

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO
DA NATUREZA

ZACARIAS ROSALINA JOÃO DA SILVA

**TAXONOMIA, ECOLOGIA E FILOGENIA DE CILIADOS (ALVEOLATA,
CILIOPHORA) ENDOSSIMBIONTES DE MAMÍFEROS HERBÍVOROS**

Juiz de Fora

2023

Zacarias Rosalina João da Silva

**TAXONOMIA, ECOLOGIA E FILOGENIA DE CILIADOS (ALVEOLATA,
CILIOPHORA) ENDOSSIMBIONTES DE MAMÍFEROS HERBÍVOROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Fonseca Rossi

Colaboradora: Dra. Franciane Cedrola

Juiz de Fora

2023

Prof. Dr. Thiago da Silva Paiva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Zacarias Rosalina João da Silva**TAXONOMIA, ECOLOGIA E FILOGENIA DE CILIADOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) ENDOSSIMBIOTES DE MAMÍFEROS HERBÍVOROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de concentração: Comportamento, Ecologia e Sistemática

Aprovada em 14 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Mariana Fonseca Rossi - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Marta Tavares d'Agosto
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Isabel Cristina Vidal Siqueira Castro
Centro Universitário Presidente Antônio Carlos

Prof. Dr. Inácio Domingos da Silva Neto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 10/01/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Júnio Pedroso Dias, Professor(a)**, em 14/02/2023, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago da Silva Paiva, Usuário Externo**, em 14/02/2023, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabel Cristina Vidal Siqueira de Castro, Usuário Externo**, em 14/02/2023, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Inácio Domingos da Silva Neto, Usuário Externo**, em 14/02/2023, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Fonseca Rossi, Professor(a)**, em 14/02/2023, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marta Tavares d'Agosto, Usuário Externo**, em 14/02/2023, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1106993** e o código CRC **64DF49C0**.

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Zacarias Rosalina Joao da .
Taxonomia, ecologia e filogenia de ciliados (Alveolata, Ciliophora) endossimbiontes de mamíferos herbívoros / Zacarias Rosalina Joao da Silva. -- 2023.
196 p. : il.

Orientador: Roberto Júnio Pedroso Dias
Coorientadora: Mariana Fonseca Rossi
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2023.

1. Ciliados do rúmen. 2. Caprinos. 3. Estabelecimento de ciliados. 4. Filogenia. 5. Mamíferos herbívoros. I. Dias, Roberto Júnio Pedroso , orient. II. Rossi , Mariana Fonseca , coorient. III. Título.

Dedico esta tese de doutoramento aos meus pais, Rosalina Manuel Ahrassana (falecida) e João da Silva Ahrassana, pelo exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Quando temos fé e força de vontade, sabemos explicar muitos contornos que a nossa vida toma. Por isso, inicialmente agradeço à Deus pela oportunidade de me incluir no seu projeto de vida e contínua proteção. Agradeço em seguida aos meus pais, João da Silva Ahirassana e Rosalina Manuel Ahirassana (falecida), pela maravilhosa educação familiar e momentos de infância lindíssimos que hoje tenho em memória. Aos meus irmãos, Alcina, Eugênio, Brasília, Ofélia, Lucinda, Nelson, Josefata, Matias e Maria, pelos momentos que juntos partilhamos como família, o vosso amor e carinho sempre estiveram presentes nesses 4 anos do doutorado.

Às minhas lindas meninas, Chelsia, Odete e Ivaneide, tenho apenas de pedir a vocês desculpas por me ter ausentado em momento importante das vossas vidas. Quando precisaram de conversar, brincar e pedir um conselho de pai, ou aquele dobrar do joelho para nossas rotineiras orações, eu não estive por perto. Albertina Assane Muganharia, minha companheira, te agradeço pela sua compreensão por todo esse tempo que fiquei ausente, sei que precisou de mim por várias circunstâncias, mas infelizmente, eu não estava lá para te apoiar.

Ao Professor Doutor Roberto Júnio Pedroso Dias, meu orientador: dizer algo para ti é difícil, e se existisse uma palavra de agradecimento maior que palavra “obrigado”, este seria o momento que eu usaria para me expressar. O seu acolhimento, a sua paciência, os seus ensinamentos e a forma como ensina, a sua orientação, a sua preocupação pelos seus alunos e os demais à sua volta, tudo isto é para mim um grande aprendizado e lição de vida. Na ausência da palavra que me referi, só posso dizer “KHOSHUKURO”, ou seja, gratidão, muito agradecido, em minha língua materna. Mas, quero que fique ciente Professor Roberto, que tudo apreendido de ti transformou a minha visão de ser, estar e olhar o mundo. Khoshukuro.

