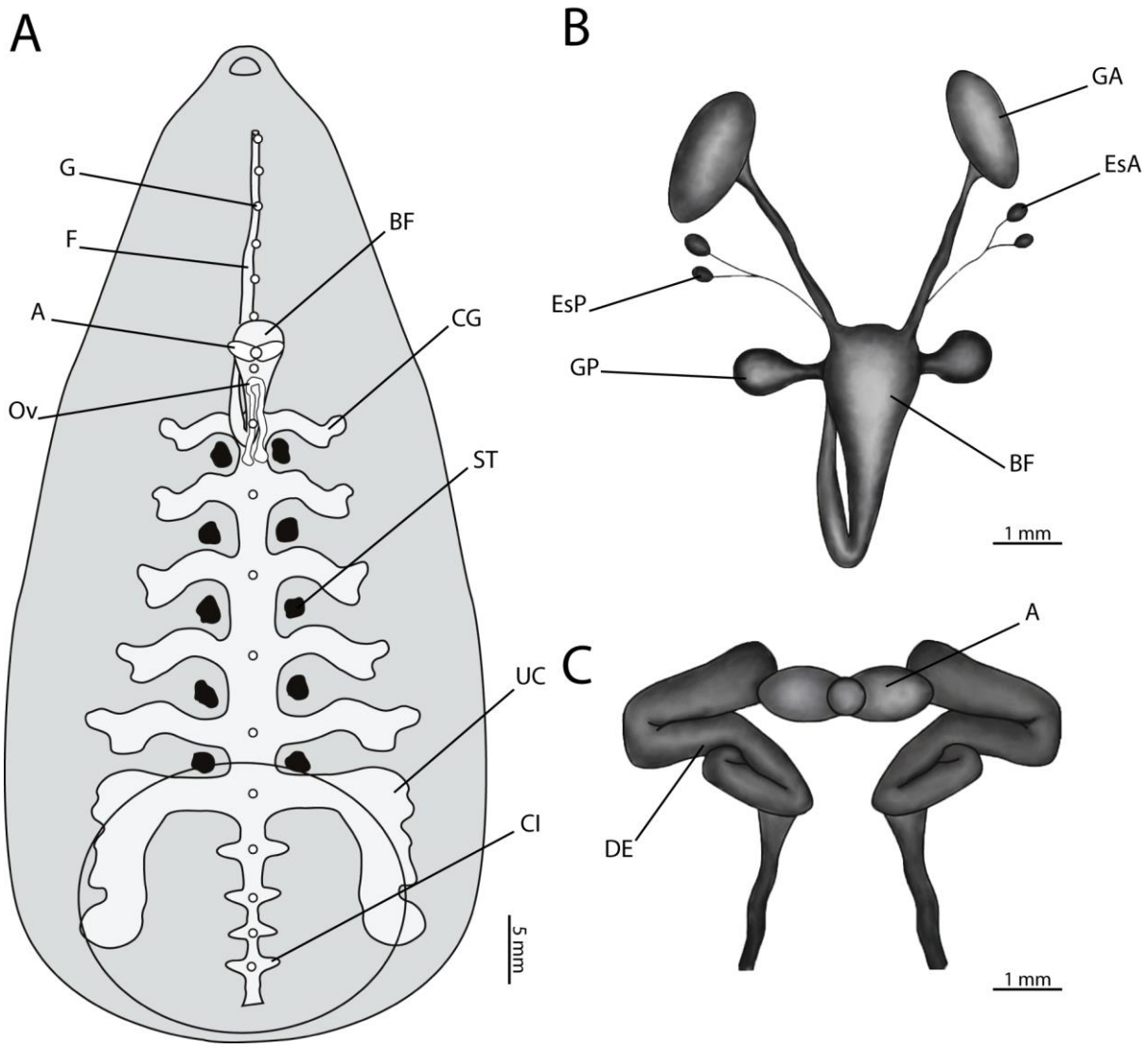
Morfologia interna: curva na base da faringe presente, em XII; bulbo faríngeo presente; 2 pares de glândulas salivares compactas (figura 46B), par anterior ovalado, em XII, conectado à base da faringe por finos ductos salivares independentes, par posterior esférico, em XII, conectado diretamente ao bulbo faríngeo; 2 pares de órgãos esofágicos esféricos, em XII (figura 46B), conectados ao esôfago por 1 par de ductos comuns; 6 pares de cecos gástricos não ramificados (figura 46A), pares 1-5 sem trajeto descendente, primeiro par em XIV; último par em XIX, formando longo trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais simples, curtos, triangulares; sistema reprodutor masculino formado por átrio anterior ao gânglio XII; curva pré-atrial dos ductos ejaculatórios ausente (figura 46C); ductos ejaculatórios enovelados, formando 4 curvas na porção ascendente, grossos na região anterior, afilados na região posterior (figura 46C); 6 pares de sacos testiculares (figura 46A), primeiro par em XIII/XIV, último em XVIII/XIX; ovários simples, não ramificados, formando anel ao redor do cordão nervoso ventral.

Figura 45. *Placobdella* sp.2. A. Vista dorsal. B. Vista ventral. C. Região da cabeça, vista dorsal. D. Região genital, vista ventral. GF: gonóporo feminino; GM: gonóporo masculino; O: ocelos.



Fonte: próprio autor

Figura 46. Esquemas de *Placobdella* sp. 2. A. Morfologia interna geral, vista ventral, complexo salivar e parte do sistema reprodutor masculino omitidos. B. detalhe do complexo salivar, vista ventral. C. Detalhe do sistema reprodutor masculino. A: átrio; BF: bulbo faríngeo; CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; EsA: órgãos esofágicos anteriores; EsP: órgãos esofágicos posteriores; F: faringe; G: gânglios; GA: glândulas salivares anteriores; GP: glândulas salivares posteriores; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

Comentários: Assim como em *Haementeria brasiliensis sensu* Cordero, 1937, os exemplares de *P.* sp. 2 também possuem tubérculos dorsais pequenos. Contudo, os indivíduos identificados neste trabalho como *P.* sp. 2 apresentam diferenças significativas na morfologia interna, em relação a membros de *H. brasiliensis sensu* Cordero, 1937, já que sanguessugas do último táxon não apresentam bulbo faríngeo, possuem ductos dos órgãos esofágicos independentes e apresentam um padrão complexo de curvas, no enovelado dos ductos ejaculatórios.

Família Piscicolidae Johnston, 1865

Diagnose: corpo cilíndrico, às vezes dividido em traquelossomo e urossomo; clitelo aparente; ventosa anterior destacada do corpo; poro bucal central; brânquias ausentes ou presentes; último par de cecos gástricos fundido.

Chave para as espécies de Piscicolidae registradas no território brasileiro[12]

1a. Brânquias presentes no urossomo, 3 pares por segmento..... *Branchellion* cf. *carvalhoi* Schlenz, 1971[13]
1b. Brânquias ausentes 2

2a. Traquelossomo e urossomo evidentes; traquelossomo curto, com anelações pouco evidentes; gonóporos separados por 2 anéis..... *Trachelobdella mulleri* Diesing, 1850
2b. Tranquelossomo e urossomo pouco conspícuos, ou corpo não dividido em regiões 3

3a. Vesículas pulsáteis ausentes; tubérculos ausentes..... *Austrobdella* sp.
3b. Vesículas pulsáteis presentes; tubérculos presentes 4

[12] as espécies não analisadas neste trabalho foram incluídas na chave baseado na literatura disponível (Furiness et al., 2007; Shlenz, 1971; Pinto, 1923; Llewellyn, 1966).

[13] espécie descrita em uma tese de doutorado e nunca formalmente publicada.

4a. Segmentos do meio do corpo compostos por 12 anéis..... *Johanssonia arctica* (Johansson, 1899)
4b. Segmentos do corpo compostos por 3-5 anéis 5

5a. Tubérculos em a2 cúbicos..... *Pontobdella macrothela* Schmarda, 1861
5b. Tubérculos em a2 arredondados 6

6a. Segmentos da região mediana do corpo com fórmula [(a1) + (a2) + (a3)], tanto dorsal, quanto ventralmente..... *Stibarobdella moorei* (Oka, 1910)
6b. Segmentos da região mediana do corpo com fórmula [(b1 + b2) + (a2) + (b5+b6)], tanto dorsal, quanto ventralmente..... *P. dispar* Cordero, 1937

***Austrobdella* Badham, 1916**

Diagnose: ocelos presentes ou ausentes; superfície do corpo lisa, tubérculos ausentes; segmentos da região mediana do corpo com 6-12 anéis; 1 par de glândulas salivares alongadas em XI, conectado diretamente à faringe; 6-7 pares de cecos gástricos, último par com trajeto descendente; 5 pares de sacos testiculares envoltos por uma câmara celômica; celoma formado por vasos celômicos laterais, dorsal e ventral; seios celômicos laterais do vaso ventral em posição segmentar; seios celômicos laterais do vaso dorsal em posição intersegmentar, conectados à câmara celômica testicular.

***Austrobdella* sp.**

Material examinado: Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 33 espécimes, Jan 2016.

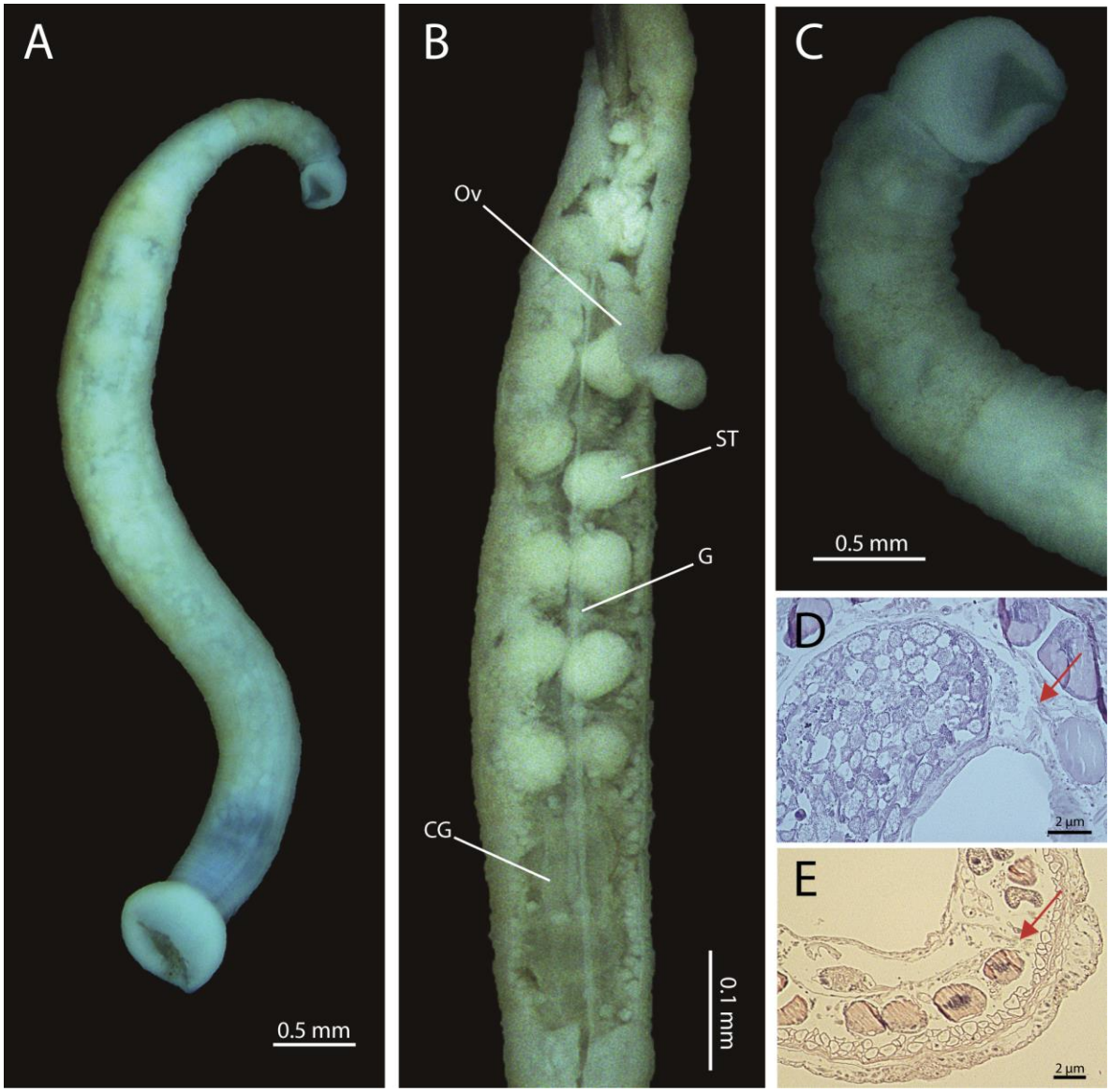
Diagnose: um par de ocelos em VIa1; manchas circulares em cada a2; gonóporos separados por 5 anéis; segmentos do meio do corpo octoanulados, [(b1+c3+c4)+(b3+b4)+(b5+c11+c12)], em ambas as faces; 1 par de glândulas salivares; 6 pares de cecos gástricos, último par com trajeto descendente, fundidos; intestino reto, cecos ausentes.

Formato do corpo: comprimento máximo 16 mm; largura máxima 2 mm; corpo cilíndrico, não achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, ventral, circular (figura 45C); margens dos anéis evidentes; corpo fracamente dividido em traquelossomo (segmentos I-XI) e urossomo (segmentos XII-XXVII), ventosa posterior bem desenvolvida, terminal, largura máxima 2 mm.

Morfologia externa: corpo uniformemente amarelado, 6 linhas longitudinais de manchas despigmentadas nos b4 (figura 48C); mancha em forma de meia lua na região da ventosa; região genital despigmentada; tubérculos ausentes; um par de ocelos em VIa1; poro bucal na região central da ventosa; gonóporos separados por 5 anéis, masculino em XI c12/XII b1, feminino em XII b4/ b5; segmentos I-V sem segmentação evidente, formando ventosa anterior; segmentos VI-XXVII octoanulados, [(b1+c3+c4)+(b3+b4)+(b5+c11+c12)], em ambas as faces (figura 48C).

Morfologia Interna: faringe reta, sem curva na base, esta em XII; bulbo faríngeo ausente; 1 par de glândulas salivares compactas e alongadas, em XI (figura 48A), conectado diretamente à faringe; estômago formado por 5 glóbulos (figura 48A), de XIV a XVIII; 1 par de cecos gástricos desenvolvidos em XIX (figura 48A), trajeto descendente presente, fundidos entre si; cecos intestinais ausentes; sistema reprodutor masculino formado por átrio anterior ao gânglio XII (figura 48B); curva pré-atrial dos ductos ejaculatórios presente; porção ascendente dos ductos ejaculatórios formando enovelado em XIII; 5 pares de sacos testiculares (figura 48A), elípticos, primeiro par em XIV/XV, último em XVIII/XIX; ovários simples, sem ramificações, estendidos de XII/XIII-XIV/XV; canais celômicos ventral e dorsal presentes (figuras 48D e 48E); um par de canais celômicos laterais segmentares, conectados por seios laterais ao canal ventral (figuras 47E e 48E); celoma testicular conectado ao canal celômico dorsal (figuras 47D e 48D).

Figura 47. *Austrobdella* sp. 1. A. vista ventral. B. Dissecção ventral. C. Região anterior vista ventral. D. Corte transversal da região intersegmentar (HE), seta indica a conexão com o canal celômico dorsal. E. Corte transversal da região segmentar (HE), seta indica a conexão com o canal celômico lateral. CG: cecos gástrico; G: gânglios; Ov: ovários; ST: sacos testiculares.



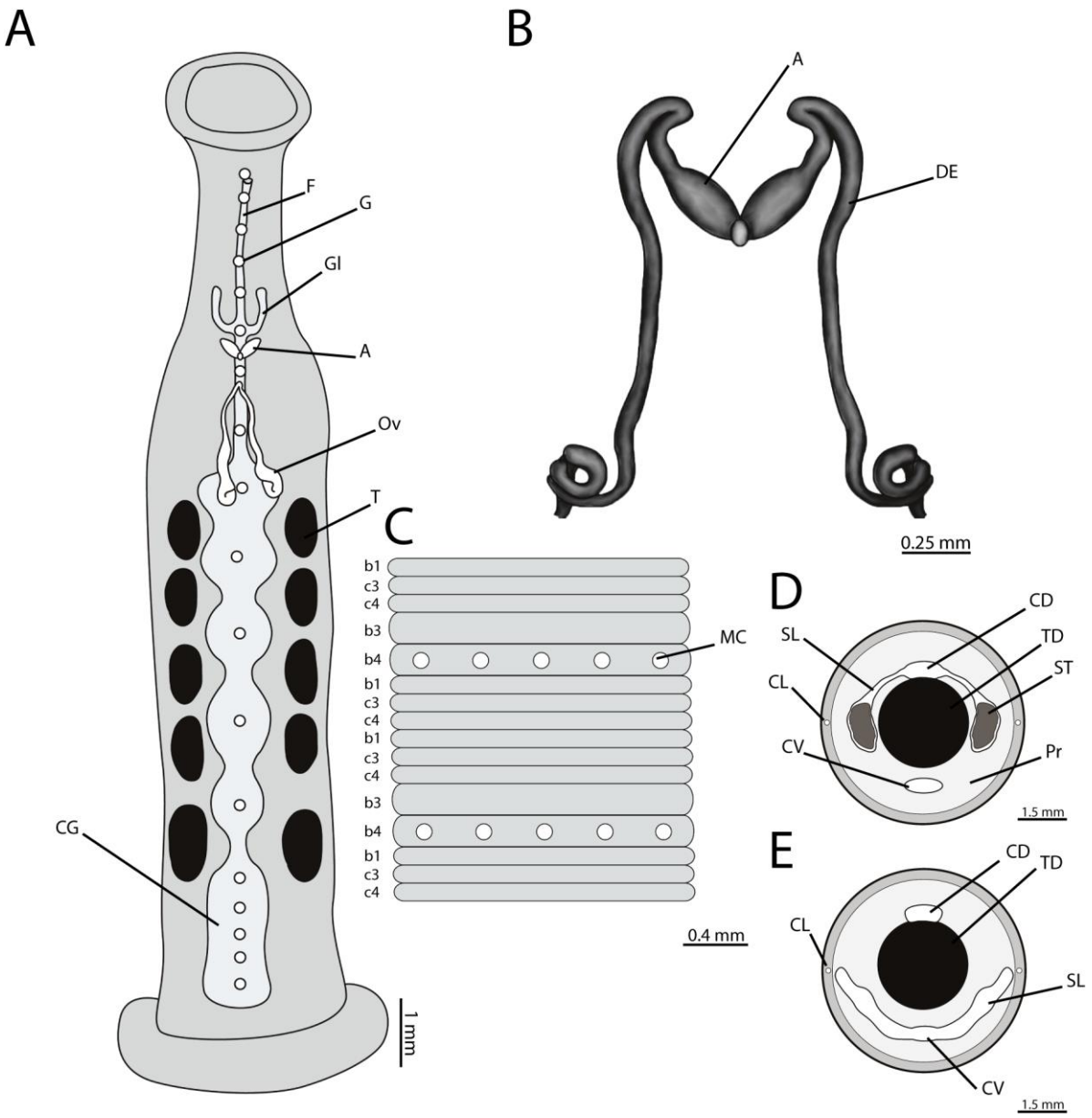
Fonte: próprio autor

Comentários: *Austrobdella* é composto por oito espécies, distribuídas globalmente, e o presente é o primeiro registro do gênero para o Atlântico Sul. Externamente, seus membros podem ser facilmente confundidos com aqueles de espécies de *Heptacyclus* Vasiliev, 1939, somente se diferenciando daqueles pela distribuição dos seios laterais dos vasos celômicos ventral e dorsal. Em exemplares de *Austrobdella*,

há seios laterais do vaso celômico ventral na região segmentar do metâmero, enquanto o vaso celômico dorsal possui seios laterais em posição intersegmentar, conectados às câmaras celômicas testiculares. Por outro lado, em sanguessugas de espécies de *Heptacyclus*, os seios de ambos os vasos celômicos têm posição segmentar. Tipicamente, membros de espécies de *Austrobdella* são descritos como possuindo seis anéis por segmento na região mediana do corpo, contudo podem haver subdivisões destes anéis principais (ex. Williams et al., 2007).