À Professora Doutora Mariana Fonseca Rossi, a minha coorientadora: parece ontem, quando me lembro da manhã do dia 11 de março de 2019, em que pela primeira vez conheci o LabProto apresentado por si Profa, e que mais tarde, este espaço viria a ser a minha kitnet durante o doutorado. Professora, muitíssimo obrigado por toda compreensão, paciência e todo tempo dispendido ao longo desses anos para que os meus trabalhos tivessem rumo. Gratidão pela leitura atenta e a valiosa ajuda em todas as análises, com a qual aprendi bastante.

À Doutora Franciane Cedrola, colaboradora: permita-me chamar-te carinhosamente de “Fran”, pessoa maravilhosa, muito querida, preocupada em ajudar a todos. Os seus ensinamentos, valiosos conselhos nos momentos difíceis, foram fundamentais para escrita

desta tese. Por isso, agradeço bastante Fran, pela leitura atenta e valiosas contribuições para esta tese. Me inspiro muito em você Doutora Fran.

À Professora Doutora Julliane Dutra Medeiros, agradeço pela colaboração, ensinamentos e sobre tudo valiosa ajuda em todas as análises, com as quais aprendi bastante.

À Professora Doutora Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula, pelo carinho, amor e preocupação ao meu bem estar desde a minha chegada ao Brasil. Muito obrigado!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, em especial a Professora Doutora Marta D'Agosto, pelos vários momentos de ensinamento, preocupação com o bom andamento dos meus trabalhos, e por ser essa pessoa que me inspira em termos de competências acadêmicas pelos longos anos dedicados à Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Laboratório de Protozoologia. Agradeço igualmente de forma especial, ao Professor Doutor Artur Andriolo, por ter sido essa pessoa da UFJF que inicialmente se comunicou comigo e sem hesitar encaminhou o meu correio eletrônico ao Professor Doutor. Roberto Júnio Pedroso Dias, o meu orientador.

Ao pessoal técnico administrativo do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, em especial a Marlú Carvalho Ferreira, pela recepção, simpatia e cuidados no atendimento de todos processos quer individuais ou coletivos, relativos a minha formação neste programa.

Aos primos e tios, em especial Orlando Raul Magesso, Salvador Zacarias Ahirassana e Rodrigues Uachaia, pela força emocional, pelos momentos que juntos partilhamos durante estes anos que estive fora de Moçambique. Os momentos serviram de impulso e bem estar emocional durante os meus estudos no doutorado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Doutora Priscila Fregulia, Doutor Glauber Thiago Martins Barino, Doutora Jéssica Andrade Vilas-Boas, Doutora Rafaela Venançoni Matoso, Doutor Talys Henrique Assumpção Jardim, Mestre Pedro Mendes de Souza, Mestre Fabiola da Vila Costa, Suyane Costa Bordim, Saulo Moreira Mendes, Elize Botelho da Silva, Ramon Germini do Nascimento, pelos momentos de companheirismo, partilha de conhecimentos, momentos de angústias e de alegrias que fomos juntos dividindo neste período de quatro anos. Tenham a certeza que vocês estarão sempre no meu pensamento, “VIVA PROTOZOEIROS”.

Aos meus amigos e colegas de serviço, em especial Gabriel Dércio José Moreno, pelas atualizações profissionais de forma frequente e ter cuidado de todas as minhas situações profissionais nestes quatro anos. Além de ser amigo, você é um ótimo profissional e fico grato por dividir com você vários momentos sociais e profissionais dessa vida.

Em fim, meu muito obrigado ao pessoal da Diretoria de Relações Internacionais da UFJF, pelo acolhimento e aos programas PEC-PG da CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-02929-18) pela oportunidade de financiamento e a todos aqueles que me auxiliaram social ou moralmente para o alcance do terceiro ciclo universitário, MUITO OBRIGADO!

"Para que as luzes do outro sejam percebidas por mim devo por bem apagar as minhas, no sentido de me tornar disponível para o outro".

" Quando as teias da aranha se juntam, elas podem amarrar um leão".