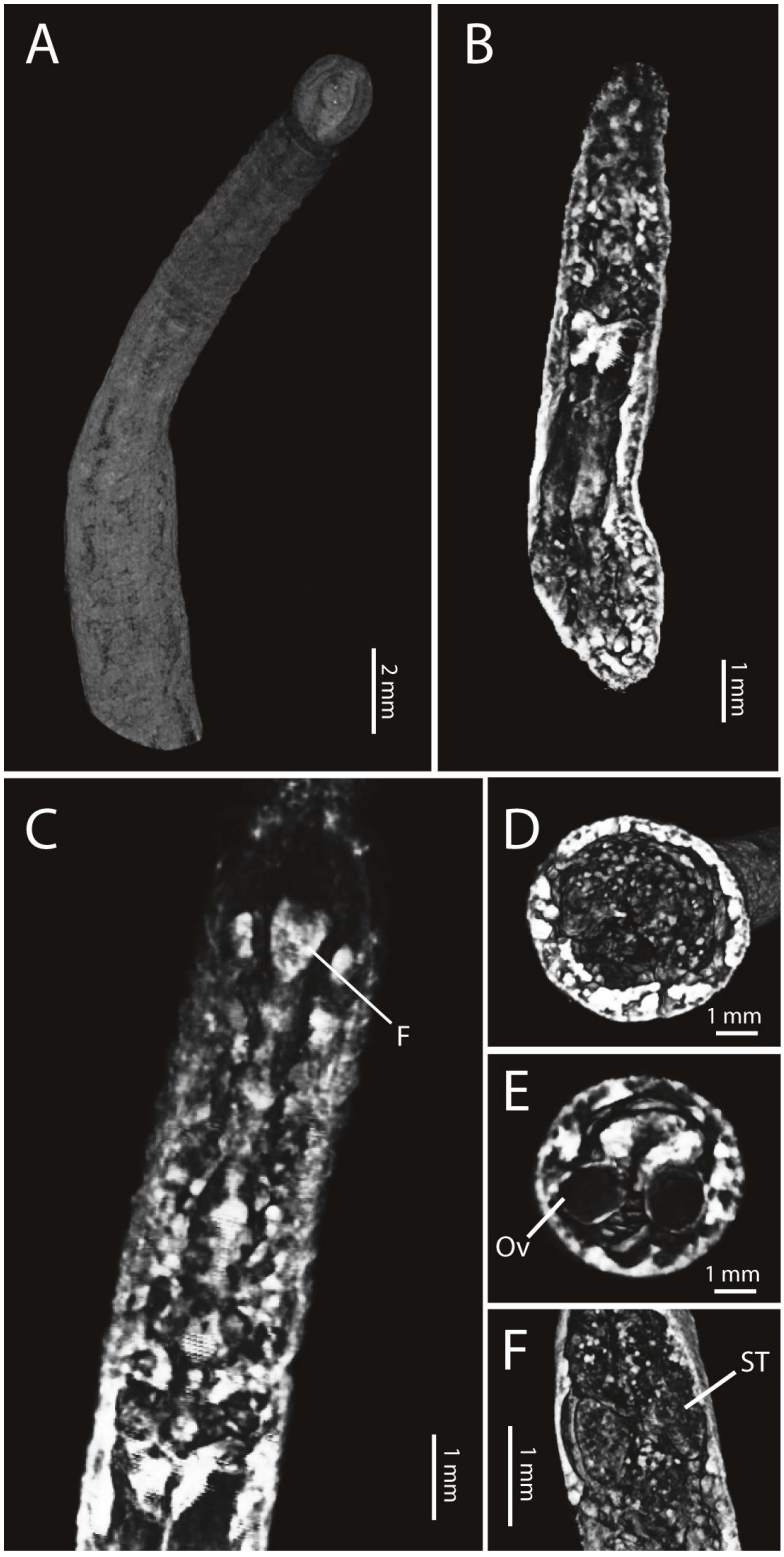
Duas espécies do gênero têm registro na América do Sul, na costa pacífica do continente, *A. collumicus* Williams, Urrutia & Burreson, 2007 e *A. losmoliniensis* Williams, Urrutia & Burreson, 2007. Membros da primeira espécie são diagnosticados por apresentarem 13 pares de ocelos segmentares na região do urossomo. Membros da segunda espécie possuem traquelossomo e urossomo conspícuos, ocelos restritos à ventosa oral, cecos gástricos bem definidos e cecos intestinais ausentes. Ambas as espécies descritas para as costas dos Estados Unidos, *A. californiana* Burreson, 1977 e *A. translucens* Badham, 1916, não apresentam ocelos, possuem traquelossomo e urossomo evidentes e sete pares de cecos gástricos distintos (Badham, 1916; Burreson, 1977). *Austrobdella anoculata* Moore, 1940 tem registro para a Groelândia e seus membros podem ser facilmente diferenciados dos de *A.* sp. 1 pela ausência de ocelos, presença de sete pares de cecos gástricos, o último dos quais com ramificações secundárias, e três pares de cecos intestinais (Moore, 1940). *Austrobdella bilobata* Ingram, 1957 foi registrada (e mal descrita) para a costa australiana, porém Richardson (1970) descreveu espécimes absolutamente desprovidos de ocelos. Para o continente africano, foi registrada a presença de *A. oosthuizeni* Utevsky & Mazepa, 2004, mas a organização dos seios celômicos dos exemplares daquela espécie é diferente da dos membros das demais espécies do gênero, não havendo qualquer conexão entre os vasos celômicos laterais e os vasos dorsal ou ventral (Utevsky & Mazepa, 2004).

Figura 48. Esquemas de *Austrobdella* sp. 1. A. Morfologia interna geral, vista dorsal. B. Detalhe do sistema reprodutor masculino, vista ventral. C. Segmentos da região mediana do corpo, vista dorsal. D. Corte transversal da região intersegmentar. E. Corte transversal da região segmentar. A: átrio; CD: canal celômico dorsal; CG: cecos gástricos; CL: canais celômicos laterais; CV: canal celômico ventral; DE: ductos ejaculatórios; F: faringe; G: gânglios; Gl: glândulas salivares; MC: manchas circulares; Ov: ovários; Pr: parênquima; SL: seios laterais; TD: trato digestório.



Fonte: próprio autor

Figura 49. Tomografia computadorizada de *Austrobdella* sp. 1. A. vista ventral da região anterior do corpo. B. Corte horizontal, vista ventral. C. Corte horizontal, região do traquelossomo. D. Corte transversal anterior ao gânglio XII. E. Corte transversal, segmento XII. F. Corte transversal, segmento XV. F: faringe; Ov: ovários; ST: sacos testiculares.



Fonte: próprio autor

Família Ozobranchidae Pinto, 1921

Diagnose: corpo separado em traquelossomo e urossomo; segmentos da região mediana do corpo bianulados; brânquias presentes no traquelossomo, número variável, no máximo 1 par de brânquias por segmento; massa ganglionar anterior formada por 8 gânglios primários; faringe eversível, curta; sistema reprodutor masculino formado por átrio não compartimentalizado.

Chave para identificação das espécies de Ozobranchidae registradas no território brasileiro[16]

1a. 5 pares de brânquias digitiformes, sem ramificações secundárias..... *Unoculubranchiobdella expansa* Peralta, Matos & Serra-Freire, 1988[17]

1b. 5-7 pares de brânquias digitiformes, ramificadas secundariamente 2

2a. 5 pares de brânquias.....*Ozobranchus margoi* (Apáthy, 1890)

2b. 7 pares de brânquias ..... *O. branchiatus* (Menzies, 1791)

Ozobranchus cf*. branchiatus* (Menzies, 1791)

Material examinado: São Paulo: Ubatuba, 70 espécimes, Ago 1986.

Diagnose: ocelos ausentes; sem padrões de pigmentação; gonóporos separados por 4 anéis; segmentos do meio do corpo bianulados, [(a1+a2)>(a3)], em ambas as faces; 2 pares de glândulas salivares; 8 pares de cecos gástricos, último dos quais com trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais.

Formato do corpo: comprimento máximo 4-21 mm; largura máxima 1-4 mm; elíptico, achatado dorso-ventralmente; ventosa anterior bem desenvolvida, ventral, circular; margens dos anéis evidentes; corpo fracamente dividido em traquelossomo

[16] As espécies não análisadas neste trabalho foram incluídas na chave com informações disponíveis na literatura (Peralta, 1998; Richardson, 1969)

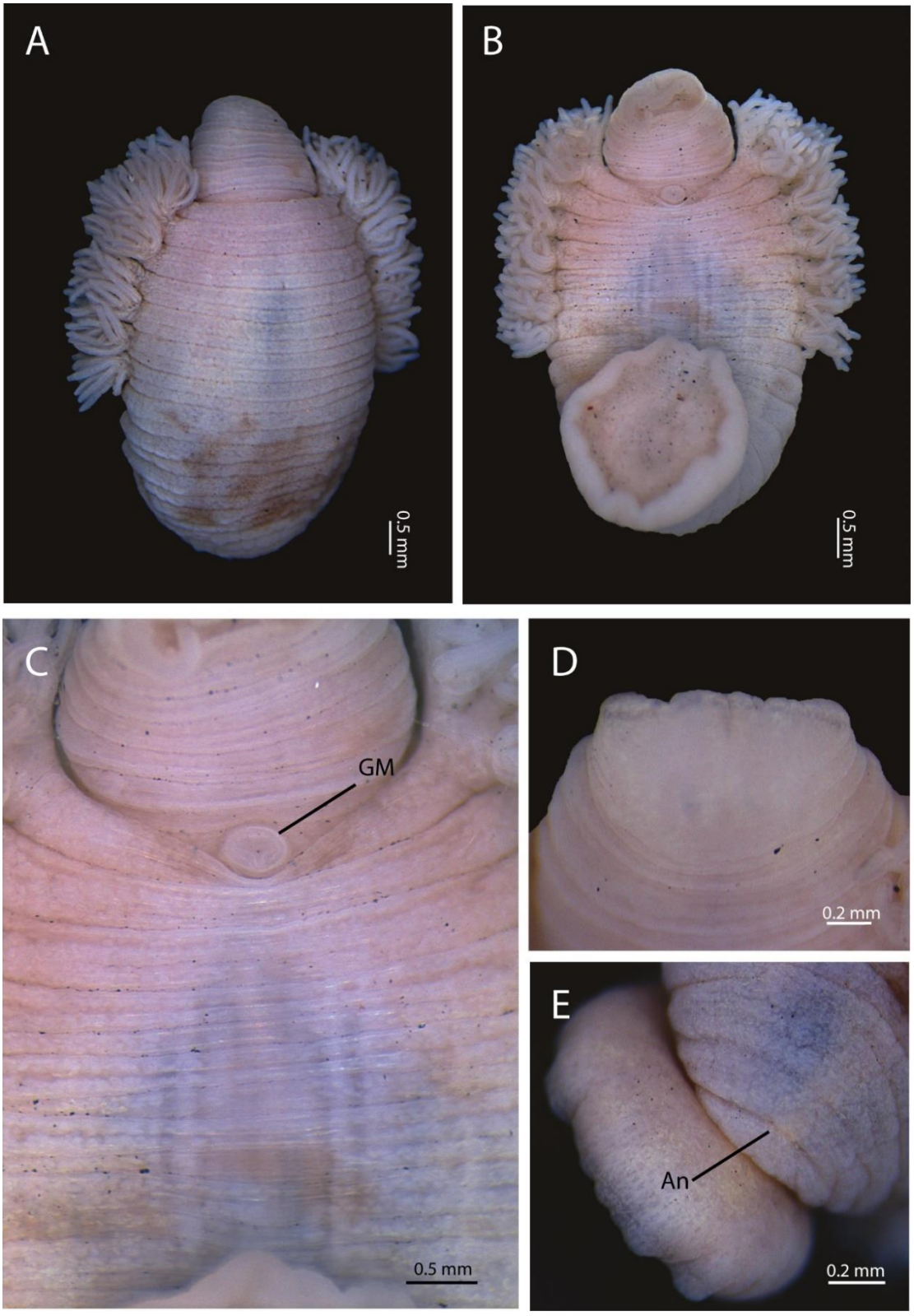
[17] Parasitas de quelônios de água doce.

(segmentos I-XII) e urossomo (segmentos XIII-XXVII) (figuras 47A e 47B), ventosa posterior bem desenvolvida, terminal, largura máxima 1-4 mm.

Morfologia externa: corpo uniformemente amarelado, sem padrões de pigmentação; ocelos ausentes (figura 50D); poro bucal na região central da ventosa; 5 fileiras longitudinais de tubérculos no dorso de (a1+a2) (figura 51C), 1 fileira mediana, na porção posterior do anel, 1 par paramediano, 1 par paramarginal; 1 par fileiras longitudinais de tubérculos paramarginais no dorso de a3; gonóporos separados por 4 anéis (figura 50C), masculino em XII (a1+a2)/a3, feminino em XIV (a1+a2)/a3; 7 pares de brânquias com ramificações terciárias, base secundária segmentada (figura 50A), primeiro par em XIII, último em XIX; ânus em XXVI/XVII (figura 50E), seguido por 1 anel pós anal; segmentos I-V unianulados; segmentos V-XXVI: bianulados, [(a1+a2)>(a3)], em ambas as faces.

Morfologia interna: faringe reta, sem curva na base, esta em XII, bulbo faríngeo ausente; 2 pares de glândulas salivares compactas alongadas em XI (figura 51A), conectados diretamente à base da faringe, par anterior de XI-VIII, par posterior de XI-IX/X; 8 pares de cecos gástricos (figura 51A), pares 1-4 dispostos horizontalmente, pares 5-7 dispostos verticalmente, último par formando trajeto descendente; 4 pares de cecos intestinais; sistema reprodutor masculino formado por um bulbo ejaculatório anterior ao gânglio XII; ducto genital masculino estendendo-se de XI-XII; ductos ejaculatórios estendendo-se de XVI-XI/XII (figura 51B), 4 pares de sacos testiculares (figura 51A), primeiro par em XV, último em XVIII/XIX; ovários simples, sem ramificações, base em forma de “V” ao redor do ducto genital

Figura 50. *Ozobranchus* cf*. branchiatus*. A. Vista dorsal. B. Vista ventral. C. Região genital, vista ventral. D. Região da cabeça, vista dorsal. E. Região posterior, vista dorsal. An: ânus; GM: gonóporo masculino.

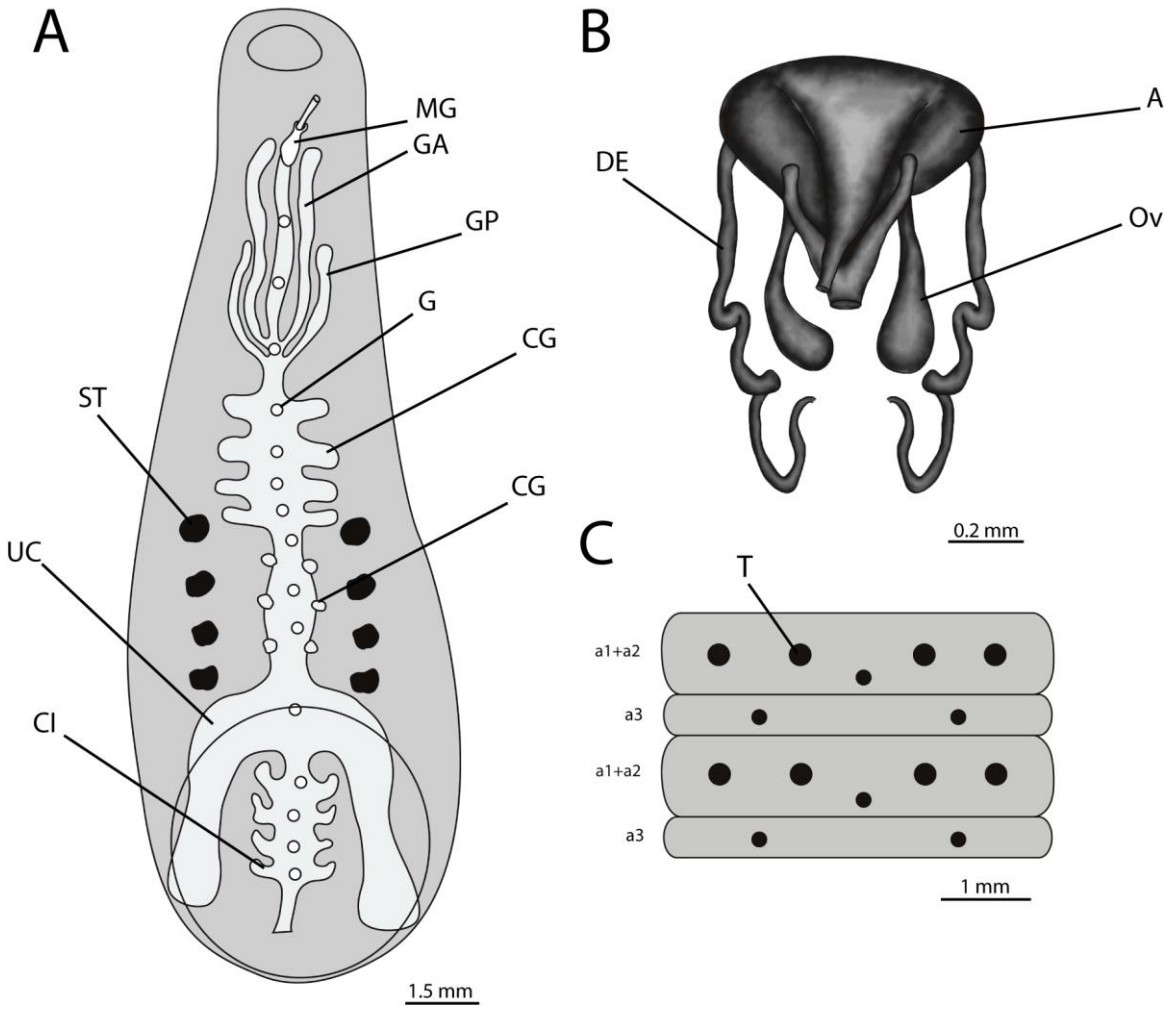


Fonte: próprio autor

Comentários: O gênero *Ozobranchus* é comumente encontrado parasitando tartarugas marinhas e conta com apenas três espécies conhecidas, das quais *O. margoi* (Apáthy, 1890) é a única com registro formal para a costa brasileira (Rodenbush et al., 2012). Contudo, membros desta espécie apresentam apenas cinco pares de brânquias, enquanto os de *O.* cf*. branchiatus* possuem sete pares, embora poucos caracteres internos desta última espécie sejam conhecidos, para comparação. *Ozobranchus jantseanus* Oka, 1912 também carece de descrições dos caracteres internos, e seus membros são diferenciados daqueles das demais espécies do grupo por apresentarem 11 pares de brânquias (Oka, 1912).

O material estudado foi identificado como *O.* cf. *branchiatus*, por apresentar 7 pares de brânquias. Membros desta espécie foram descritos internamente por Richardson (1969b), contudo esta descrição carece de detalhes importantes sobre os sistemas digestório e reprodutor, impossibilitando qualquer comparação. Os exemplares examinados para este estudo apresentam morfologia externa compatível com as demais descrições de *O. branchiatus* disponíveis na literatura (Oka, 1912; Ringuelet, 1944, 1985; Sawyer, 1986), mas o material ora estudado foi identificado como *O.* cf. *branchiatus*, pela falta de informações sobre a morfologia interna dos animais pertencentes àquela espécie.

Figura 51. Esquemas da morfologia de *Ozobranchus.* cf*. branchiatus*. A. Morfologia interna geral, vista ventral, brânquias e sistemas reprodutores masculino e feminino omitidos. B. Detalhe dos sistemas reprodutores masculino e feminino. C. Segmentos da região mediana do corpo, vista dorsal. A: átrio; CG: cecos gástricos; CI: cecos intestinais; DE: ductos ejaculatórios; G: gânglios; GA: glândulas salivares anteriores; GP: glândulas salivares posteriores; MG: massa ganglionar; Ov: ovários; ST: sacos testiculares; T: tubérculos; UC: último par de cecos gástricos.



Fonte: próprio autor

4. Discussções

4.1. Microtomografia computadorizada e Microscopia eletrônica de Varredura

A microtomografia computadorizada e outras técnicas de imagens digitais têm ganhado espaço na taxonomia e outras áreas das Ciências Biológicas, devido a três aspectos principais: 1) alta diferenciação tecidual e possível análise tridimensional dos dados; 2) publicação online dos dados em bancos de dados internacionais; 3) alta variedade de formas publicação das análises (ex. fotos 2D, modelos 3D, vídeos e etc). Estes três aspectos da tomografia computadorizada, culminaram na criação de um novo conceito de material denominado cybertipo, que tem ganhado atenção nos últimos anos. Vários grupos já contam com cybertipos, incluindo miriápodes, hirudíneos e turbelários (Akkari et al., 2015; Carbayo et al., 2016; Tessler et. al. 2016) e uma grande variedade de táxons já tiveram membros estudados a partir de técnicas de imagens tridimensionais, mas não cumprem os quesitos necessários para serem considerados cybertipos, conforme estabelecido por Faulwetter et al. (2013) (ex. Fernández et al., 2014; Landschoff et al., 2015; Steinhoff & Uhl, 2015). Estes autores estabeleceram que, para uma base de dados ser considerada como um cybertipo, esta deve cumprir pelo menos três principais critérios: (a) fornecer informações sobre a morfologia interna e externa com a mesma confiança e acurácia que os espécimes reais; (b) deve representar um espécime real que pertença ao material tipo; e (c) deve ter fácil acesso através de meios de publicação digitais (Faulwetter et al., 2013).

Porém, estes critérios são difíceis de serem cumpridos, por problemas metodológicos, de acesso ao tomógrafo e econômicos. A maioria dos contrastes utilizados na microtomografia gera deformação dos tecidos moles, em diferentes níveis. Segundo Vickerton et al. (2013), o iodo pode gerar até cerca de 70% de contração de tecidos moles, alterando traços da morfologia original do material examinado. Outra dificuldade é o acesso ao tomógrafo, que ainda é pouco acessível no Brasil; o pequeno número de sessões gera uma necessidade de escolha de regiões específicas de escaneamento, já que o estudo do animal inteiro pode requerer mais de um escaneamento. Apesar da necessidade de aplicação de algum tipo de reagente de contraste em espécies de corpo exclusivamente mole, este não é um empecilho para que o segundo critério seja alcançado, já que as técnicas húmidas

mais utilizadas não alteram o espécime ou podem ser lavadas quase completamente, como acontece com as técnicas baseadas no iodo (Metscher, 2009a, b). Além disso, há evidências de que a tomografia em si não gera danos ao DNA dos espécimes estudados (Hall et al., 2015; Peredes et al., 2012).

A publicação dos dados em base de dados online tem crescido com iniciativas como a do Giga Science, uma revista que permite a publicação de “Big Data” em qualquer formato, que atende os requisitos estabelecidos por Faulwetter et al. (2013) de publicação. Pelo menos dois cybertipos foram publicados nesta revista e estão disponíveis para consulta (Carbayo & Lenihan, 2016; Landschoff et al., 2015).

Apenas dois estudos utilizaram o µCT para a análise da morfologia de sanguessugas, assim ainda é difícil estabelecer as perspectivas que esta técnica pode trazer a taxonomia do grupo. Iwama e Arruda (2016) usaram a tomografia para descrever duas novas espécies de *Helobdella*, um grupo de sanguessugas cujos exemplares são geralmente diminutos e de difícil dissecção. Tessler et al. (2016) descreveram *Ctnobdella tanae* Tessler, Barrio, Borda, Rood-Goldman, Hill & Siddall, 2016 (uma espécie de Haemadipsidae) exclusivamente por tomografia, eliminando muitas dúvidas acerca da morfologia deste grupo, que carece de descrições anatômicas devido ao pequeno tamanho dos indivíduos. Em ambos os estudos, os principais órgãos internos utilizados para a taxonomia do grupo foram diferenciados, porém não foi descrito nenhum novo caractere, provavelmente devido à falta de dados de outras espécies para comparação. Outra possibilidade é a combinação de trabalhos envolvendo µCT com histologia, como em Hawe et al. (2013), onde cortes histológicos seriados foram utilizados para construir um modelo tridimensional da anatomia de um gastrópode límnico. No caso particular de sanguessugas, a técnica permite um exame mais detalhado dos ductos ejaculatórios e do sistema celômico, que, apesar de estarem bem diferenciados nos escaneamentos realizados neste estudo, ainda apresentam regiões específicas onde seus limites são dúbios.