Mia Couto
Biólogo e escritor moçambicano.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1	Hipótese filogenética para os grupos de ruminantes.....	29
Figura 2	Ilustração do sistema digestivo de um ruminante adulto representando as partes do trato gastrointestinal e o caminho percorrido pelo processo de ruminação.....	30
Figura 3	Representação esquemática do estômago de mamíferos ruminantes, com a ilustração dos compartimentos: Rúmen, Abomaso, Omaso e Retículo.....	31
Figura 4	Classificação do filo Ciliophora.....	33
Figura 5	Ilustração da morfologia geral de protozoários da subfamília Entodiniinae.....	35
Figura 6	Ilustração da morfologia geral de protozoários da subfamília Diploniinae.....	36
Figura 7	Ilustração da morfologia geral de protozoários da subfamília Ophryoscolecinae.....	37
Figura 8	Ilustração sobre a interação de protozoários do rúmen com outros microrganismos e fotomicrografias evidenciando o comportamento de predação em protozoários ciliados	39
Figura 9	Efeito da defaunação nas funções ruminais e desempenho animal.....	40
Figura 10	Alguns caracteres morfológicos para identificação de gêneros de ciliados de mamíferos herbívoros.....	43

CAPÍTULO 1

Figura 1	Desenhos esquemáticos das espécies de ciliados do rúmen descritas em caprinos.....	62
Figura 2	Representação esquemática da associação de gêneros de protozoários ciliados e as espécies hospedeiras da subfamília Caprinae.....	70
Figura 3	Distribuição geográfica e quantitativa das espécies de protozoários ciliados associadas com caprinos.....	72
Figura 4	Rede de interação entre espécies de protozoários ciliados associadas com caprinos e outros hospedeiros.....	74

Figura 5	Árvore filogenética obtida por máxima verossimilhança representando relações evolutivas de algumas espécies de ciliados, com base em sequências de 18S rDNA.....	75
Figura 6	Filogenia datada de ciliados endossimbiontes da subclasse Trichostomatia.....	80

CAPÍTULO 2

Figura 1	Fotomicrografias de protozoários ciliados do conteúdo ruminal de caprinos da raça Landim (<i>Capra hircus</i> L), observados por meio da técnica semipermanente com corante à base de iodo.....	108
Figura 2	Fotomicrografias de protozoários ciliados do conteúdo ruminal de caprinos da raça Landim (<i>Capra hircus</i> L), observados por meio da técnica de impregnação pelo carbonato de prata.....	110
Figura 3	Gêneros de protozoários ciliados registrados em caprinos (<i>Capra hircus</i>), ovinos (<i>Ovis aries</i>) e bovinos (<i>Bos taurus</i>) em seis países da África	117
Figura 4	Diagrama circular de número de espécies de protozoários ciliados de caprinos (<i>Capra hircus</i>), ovinos (<i>Ovis aries</i>) e bovinos (<i>Bos taurus</i>) registrados por gênero em países da África.....	118

CAPÍTULO 3

Figura 1	Árvores filogenéticas obtidas por máxima verossimilhança e inferência bayesiana revelando relações evolutivas de representantes de espécies de ciliados do rúmen, utilizando sequências da região ITS, gene 18S rDNA e concatenadas.....	130
----------	--	-----

CAPÍTULO 4

Figura 1	Métricas de diversidade alfa analisada em quatro estágios de vida dos animais para a comunidade microbiana.....	161
Figura 2	Gráfico de barras da composição e abundância dos filos e Subclasses/Classes da comunidade microbiana do rúmen de bezerros durante quatro estágios de crescimento.....	163
Figura 3	Gráfico de barras contendo composição e abundância dos gêneros da comunidade de ciliados no rúmen de bezerros durante quatro estágios de desenvolvimento	164

Figura 4	Boxplots da abundância do filo Ciliophora e dez gêneros registrados no rúmen.....	165
Figura 5	Análise de coordenadas principais (PCoA) para composição da comunidade de ciliados do rúmen de bezerros em diferentes fases de idade.....	167

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1	Composição do ecossistema microbiano do rúmen.....	32
Tabela 2	Principais estruturas ciliares reveladas por métodos morfológicos.....	44

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Espécies de protozoários ciliados que ocorrem em caprinos e observadas em vários estudos ao redor do mundo.....	65
Tabela 2	Métodos de estimativa de tempo de divergência das classes de ciliados simbioses.....	78
Tabela 3	Tempo de divergência(Ma) da raiz de Ciliophora e das classes de ciliados simbioses por estudo.....	81