Além das dificuldades inatas à técnica, durante o tratamento dos dados foram encontradas diversas dificuldades relacionadas ao tamanho e a quantidade de dados gerados, uma característica de qualquer base classificada como “Big Data” (Chen & Zhang, 2014). Para lidar com estes problemas, vários softwares já estão presentes no mercado, porém a altíssimo custo e requerendo alto poder computacional (ex. AMIRA, VG Max Studio) (Abel et al., 2012). Uma série de softwares gratuitos ou em formato aberto também já está disponível, como o ImageJ ou Seg3D. Contudo, seus

recursos são limitados em relação aos softwares fechados ou são de difícil uso, já que requerem um nível de proficiência alto em programação. Chen e Zhang (2014) destacaram a importância do desenvolvimento de novas formas de tratamento e análise de “Big Data” e reforçaram que, caso não haja este desenvolvimento, este tipo de dados acabará sendo inútil ou, pelo menos, subexplorado. No caso dos dados de µCT pode ser considerado que esta tecnologia está sendo subexplorada, já que a maioria dos estudos em taxonomia envolvendo a técnica busca apenas a comunicação por meio da imagem dos espécimes descritos e usa caracteres tradicionais na delimitação dos táxons, enquanto poucos estudos visam a busca por de novos caracteres ou novas formas de análise dos dados.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) produziu bons resultados ao diferenciar as estruturas de ornamentação do tegumento entre diferentes espécies e grupos. As presenças de cílios ou ornamentações dos próprios tubérculos apresentaram variação significativa entre as espécies de *Haementeria* estudadas, mas se mantiveram consistentes entre as espécies de *Pacobdella.* A presença de cílios em estruturas de ornamentação é extremamente comum dentre os hirudíneos e pode estar relacionada à detecção de movimentos da água ao redor do animal (Phillips & Friesen, 1982). Elliott (1987) apresentou resultados semelhantes ao estudar o tegumento de *Hirudo medicinalis*, onde dois principais tipos de estruturas foram identificados, as sensilas labiais pequenas e grandes.

A clássica diferenciação entre os tipos de ornamentação não foi observada, não tendo sido possível diferenciar papilas, tubérculos e sensilas, que são tradicionalmente descritas para quase todos os grupos de hirudíneos. Desta forma, optou-se pela utilização apenas do termo “tubérculo”, já que não foi verificada qualquer diferença externa entre as estruturas apontadas na literatura. Este termo foi escolhido, pois se diferencia das estruturas descritas por Elliott (1987), as sensilas, tradicionalmente consideradas como órgãos sensoriais e sempre localizadas nos anéis a2, correspondendo à localização dos gânglios nervosos ventrais nos segmentos. Os tubérculos observados neste estudo, apesar de apresentarem padrão metamérico, normalmente não estão restritos ao anel a2.

4.2. *Haementeria*

O gênero *Haementeria* foi descrito por De Filippi (1849) para acomodar a espécie *H. ghilianii* Filippi, 1849. Desde então, sofreu diversas modificações em sua diagnose para que a diversidade de glossifonídeos parasitas da América do Sul acabasse quase toda alocada neste gênero. Contudo, alguns caracteres ganharam mais atenção do que outros na diagnose de membros deste gênero, como, por exemplo, a localização dos gonóporos, fórmula dos segmentos [(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)], presença de dois pares de glândulas salivares compactas, e de órgãos esofágicos, estes esféricos e conectados por ductos ao esôfago (Pinto, 1923; Ringuelet, 1980; 1985; Souza, 1978). Contudo, são encontradas muitas variações destes caracteres e alguns também podem ser observados em membros de espécies do gênero *Placobdella*. Oceguera-Figueroa (2012) propõe que a maioria dos caracteres tradicionais para a diagnose do gênero seja abandonada, sugerindo outros, como o anel ao redor do cordão nervoso ventral, formado na base do ovário, os órgãos esofágicos esféricos e as glândulas salivares compactas. Desta forma, todas as espécies bianuladas da América do Sul poderiam ser inclusas em *Haementeria.*

Outro problema é a utilização de caracteres externos para delimitar espécies, que foi praticamente baseada na posição dos tubérculos dorsais e dos órgãos de Lang (Souza, 1978; Ringuelet, 1980; Weber, 1915). A princípio, estes caracteres são válidos para tal finalidade, porém, após a análise de um número significativos de espécimes, chega-se à conclusão de que há grande variação intraespecífica em relação aos mesmos e uma sobreposição de padrões entre as espécies do gênero. Portanto, neste trabalho deu-se preferência a caracteres anatômicos, tais como a morfologia do sistema reprodutor masculino e do complexo salivar.

Há uma forte incongruência em relação à composição de espécies de *Haementeria*. Segundo Ringuelet (1985) e Sawyer (1986), respectivamente, há oito ou nove espécies válidas. Desde então, apenas duas espécies da América do Norte foram descritas, por Oceguera-Figueroa (2007, 2008), que menciona um total de 10 espécies, mas não oferece nenhuma listagem das mesmas. Já Christoffersen (2007), em um Checklist mais detalhado da hirudofauna da América do Sul, apresenta uma lista com um total de 16 espécies formalmente incluídas neste gênero, com ocorrência

confirmada para o continente. Esta diferença se deve a um grande número das espécies descritas por Weber (1915) serem consideradas válidas apenas por parte dos autores.

4.3. Oligobdella

O gênero *Oligobdella* foi descrito por Moore (1918), para acomodar espécies americanas e asiáticas de glossifonídeos com segmentos bianulados, na região mediana do corpo. Posteriormente, Sawyer (1986) agrupou todas as espécies asiáticas no gênero *Torix,* deixando as americanas em *Oligobdella,* que foi posteriormente desmembrado, quando *O. biannulata* (Moore, 1900), a espécie tipo do gênero, foi transferida para *Placobdella* Blanchard, 1893 (Siddall et al., 2005). Baseado em dados moleculares e morfológicos, porém analisando somente uma espécie sul-americana, Oceguera-Figueroa (2012) transferiu *O. brasiliensis* para *Haementeria,* já que em sua análise filogenética esta espécie diverge das demais do gênero na base do clado. As demais espécies, no entanto, continuam alocadas em *Placobdella,* mas deveriam ser formalmente transferidas para *Haementeria*, ou alocadas em um novo gênero, levando-se em consideração as suas descrições morfológicas. Neste trabalho, recomenda-se a segunda opção, já que a definição de *Haementeria* proposta por Oceguera-Figueroa (2012) é ampla o suficiente para abrigar quase todas as espécies parasitas de Glossiphoniidae da América do Sul, perdendo-se muito do poder explicativo inerente ao sistema lineano (Fitzhugh, 2008; Giribet et al., 2016). Contudo, não serão feitas modificações formais neste momento, já que não foram examinados exemplares tipo, devido à dificuldade de acesso a este material ou à falta de informações sobre o local de depósito, ou mesmo se este ocorreu.

A transferência de *O. brasiliensis* para o gênero *Haementeria* poderia gerar, também, um problema de sinonímia, já que *Haementeria brasiliensis* (Weber, 1915) é considerada válida por alguns autores (Christoffersen, 2007), ainda que o trabalho de Weber (1915) não cumpra as exigências de publicação formal exigidos pelo Código de Nomenclatura Zoológica.

4.4. Ocorrências de *Placobdella* na América do Sul

São muitas as ocorrências de *Placobdella* na América do Sul, e Ringuelet (1985), em sua monografia sobre a hirudofauna sul-americana, lista três espécies do gênero. Mais recentemente, Christoffersen (2007) considera quatro espécies deste grupo no continente. Contudo, os conceitos de *Placobdella* utilizados pelos dois autores são obviamente diferentes, enquanto Ringuelet (1985) alocava no gênero apenas as espécies de Glossiphoniidae com segmentos do meio do corpo compostos por três anéis, o segundo autor inclui, também, as espécies de *Oligobdella*, após a sinonímia entre os dois gêneros, proposta por Siddall et al. (2005).

Uma das espécies atualmente alocadas neste gênero que merece destaque é *P. bistriata* (Pinto, 1920b), originalmente descrita em *Trachybdella* Pinto, 1920b. Esta espécie possui sete fileiras longitudinais de tubérculos em todos os anéis primários e cerca de seis fileiras longitudinais de tubérculos de menor tamanho no dorso, segmentos da região mediana do corpo compostos por três anéis, sete pares de cecos gástricos, o último par dos quais com trajeto descendente, formando lobos secundários. Esta descrição feita por Pinto (1920b; 1923) é muito semelhante à das espécies de *Placobdella* da América do Norte, principalmente pelos lobos secundários formados a partir do último par de cecos gástricos. Seguindo este pensamento, Cordero (1936) transferiu a espécie para este gênero, sem qualquer análise da anatomia. Ainda hoje, pouco se sabe sobre a morfologia interna desta e das outras espécies sul-americanas alocadas em *Placobdella*. Contudo, Ringuelet (1944, 1985) após ter analisado exemplares depositados no Museu de História Natural de Montevideo, descreveu a presença de dois pares de órgãos esofágicos como uma característica marcante de *Haementeria*.

As outras espécies trianuladas do gênero são muito semelhantes às descrições de *P. bistriata*, assim como à descrição de *P.* sp. 1 fornecida acima. Entretanto, membros desta última espécie e daquela identificada como *P. maculata* apresentam glândulas salivares difusas, uma característica que não é encontrada em nenhum dos demais membros de *Placobdella* e *Haementeria* (Oceguera-Figueroa, 2012). A presença de glândulas salivares difusas e a fórmula dos segmentos sugerem que estas espécies sejam alocadas em um gênero à parte dos demais glossifonídeos sul-americanos, caso os membros destas espécies formem um clado monofilético

externo aos táxons válidos atualmente. Neste caso, o nome *Trachybdella* poderia ser adotado, já que sua diagnose permite que todas as espécies trianuladas e com glândulas salivares difusas sejam alocadas neste táxon.

5. Considerações finais

O táxon Hirudinea é um grupo extremamente pouco estudado, especialmente na América do Sul. A pequena quantidade histórica de especialistas no grupo residentes no continente gerou um déficit de conhecimento e diversos problemas taxonômicos, já que a maior parte do material coletado aqui foi levada para museus estrangeiros e nunca foi devidamente catalogada. Este estudo, tenta encontrar maneiras apropriadas de lidar com este problema.

Foram encontrados no território brasileiro animais pertencentes a 7 espécies não descritas, quatro delas da região do Pantanal Matogrossense, que até recentemente não possuía qualquer registro de membros de hirudíneos. Contudo, ainda há muito a se descrever da hirudofauna brasileira e sul-americana, já que quase todos os registros deste grupo estão concentrados em regiões de grandes centros urbanos das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do país.