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Estimativa da densidade genérica de protozoários ciliados/ ml do conteúdo ruminal de caprinos da raça Landim (<i>Capra hircus</i> L) de Moçambique.....	105
Tabela 2	Abundância relativa de ciliados do conteúdo ruminal de caprinos da raça Landim (<i>Capra hircus</i> L) de Moçambique.....	106
Tabela 3	Compilação de protozoários ciliados reportados em caprinos domésticos (<i>Capra hircus</i>), ovinos domésticos (<i>Ovis aries</i>) e bovinos domésticos (<i>Bos taurus</i>) em países do continente africano.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGVs	Ácidos Graxos Voláteis
BI	Inferência Bayesiana
CAR	Consumo Alimentar Residual
CO ₂	Dióxido de carbono
CH ₄	Metano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação
DIC	Contraste Interferencial Diferencial
GenBank	Banco de Dados de Sequências Genéticas do Instituto Nacional de Saúde
IB	Inferência Bayesiana
ITS	Espaçador interno transcrito
<i>min</i>	Minutos
ML	Máxima Verossimilhança
MV	Máxima Verossimilhança
MEV	Microscópio Electrónico de Varredura
MFS	Solução de Verde de Metila Formalina salina
NGS	Sequenciamento de Próxima Geração
RFLP	Fragmento de Restrição e Comprimento Polimórfico
RNA	Ácido ribonucleico
MGRast	Anotação Rápida de Metagenômica Usando Tecnologia de Subsistema
PubMed	Biblioteca Nacional de Medicina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
SD	Desvio Padrão
TGI	Trato Gastro Intestinal
VFA	Ácido Graxo Volátil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	20
	REFERÊNCIAS.....	23
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1	Mamíferos herbívoros.....	26
2.2	Herbivoria em mamíferos.....	26
2.3	Origem e evolução dos ruminantes.....	27
2.4	Mecanismo de ruminação.....	29
2.5	Caracterização do ecossistema ruminal.....	31
2.6	Protistas ciliados do rúmen.....	33
2.7	Caracterização das subfamílias de Ophryoscolecidae	34
2.8	Interação dos ciliados com outros microrganismos do rúmen	38
2.9	Importância da taxonomia nos estudos de ciliados do rúmen.....	40
2.10	Métodos para estudos taxonômicos de protistas ciliados.....	41
	REFERÊNCIAS.....	45
3	CAPÍTULO 1. CILIADOS DO RÚMEM (ALVEOLATA, CILIOPHORA) ASSOCIADOS COM CAPRINOS: CHECKLIST, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, ESPECIFICIDADE DO HOSPEDEIRO, FILOGENIA E DATAÇÃO MOLECULAR.....	55
3.1	Resumo.....	55
3.2	Introdução.....	56
3.3	Material e Métodos.....	57
3.4	Resultados e Discussão.....	60
3.4.1	Breve histórico sobre ciliados associadas com caprinos.....	60
3.4.2	Checklist de espécies e gêneros de protozoários ciliados associados com caprinos.....	64
3.4.3	Distribuição geográfica e especificidade.....	71
3.4.4	Notas filogenéticas.....	75
3.4.5	Origem e diversificação de ciliados em Caprinae.....	77
3.5	Conclusões.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83

4	CAPÍTULO 2. CILIADOS EM RUMINANTES DOMÉSTICOS NA ÁFRICA E PRIMEIRA CARATERIZAÇÃO DE CILIADOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) NO RÚMEN DE CAPRINOS DOMÉSTICOS DA RAÇA LANDIM (<i>CAPRA HIRCUS</i> L) EM MOÇAMBIQUE.....	98
4.1	Resumo.....	98
4.2	Introdução.....	99
4.3	Material e Métodos.....	102
4.4	Resultados.....	105
4.4.1	Análise da densidade genérica.....	105
4.4.2	Abundância relativa e identificação das espécies.....	106
4.4.3	Compilação de registros de protozoários ciliados reportados em países da África....	113
4.5	Discussão.....	118
4.6	Conclusões.....	122
	REFERÊNCIAS.....	124
5	CAPÍTULO 3. ANÁLISE FILOGÊNÉTICA DE REPRESENTANTES DE CILIADOS (ALVEOLTA, CILIOPHORA) DO RÚMEN DE MAMÍFEROS HERBÍVOROS UTILIZANDO NOVAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS-rDNA.....	134
5.1	Resumo	134
5.2	Introdução.....	134
5.3	Material e métodos.....	136
5.4	Resultados.....	138
5.5	Discussão.....	142
5.6	Conclusões.....	145
	REFERÊNCIAS.....	146
6	CAPÍTULO 4. SUCESSÃO ECOLÓGICA DA COMUNIDADE DE CILIADOS (ALVEOLTA, CILIOPHORA) NO RÚMEN DE BEZERROS MANTIDOS EM CONDIÇÕES TROPICAIS COM DIFERENTES NÍVEIS DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR: UMA ABORDAGEM METAGENÉTICA (18S-rRNA).....	154
6.1	Resumo.....	154