Várias questões taxonômicas foram levantadas durante a execução deste trabalho, muitas delas acerca da validade dos gêneros e espécies estudadas. Para abordar estes problemas de forma mais embasada, devem ser feitas análises dos exemplares tipo, uma prática pouco difundida dentre os especialistas no grupo. Grandes coleções, onde uma análise mais cuidadosa pode contribuir significativamente para o melhor conhecimento da taxonomia do grupo, são as coleções do Museo de la Plata e o Museo Nacional de História Natural de Montevideo, onde está depositada a maior parte do material examinado por Raul A. Ringuelet e Ergasto H. Cordero. Estas coleções deverão ser revistas e fornecidas redescrições para as espécies descritas por aqueles autores, e também deverão ser feitas mais coletas, para obter espécimes frescos, que poderão ser empregados para vincular sequencias de DNA a estes táxons.

6. Referências

ABDALLAH, V. D.; AZEVEDO, R. K.; LUQUE, J. L. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos do tamboatá Hoplosternum littorale (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae) do rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 413–419, 2006.

ABEL, R. L.; LAURINI, C. R.; RICHTER, M. A palaeobiologist's guide to "virtual" micro-CT preparation. **Palaeontologia Electronica**, v. 15, n. 2, p. 496–500, 2012.

AKKARI, N.; ENGHOFF, H.; METSCHER, B. D. A New Dimension in Documenting New Species: High-Detail Imaging for Myriapod Taxonomy and First 3D Cybertype of a New Millipede Species (Diplopoda, Julida, Julidae). **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–25, 2015.

APAKUPAKUL, K.; SIDDALL, M. E.; BURRESON, E. M. Higher Level Relationships of Leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) Based on Morphology and Gene Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 350–359, 1999.

ÁVIDA-GOULART, A. D. A hirudifauna do município de Porto Alegre (estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ilheringia**, v. 29, p. 1–8, 1963.

ÁVIDA-GOULART, A. D. Presença de Helobdella obscura Ringuelet, 1942 e Helobdella duplicata var. tuberculata Ringuelet, 1958, no Rio Grande do Sul, Brasil. **Heringia**, v. 35, p. 3–5, 1967.

AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D.; LUQUE, J. L. Ecologia de comunidade de metozoários parasitos do apaiarí, Astronotus ocellatus (Cope, 1872) (Perciformes: Cichlidae) do Rio Guandu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 15–20, 2007.

BADHAM, C. On an Ichthyobdellid parasitic on the Australian Sand Whiting (Sillago ciliata). **Quartely Journal of Microscopical Science**, v. 62, p. 3–37, 1916.

BLANCHARD, R. Courtes noticies sur les Hirudinées: IX. Hirudinées de l'Europe boréale. **Bulletin de la Société zoologique de France**, v. 18, p. 92–98, 1893.

BLANCHARD, E. Annulares. In GAY, C. **Historia fisica e politica de Chile,** Paris, v. 3, p. 43-50, 1849.

BLENDER. Disponível em: <https://www.blender.org/>. Acesso em: 17 ago. 2017.

BORDA, E.; SIDDALL, M. E. Review of the evolution of life history strategies and phylogeny of the Hirudinida (Annelida: Oligochaeta). **Lauterbonia**, v. 55, p. 5–25, 2004.

BRITES, V. L. C.; RANTIN, F. T. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freswater turtles, Phrynops geoffroanus, taken from two areas of the Uberabinha River. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 96, p. 273–281, 2004.

BRUKER. Disponível em: <https://www.bruker.com/pt/products/microtomography/micro-ct-for-sample-scanning/realistic-visualization-by-volume-rendering.html>. Acesso em: 17 ago. 2017.

BURRESON, E. M. A New Marine Leech Austrobdella californiana n. sp. (Hirudinea: Piscicolidae) from Southern California Flatfishes. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 96, n. 2, p. 263–267, 1977.

CARBAYO, F.; FRANCOY, T. M.; GIRIBET, G. Non-destructive imaging to describe a new species of Obama land planarian (Platyhelminthes, Tricladida). **Zoologica Scripta**, 2016.

CARBAYO, F.; LENIHAN, J. Micro-computed tomography scan and virtual histological slide data for the land planarian Obama otavioi (Platyhelminthes). **Giga Science**, v. 5, n. 13, p. 1–7, 2016.

CASTLE, W. E. Some North American fresh-water Rhynchobdellidae, and their parasites. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v. 36, n. 2, p. 18–64, 1900.

CASTRO, O. F. Sôbre Hirudíneos no Brasil. **Revista de Ciências da Faculdade de Ciências e Letras de Votuporanga**, v. 1, p. 1-69, 1971.

CENTER FOR INTEGRATIVE BIOMEDICAL COMPUTER, UNIVERSIT OF UTAH. Disponível em: <http://www.sci.utah.edu/cibc-software/seg3d.html>. Acesso em: 17 ago. 2017.

CHEN, C. L.; ZHANG, C. Y. Data-intensive applications, challenges, techniques and technologies: A survey on Big Data. **Information Sciences**, v. 275, p. 314–347, 2014.

CHRISTOFFERSEN, M. L. Clitellate evolution and leech diversity: Glossiphoniidae excl. Helobdella (Annelida: Hiridinea: Rhyncobdellida) from South America. **Gaia Scientia**, v. 1, n. 2, p. 131–140, 2007.

CHRISTOFFERSEN, M. L. A. Catalogue of the Pscicolidae, Ozobranchidae, and Arhyncobdellida (Annelida, Clitellata, Hirudinea) from South America. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, n. 1, p. 39–48, 2008.

CHRISTOFFERSEN, M. L. A. catalogue of Helobdella (Annelida, Clitellata, Hirudinea, Glossiphoniidae), with a summary of leech diversity, from South America. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 2, p. 89–98, 2009.

CÔNSOLI, R. A. G. B.; GUIMARÃES, T. C.; SOUZA, C. P.; SANTOS, B. S. Atividade predatória de Helobdella triserialis lineata (Hirudinea: Glossiphonidae) sobre formas imaturas de Aedes fluviatilise Culexquinquefasciatus (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Revista Saúde Pública**, v. 18, p. 359–366, 1984.

CORDERO, R. H. Los Hirudíneos del nordeste del Brasil. **Annaes da Academia Brasileira de Sciencias**, v. 9, p. 1–26, 1937a.

CORDERO, R. H. Hirudíneos neotropicales y subantárticos nuevos, críticos o ya conocidos del Museo Argentino de Ciencias Naturales. **Anales del Museo Argentino de Ciencias Naturales**, v. 29, p. 1–77, 1937.

CORDERO, R. H. Revisón de los típos de hirudíneos brasileiros descriptos por Cesar Pinto en 1920. **Annaes da Academia Brasileira de Sciencias**, v. 8, n. 3, p. 221–231, 1936.

DAVIES, R. W.; GOVEDICH, F. R. Annelida: Euhirudinea and Acanthobdellidae. In: Thorp, J. H.; Covich, A. P. **Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates**, San Diego: Academic Press, 2001, p. 465-504.

DE FILIPPI, F. Sopra un nuovo genere (Hirudinea) di Annelidi dela famiglia delle Sanguisughe. **Memorie della Reale accademia delle scienze di Torino**, v. 10, p. 391–402, 1849.

DEROSA, Y. S.; FRIESEN, O. W. Morphology of leech sensilla: observarions with the scanning electron microscope. **Biology Bulletins**, v. 160, p. 383–393, 1981.

DESCAMPS, E. SOCHACKA, A.; KEGEL B. D.; LOO, D. V.; HOOREBEKE, L. V.; ADRIAENS, D. Soft tissue discrimination with contrast agents using micro-CT scanning. **Belgian Journal of Zoology**, v. 144, n. 1, p. 20–40, 2014.

ELLIOT, M.; KUTSCHERA, U. Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation. v. 4, p. 21–41, 2011.

ELLIOTT, E. J. Morphology of chemosensory organs required for feeding in the leech Hirudo medicinalis. **Journal of Morphology**, v. 192, p. 181–187, 1987.

FARIA, F.; KELEN E. M. A; SAMPAIO, C. A. M.; BOM, C.; DUVAL, N. CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A New Factor Xa Inhibitor (Lefaxin) from the Haementeria depressa Leech. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 1469–1473, 1999.

FAULWETTER, S. VASILEIADOU, A.; KOURATORAS, M.; DAILIANIS, T.; ARVANITIDIS, C. Micro-computed tomography: Introducing new dimensions to taxonomy. **Zookeys**, v. 263, p. 1–45, 2013.

FEI. Disponível em : <https://www.fei.com/software/amira-3d-for-life-sciences/>. Acesso em: 17 ago. 2017.

FERNÁNDEZ, R.; KVIST, S.; LENIHAN, J.; GIRIBET, G.; ZIEGLER, A. Sine Systemate Chaos? A Versatile Tool for Earthworm Taxonomy: Non-Destructive Imaging of Freshly Fixed and Museum Specimens Using Micro-Computed Tomography. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2014.

FITZHUGH, K. Abductive Inference: Implications for “Linnean” and “Phylogenetic” Approaches for Representing Biological Systematization. **Evolutionary Biology**, v. 35, p. 52–82, 2008.

FURINESS, S.; WILLIAMS, J.I.; NAGASAWA, K.; BURRESON, E. M. A collection of fish leeches (Hirudinida: Piscicolidae) from Japan and surrounding waters, including redescriptions of three species. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 875–883, 2007.

GELDER, S. R.; SIDDALL, M. E. Phylogenetic assessment of the Branchiobdellidae (Annelida, Clitellata) using 18S rDNA, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I and morphological characters. **Zoologica Scripta**, v. 30, n. 3, p. 215–222, 2001.

GIRIBET, G.; HORMIGA, G.; EDGECOMBE, G. D. The meaning of categorical ranks in evolutionary biology. **Organisms, Diversity & Evolution**, v. 16, n. 3, p. 427–430, 2016.

GOLDMAN, L. W. Principles of CT and CT Technology. **Journal of Nuclear Medicine Technology**, v. 35, n. 3, p. 115–128, 2007.

GRAHAM, S. P.; BORDA, E. First Report of Leech Parasitism in the Amphibian Family Sirenidae. **Comparative Parasitology**, v. 77, n. 1, p. 105–107, 2010.

GRATIOLET, P. Recherches sur l'organisation du système vasculaire dans la sangsue médicinale et l'aulastome vorace. **Annales des Sciences Naturalles (Zoologia)**. v. 17, p. 174-225, 1862.

GRUBE, A. E. Beschreibungen einiger Egelarten.**Archiv für Naturgeschichte**, v. 37, p. 87-121, 1871.

GUIMARÃES, C. T.; SOUZA, C. P.; CONSOLI, R. A. G. B.; SOARES, D. M. Controle biológico: Helobdella triserialis lineata (Hirudinea: Glossiphonidae) sobre Biomphalaria tenagophila (Mollusca: Planorbidae), em laboratório. **Revista Saúde Pública**, v. 18, p. 476–486, 1984.

HALL, A.; SHERLOCK, E.; SYKES, D. Does Micro-CT scanning damage DNA in museum specimens? **Journal of Natural Science Collections**, v. 2, p. 22–28, 2015.

HAWE, A.; HEB, M.; HASZPRUNAR, G. 3D reconstruction of the Anatomy of the ovoviviparous (?) freshwater gastropod Borysthenia naticina (Menke, 1845) (Ectobranchia: Valvatidae). **Journal of Molluscan Studies**, v. 79, n. 3, p. 191–204, 2013.