6.2	Introdução.....	154
6.3	Material e Métodos.....	158
6.4	Resultados.....	160
6.4.1	Dados de sequenciamento.....	160
6.4.2	Estrutura da comunidade.....	160
6.4.3	Perfil taxonômico.....	162
6.5	Discussão.....	167
6.6	Conclusões.....	171
	REFERÊNCIAS.....	172
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	178
	ANEXOS.....	180

RESUMO

Aproximadamente 250 espécies de ciliados do rúmen já foram descritas desde que Gruby e Delafond em 1843 descobriram a existência de microrganismos vivendo em simbiote com hospedeiros ruminantes e pseudoruminantes. Estes microrganismos desempenham importantes funções desde a degradação da fibra até a manutenção do equilíbrio microbiano ruminal. Porém, o conhecimento sobre este grupo de eucariotos ainda continua pouco compreendido, principalmente para hospedeiros como caprinos e regiões como Moçambique, por isso, o objetivo desta tese foi de compreender a morfologia, taxonomia, filogenia e as relações de protozoários ciliados endossimbiontes de mamíferos herbívoros utilizando uma abordagem integrativa das análises morfológicas, ecológicas, filogenéticas e moleculares. A tese está organizada em quatro capítulos para além da revisão sucinta de alguns fundamentos teóricos sobre ciliados do rúmen, desde a sua descoberta, características dos ciliados do rúmen, seus hospedeiros, sua importância e principais técnicas e métodos utilizados nos estudos de ciliados do rúmen. No primeiro capítulo fazemos o checklist de espécies de ciliados do rúmen associados com caprinos, sua distribuição geográfica, especificidade aos hospedeiros e alguns aspectos macroevolutivos das espécies. No segundo capítulo foi analisada a composição genérica e específica de protozoários ciliados do rúmen de caprinos da raça Landim do norte de Moçambique, mas também, comparou-se a densidade genérica e específica com registros em outros estudos. Ainda no segundo capítulo, compilou-se os registros de ciliados em ruminantes domésticos de países africanos. No terceiro capítulo foi usado o marcador molecular ITS com objetivo de analisar as relações filogenéticas de algumas espécies representantes de ciliados do rúmen. Neste capítulo terceiro, foi demonstrado que a utilização de um dataset concatenado entre os genes 18S e a região ITS pode ser uma alternativa mais robusta para inferir as relações filogenéticas entre os taxons de ciliados do rúmen. No quarto capítulo foi usado o sequenciamento Illumina 18S rRNA para caracterizar o estabelecimento sucessivo da comunidade de ciliados no rúmen de bezerros da F1 Holandês x Gir. Esta tese, constitui uma contribuição importante para melhor compreender alguns aspectos relacionados com a morfologia, taxonomia, filogenia e a ecologia de ciliados no rúmen de herbívoros ruminantes.

Palavras-chaves: Ciliados do rúmen. Caprinos. Estabelecimento de ciliados. Filogenia. Mamíferos herbívoros. Taxonomia.

ABSTRACT

Approximately 250 species of rumen ciliates have been described since 1843, when Gruby and Delafond found microorganisms living symbiotically with ruminant and pseudoruminant hosts. These microorganisms play important roles, from the degradation of fibers to the maintenance of the rumen microbial balance. However, knowledge about this eukaryotic group remains little understood, especially for hosts such as goats and remote regions such as Mozambique, thus, the aim of this thesis was to comprehend morphology, taxonomy, phylogeny and the relationships of endosymbiont ciliate protozoans of herbivorous mammals via an integrative approach of morphological, ecological, phylogenetic and molecular analyses. This work is organized into four chapters, beyond that, we make a quick review of some of the theoretical foundations for rumen ciliates since their discovery, characteristics of rumen ciliates, their hosts, their importance, and main techniques and methods used in studies about them. In the first chapter is presented in which we have a checklist of rumen ciliate species associated with caprines, their geographic distribution, host specificity, and some macro-evolutive aspects of the species. In the second chapter we analyze the generic and specific composition of ciliate protozoans in the rumen of the Landim goat breed, from northern Mozambique, but we also compare generic and specific density with records from other studies. Still within the second chapter, we compile records of ciliates in domestic ruminants from African countries. In the third chapter we used the ITS marker in order to analyze the phylogenetic relationships of some representative species of rumen ciliates. Within this third chapter, we demonstrate that the use of a concatenated dataset between the 18S genes and the ITS region may be a valid alternative to infer the phylogenetic relationships between the taxa of rumen ciliates. In the fourth chapter we used Illumina 18S rRNA sequencing to characterize the successive establishment of the rumen ciliate community in Dutch x Gir F1 calves. This thesis may contribute to a better understanding of some aspects related to morphology, taxonomy, phylogeny, and ecological of rumen ciliates from ruminant herbivores.