HOUNSFIELD, G. N. Computerized transverse axial scanning (tomography): Part I. Description of system. **British Journal of Radiology**, v. 46, p. 1016–1022, 1973.

IMAGEJ. Disponível em: <https://imagej.net/>. Acesso em: 17 ago. 2017.

IWAMA, R. E.; ARRUDA, E. P. Leeches of the genus Helobdella (Clitellata: Hirudinida) from São Paulo, Brazil with descriptions of two new species using micro-computed tomography and a new record of Barbronia weberi (Blanchard 1897). **Zootaxa**, v. 4144, n. 3, p. 411–429, 2016.

IWAMA, R. E.; NOGUEIRA, J. M. M.; GONÇALVES, A. Z. Helobdella buzz n. sp. (Clitellata: Hirudinida), a bromeliad leech from the Brazilian Atlantic Forest. **Zootaxa**, v. 4272, n. 2, p. 591–595, 2017.

KOPERSKI, P. Testing the suitability of leeches (Hirudinea, Clitellata) for biological assessment of lowland streams. **Polish Journal of Ecology**, v. 53, n. 1, p. 65–80, 2005.

LANDSCHOFF, J.; PLESSIS, A. D.; GRIFFITHS, C. L. A dataset describing brooding in three species of South African brittle stars, comprising seven high-resolution, micro X-ray computed tomography scans Jannes Landschoff1*,. **Giga Science**, v. 4, n. 52, p. 1–3, 2015.

LEMOS, J. R. G.; TAVARES-DIAS, M.; SALES, R. S. A.; NOBRE-FILHO, G. R.; FIM, J. D. I. Parasitos nas brânquias de Brycon amazonicus (Characidae, Bryconinae) cultivados em canais de igarapé do Turumã-Mirim, Estado do Amazonas, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 217–222, 2007.

LLEWELLYN, L. C. Pontobdellinae (Piscicolidae: Hirudineea) in the British Museum (Natural History) with a review of the subfamily. **Bulletin of the British Museum (Natural History)**, v. 14, p. 392–39, 1966.

MARTIN, P. On the origin of the Hirudinea and the demise of the Oligochaeta. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 268, p. 1089–1098, 2001.

METSCHER, B. D. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. **BMC Physiology**, v. 9, n. 11, p. 1–14, 2009b.

METSCHER, B. D. MicroCT for Developmental Biology: A Versatile Tool for High-Contrast 3D Imaging at Histological Resolutions. **Developmental Dynamics**, v. 238, p. 632–640, 2009a.

MIZUTANI, R.; SUZUTKI, Y. X-ray microtomography in biology. **Micron**, v. 43, p. 104–115, 2012.

MOORE, J. P. The leeches of the U. S. National Museum. **Proceedings of the U. S. National Museum**, v. 21, n. 1160, p. 543–563, 1899.

MOORE, J. P. A description of Microbdella biannulata with special regard to the constitution of the leech somite. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 52, p. 50–74, 1900.

MOORE, J. P. The leeches. In: **Fresh-water Biology**. New York: Wiley, 1918. p. 646–660.

MOORE, J. P. Austrobdella anoculata, a new species of fish leech from Greenland. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, v. 30, p. 520–524, 1940.

NAKANO, T.; RAMLAH, Z.; HIKIDA, T. Phylogenetic position of gastrostomobdellid leeches (Hirudinida, Arhynchobdellida, Erpobdelliformes) and a new family for the genus Orobdella. **Zoologica Scripta**, v. 41, n. 2, p. 177–185, 2011.

OCEGUERA-FIGUEROA, A. Especie nueva de sanguijuela del género Helobdella (Rhyncobdellida: Glossiphoniidae) del Lago de Catemaco, Veracruz, México. **Information Sciences**, v. 23, n. 1, p. 15–22, 2007.

OCEGUERA-FIGUEROA, A. A New Glossiphoniid Leech from Catemaco Lake, Veracruz, México. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 2, p. 375–380, 2008.

OCEGUERA-FIGUEROA, A. Molecular phylogeny of the New World bloodfeeding leeches of the genus Haementeria and reconsideration of the biannulate genus Oligobdella. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, p. 508–514, 2012.

OCEGUERA-FIGUEROA, A. MANZANO-MARÍN, A.; KVIST, S.; MOYA, A.; SIDDALL, M. E.; LATORRE, A. Comparative Mitogenomics of Leeches (Annelida: Clitellata): Genome Conservation and Placobdella-Specific trnD Gene Duplication. **PLoS ONE**, v. 11, n. 15, p. 1–16, 2016.

OKA, A. Pijawki pozaeuropejskie Panstwowego Muzeum Zoologicznego. **Annaçes Musei Zoologici Polonici**, v. 9, n. 20, p. 313–329, 1932.

PATTERSON, G. L. J.; SYKES, D.; FAULWETTER, S.; MERK, R.; AHMED, F.; HAWKINS, L. E.; DINLEY, J.; BALL, A. D.; ARVANITIDIS, C. The pros and cons of using micro-computed tomography in gross and microanatomical assessments of polychaetous annelids. **Memoirs of Museum Victoria**, v. 71, p. 237–246, 2014.

PERALTA, A. S. L. **Morfologia e Taxonomia de Unoculubranchiobdella expansa (Hirudinea: Ozobranchidae) parasito de Podocnemis expansa (Shwaigger, 1812) (Chelonia: Pelomedusidae) da amazônia**. Dissertação de Mestrado—Seropédica, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, 1998.

PAREDES, U. M. PRYS-JONES, R.; ADAMS, M.; GROOMBRIDGE, J.; KUNDU, S.; AGAPOW, P. M.; ABEL, R. L. Micro-CT X-rays do not fragment DNA in preserved bird skins. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 50, n. 3, p. 247–250, 2012.

PHILLIPS, C. E.; FRIESEN, O. W. Ultraestructure of the water-movement-sensitive sensilla in the medicinal leech. **Journal of Neurobiology**, v. 13, n. 6, p. 473–486, 1982.

PINTO, C. Constribuição ao Estudo dos Hirudineos I. **Brazil-Medico**, v. 34, n. 38, p. 624–626, 1920b.

PINTO, C. Contribuição ao estudo dos Hirudíneos do Brasil (Haementeria lutzi, nov. sp.). **Brazil-Medico,** v. 34, n. 35, p. 567-570, 1920a.

PINTO, C. Ensaio Monographico dos Hirudineos. **Revista do Museu Paulista da Cidade de São Paulo**, v. 13, p. 855–1097, 1923.

PURSCHKE, G.; WESTHEIDE, W.; ROHDE, D.; BRINKHURST, R. O. Morphological reinvestigation and phylogenetic relationship of Acanthobdella peledina (Annelida, Clitellata). **Zoomorphology**, v. 113, p. 97–101, 1993.

RICHARDSON, L. R. A contribution to the systematics of the hirudinid leeches, with description of new families, genera and species. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, p. 97–149, 1969a.

RICHARDSON, L. R. The family Ozobranchidae redefined, and a novel Ozobranchiform leech from Murray River turtles (Class Hirudinoidea: Order Rhyncobdelliformes). **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v. 94, p. 62–80, 1969b.

RICHARDSON, L. R. A note on marine piscicolid leeches from port Phillip Bay, Victoria. **Australian Zoologist**, v. 15, n. 3, p. 391–394, 1970.

RINGUELET, R. A. Sinopsis Sistemática y Zoogeográfica de los Hirudíneos de la Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. **Revista del Museo de la Plata (Nueva Serie)**, v. III, p. 163–232, 1944.

RINGUELET, R. Algunos Hirudineos del Muséum D'Histoire Naturelle de Paris. **Physis**, v. 31, n. 82, p. 99–103, 1972b.

RINGUELET, R. A. Hirudineos neotropicos de Colombia, Cuba y Chile con la descripcion de una nueva especie de Oligobdella (Glossiphoniidae). **Physis**, v. 31, n. 83, p. 345–342, 1972a.

RINGUELET, R. A. Los caracteres endosomaticos de Haementeria officinalis de Fillippi, diagnosis del genero, Nephelis mexicana Duges, 1876 (Hirudinea). **Limnobios**, v. 1, n. 4, p. 129–136, 1976.

RINGUELET, R. A. Nuevos géneros y especies de Glossiphoniidae sudamericanos basados en caracteres ecto y endosomáticos (Hirudinea Glossiphoniiformes). **Limnobios**, v. 1, n. 7, p. 258–268, 1978.

RINGUELET, R. A. Aportes al conocimento de las sanguijuelas del genero Haementeria de Filippi, 1849. **Limnobios**, v. 2, n. 1, p. 50–53, 1980.

RINGUELET, R. **Annulata: Hirudinea**. Buenos Aires, República Argentina: Fundacion para la Educacion, la Ciencia y la Cultura, 1985.

SALZET, M. Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 492, p. 187–192, 2001.

SAWYER, R. T. **Leech Biology and Behavior**. [s.l.] Oxford: Claredon Press, 1986.

SCHAMBACH, S. J. BAQ, S.; SCHILLING, L.; GRODEN, C.; BROCKMANN, M. A. Application of micro-CT in small animal imaging. **Methods**, v. 50, n. 1, p. 2–13, 2010.

SCHLENZ, E. **Duas espécies novas de Hirudinea Marinhos das costas do Brasil**. 1971. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971.

SHAIN, D. H. GUEVARA, M. I. A.; CORAL, A. L.; CRAMPTON, W. G. R.; ALBERT, J. S. A Survey of Freshwater Annelids in the Peruvian Amazon, South America. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 31, p. 47–51, 2007.

SIDDALL, M. E. APAKUPAKUL, K.; BURRESON, E. M.; COATES, K. A.; ERSÉUS, C.; GELDER, S. R.; KALLERSJO, M.; TRAPIDO-ROSENTHAL, H. Validating Livanow: Molecular Data Agree That Leeches, Branchiobdellidans, and Acanthobdella peledina Form a Monophyletic Group of Oligochaetes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 346–351, 2001.

SIDDALL, M. E.; BUDINOFF, R. B.; BORDA, E. Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossiphoniidae. **Invertebrate Systematics**, v. 19, p. 105–112, 2005.

SKET, B.; TRONTELJ, P. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 129–137, 2008.

SOUZA, A. M. **Anatomia de quatro espécies de sanguessugas do gênero Haementeria Filippi, 1849 (Hirudinea, Rhyncobdellae, Glossiphoniidae)**. 1978. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

STEINHOFF, P. O. M.; UHL, G. Taxonomy and nomenclature of some mainland SE-Asian Coeliccia species (Odonata, Platycnemididae) using micro-CT analysis. **Zootaxa**, v. 4059, n. 2, p. 257–276, 2015.

TAKEDA, A. M.; SOUZA-FRANCO, G. M.; MELO, S. M.; MONKOLSKI, A. Invertebrados associados às macrófitas aquáticas de planíce de inundação do alto rio Paraná (Brasil). In: **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**, Maringá:EDUEM, 2003, p. 243-260.

TESSLER, M. BARRIO, A.; BORDA, E.; ROOD-GOLDMAN, R.; HILL, M.; SIDDALL, M. E. Description of a soft-bodied invertebrate with microcomputed tomography and revision of the genus Chtonobdella (Hirudinea: Haemadipsidae). **Zoologica Scripta**, v. 45, n. 5, p. 552-565, 2016.

TUGGLE, B. N. The Occurrence of Theromyzon rude (Annelida: Hirudinea) in Association with Mortality of Trumpeter Swan Cygnets (Cygnus buccinator). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, n. 2, p. 279–280, 1986.

UTEVSKY, S.; MAZEPA, G. A record of the South American leech Helobdella triserialis (Hirudinea: Glossiphoniidae) from an aquarium in Kharkiv, Ukraine. **Lauterbonia**, v. 52, p. 177–180, 2004.

VASILIEV, E. A. The Ichthyobdellidae of the Far East. **Petrozavudsk**, v. 1, p. 25-68, 1939.

VERA, C. K.; BLUF, A.; TORRES, M. H. Sanguijuelas, parásitos presentes ayer y hoy. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 22, n. 1, p. 32–37, 2005.

VICKERTON, P.; JARVIS, J.; JEFFERY, N. Concentration-dependent specimen shrinkage in iodine-enhanced microCT. **Journal of Anatomy**, v. 223, n. 2, p. 185–193, 2013.

VOLUME GRAPHICS. Disponível em: <https://www.volumegraphics.com/en/products/vgstudio-max.html>. Acesso em: 17 ago. 2017.

WEBER, M. Hirudinées sud-americaines. 1915.126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Université de Neuchâtel, Neuchatel, 1915.

WHITAKER, I. S. RAO, J.; IZADI, D.; BUTLER, P. E. Hirudo medicinalis: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, p. 133–137, 2004.

WHITMAN, C. O. The leeches of Japan. **Quartely Journal of Microscopical Science**, v. 26, p. 317–416, 1886.

WILLIAMS, J. I.; BURRESON, E. M. Blackwell Publishing Ltd Phylogeny of the fish leeches (Oligochaeta, Hirudinida, Piscicolidae) based on nuclear and mitochondrial genes and morphology. **Zoologica Scripta**, v. 35, n. 6, p. 627–639, 2006.

WILLIAMS, J. I.; URRUTLA, P. M.; BURRESON, E. M. Two new species of Austrobdella (Hirudinida: Piscicolidae) from Chile. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 184–189, 2007.

Anexo 1. Quadro demonstrativo dos principais agentes de contraste para a microtomografia computadorizada (μCT).

	Iodo (lugol)	**PTA**	**PMA**	**Iodo metálico (I2E, I2M)**	**Tetróxido de ósmio**	**Hexametildisilazane**
Fixador	Formol, etanol, solução de Bouin	Formol, etanol, solução de Bouin	Formol	Qualquer fixador	Formol ou outro fixador SEM	Folmol ou etanol
Procedimento	Diluir lugol forte (2% iodeto de potássio + 1% I2) a 10%. Manter a amostra nesta solução por 4-72h, dependendo do tamanho da amostra	Solução de ácido fosfotungstico a 1%. Manter a amostra por 7-20 dias. renovar a solução diariamente	Solução de 1% PMA. Manter as amostras em solução por aproximadamente 7 dias	1% de I2 dissolvido em 100% etanol (I2E) ou metanol (I2M). Manter as amostras em solução por 0.5-12h. Pode ser diluído para se obter resultados melhores (recomenda-se a diluição a 10%).	1-2% OsO_4 em tampão fosfato por 1-2h; lavar em tampão fosfato e desidratar em etanol.	Desidratar o espécime em bateria de etanol (80%, 90%, 95%, 100%); solução hexametildesilazane:etanol por 1-2h; secar em hexametildesilazane por uma noite
Vantagens	Baixo custo; fácil aplicação; atóxico; fácil penetração; fácil remoção	Alto contraste entre tecidos; baixo custo; atóxico; contraste estável por meses; não há mudança visível no espécime	Pode gerar alto contraste entre tecidos, dependendo da amostra, especialmente de músculos e cartilagem	Produz alto contraste; atóxico; baixo custo; procedimento rápido	Produz alto contraste; o material pode ser escaneado em blocos de resina	Pode ser utilizado em combinação com outras técnicas de contraste

Anexo 1. Quadro demonstrativo dos principais agentes de contraste (continuação).

	Iodo (lugol)	PTA	PMA	Iodo metálico (I2E, I2M)	tetróxido de ósmio	Hexametildisilazane
Desvantagens	alta deformação de tecidos moles; intensidade pode variar, dependendo do material e da fixação; coloração excessiva de tecidos mineralizados	Difícil penetração; procedimento pode durar dias ou semanas; limitado a espécimes pequenos	Difícil penetração; procedimento é longo	Intensidade do contraste pode variar dependendo do material; colocação excessiva de tecidos mineralizados	Extremamente tóxico; não pode ser utilizado em materiais fixados em etanol; difícil penetração; difícil descarte de resíduo	Pode deformar o material; altera a estrutura original dos tecidos
Remoção	Banhos de 100% etanol, até a remoção completa	Não há forma conhecida de remoção	Não há forma conhecida de remoção	Banhos de 100% etanol, até a remoção completa	Não há forma conhecida de remoção	Reidratação com bateria de álcool, até 70%

Fontes: Fauwetter et al. (2013); Patterson et al. (2014); Vickerton, Jarvis & Jeffery (2013); Metscher (2009a; 2009b).

Anexo 2. Protocolo dos procedimentos histológicos utilizados para a análise do sistema celômico de *Austrobdella sp.*

Diafanização e infiltração por Parafina

1. Banho de xilol (60 minutos x 2)
2. Banho de xilol: Parafina (1:1) (60 minutos)
3. Banho de parafina – recipiente fechado (60 minutos)
4. Banho de parafina – recipiente aberto (240 minutos)

Desparafinização e reidratação das amostras em parafina

1. Derreter o excesso de parafina das lâminas na estufa (20 minutos)
2. Banho de xilol (5 minutos x 2)
3. Banho de álcool 100% (5 minutos x 2)
4. Banho de álcool 95% (3 minutos)
5. Banho de álcool 70% (3 minutos)
6. Banho de água destilada (tempo e quantidade dependente de cada coloração)

Hematoxilina e eosina (HE) para parafina

1. Banho de água destilada (2 minutos x 3)
2. Banho de hematoxilina de Mayer (10 minutos)
3. Lavar em água de torneira corrente (até 5 minutos)
4. Analisar lâminas ao microscópio para verificar intensidade
5. Lavagem rápida em água destilada
6. Banho em eosina (5 minutos)
7. Banho em água destilada (2 minutos x 2)

8. Banho em álcool 70% (2 minutos)

9. Banho em álcool 95% (30 segundos)

10. Banho em álcool 100% (30 segundos x 2)

11. Banho em xilol (5 minutos x 2)

Anexo 3. Tabela comparativa da morfologia interna das espécies estudadas.

	Haementeria cf. brasiliensis	**Haementeria brasiliensis sensu Corder, 1937**	**Haementeria lutzi**	**Haementeria vizottoi**
Anelação dorsal	[(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)]	[(a1+a2)>(a3)]	[(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)]	[(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)]
Anelação ventral	[(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)]	[(a1+a2)>(a3)]	[(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)]	[(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)]
Gonóporos	Separados por 2 anéis primários	Separados por 1 anel	Separados por 2 anéis primários	Separados por 2 anéis primários
Tubérculos	6 linhas longitudinais de tubérculos grandes	-9 linhas longitudinais de tubérculos	7 linhas longitudinais	7 linhas longitudinais de tubérculos grandes
Bulbo faríngeo	Presente	Ausente	Presente	Presente
glândulas salivares	Dois pares alongados, conectados diretamente ao bulbo faríngeo; primeiro par subdividido	Dois pares, conectados diretamente ao bulbo faríngeo, primeiro par cilíndrico, segundo par esférico	Par anterior cilíndrico, conectado ao bulbo faríngeo por tubos independentes; posterior alongado conectado diretamente ao bulbo	Par anterior cilíndrico, conectado ao bulbo faríngeo por tubos independentes; posterior alongado conectado diretamente ao bulbo
órgãos esofágicos	2 pares conectados por tubos independentes	2 pares conectados por tubos independentes	2 pares conectados por tubos independentes	Caractere não observado
último par de cecos gástricos	Trajeto descendente presente	Trajeto descendente presente	Trajeto descendente ausente	Trajeto descendente presente

Fonte: próprio autor

Anexo 3. Tabela comparativa da morfologia interna das espécies estudadas (continuação).

	Haementeria sp. 1	**Haementeria sp. 2**	**Haementeria sp. 3**	**Haementeria sp. 4**
Anelação dorsal	[(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)]	[(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)]	[(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)]	[(b1+b2)+(b3+b4)+(b5+b6)]
Anelação ventral	[(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)]	[(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)]	[(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)]	[(b1+b2)+(a2)+(b5+b6)]
Gonóporos	Separados por 1 anel primário	Separados por 1 anel primário	Separados por 2 anéis primários	Separados por 1 anel primário
Tubérculos	quatro linhas longitudinais de tubérculos	5-9 tubérculos em cada anel primário, não formam linhas longitudinais	10 linhas longitudinais de tubérculos	Tubérculos ausentes
Bulbo faríngeo	Ausente	Presente	Presente	Presente
glândulas salivares	Pois pares alongados, conectados diretamente ao bulbo faríngeo, sem subdivisão	Anterior esférico, conectado ao bulbo faríngeo por tubos independentes; posterior alongado conectado diretamente ao bulbo, subdividido	Dois pares alongados, conectados diretamente ao bulbo faríngeo	Um par cilíndrico
órgãos esofágicos	2 pares conectados por tubos independentes	2 pares conectados por tubos comuns	2 pares conectados por tubos independentes	2 pares conectados por tubos independentes
último par de cecos gástricos	Trajeto descendente presente	Trajeto descendente ausente	Trajeto descendente presente	Trajeto descendente presente

Fonte: próprio autor

Anexo 3. Tabela comparativa da morfologia interna das espécies estudadas (continuação).

	Oligobdella columbiensis	**Placobdella maculata**	**Placobdella sp. 1**	**Placobdella sp. 1**
Anelação dorsal	[(a1+a2)>(a3)]	[(a1)+(a2)+(a3)]	[(a1)+(a2)+(a3)]	[(a1+a2)>(a3)]
Anelação ventral	[(a1+a2)>(a3)]	[(a1)+(a2)+(a3)]	[(a1)+(a2)+(a3)]	[(a1+a2)>(a3)]
Gonóporos	Separados por 1 anel	Separados por 1 anel primário	Separados por 1 anel primário	Separados por 1 anel
Tubérculos	15-18 linhas longitudinais de pequenos tubérculosl; 5 fileiras longitudinais de tubérculos grandes	7 linhas longitudinais de tubérculos	9 linhas longitudinais de tubérculos	8-10 linhas longitudinais de tubérculos na face dorsal
Bulbo faríngeo	Caractere não observado	Ausente	Ausente	Presente
glândulas salivares	Caractere não observado	Glândulas salivares difusas	Glândulas salivares difusas	Dois pares de glândulas salivares compactas, conectados diretamente ao bulbo, primeiro par cilíndrico, segundo par esférico
órgãos esofágicos	Caractere não observado	2 pares conectados por tubos independentes	2 pares conectados por tubos independentes	2 pares conectados por tubos comuns
último par de cecos gástricos	Caractere não observado	Trajeto descendente presente	Trajeto descendente presente	Trajeto descendente presente

Fonte: próprio autor