Keywords: Rumen ciliates. Goats. Ciliate establishment. Phylogeny. Herbivorous mammals. Taxonomy.

RESUMO PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Os animais classificados como herbívoros não possuem atividade celulolítica (capacidade de digerir alimentos com celulose) própria, por isso, eles confiam esta atividade de degradação da fibra do alimento ingerido aos microrganismos que habitam seu trato digestivo. Os microrganismos simbióticos incluem bactérias, vírus, arqueias, fungos e protistas. Alguns herbívoros têm intestino posterior expandido, também conhecidos por fermentadores do intestino posterior, e outros têm estômago expandido, também conhecidos como fermentadores do intestino anterior, como ruminantes e pseudoruminantes. A distinção entre estes, é pelo fato de os pseudoruminantes apresentarem apenas dois pré-estômagos (rúmen e retículo), como por exemplo guanacos, camelos, alpacas, hipopótamos, lhamas. Já os ruminantes são os que apresentam três pré-estômagos (rúmen, retículo e omaso), como por exemplo caprinos, ovinos, bovinos.

A maioria desses microrganismos que vive em simbiose com ruminantes é composta por protistas ciliados. A sua importância no rúmen, vai além de simples criação do equilíbrio microbiano (ao se alimentar de outros microrganismos), pois a defaunação (remoção de ciliados) pode alterar vários parâmetros ruminais, digestibilidade ruminal, diminuição das quantidades de amônia, diminuição dos ácidos graxos voláteis, afetando assim o desempenho ou produtividade dos hospedeiros.

Apesar disso, o nosso conhecimento sobre este grupo de eucariotos ainda continua pouco compreendido, por isso, esta tese investigou dentre os vários aspectos, os ciliados que ocorrem em caprinos, sua distribuição geográfica e suas relações evolutivas. Neste ponto, foi constatado que os ciliados associados com caprinos devem ter se instalado nestes hospedeiros há milhões de anos atrás, aproximadamente 8.2Ma e 2.4Ma. A composição e densidade de ciliados do rúmen de caprinos que ocorrem em regiões menos estudadas, como é o caso de Moçambique, foi outro aspecto analisado. Aqui, foram registradas 47 espécies em caprinos da raça Landim. Mas também, a tese procurou trazer algumas alternativas para analisar as relações entre espécies de ciliados do rúmen utilizando novas sequências. Para além disso, caracterizou o estabelecimento da sucessão ecológica da comunidade de ciliados (Alveolta, Ciliophora) no rúmen de bezerros mantidos em condições tropicais com diferentes níveis de eficiência alimentar: uma abordagem metagenética (18S-rRNA). Compreender estes e outros aspectos, pode ajudar por exemplo, a desenhar as estratégias eficientes de intervenção para manipular o ecossistema ruminal dos animais herbívoros ruminantes.

PREFÁCIO

A presente tese de doutoramento foi escrita como parte dos critérios para obtenção do grau de doutor em Biodiversidade e Conservação da Natureza, pela Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Geral, Brasil, num período de quatro anos, 2019-2022. A presente tese, contribui para a ampliação do conhecimento sobre protozoários ciliados do rúmen de mamíferos herbívoros, apresentando novos registros de ciliados simbioses de ruminantes domésticos em localidades de difícil acesso e pouco estudadas como é o caso de Moçambique, bem como contribui pelo uso de distintas abordagens (morfologia, filogenia molecular e metagenética) no estudo da taxonomia, ecologia e evolução desses ciliados. A tese se apresenta com quatro capítulos, para além da revisão ou fundamentação teórica. No primeiro capítulo da tese foi realizado um trabalho de revisão sobre ciliados do rúmen (Alveolata, Ciliophora) associados com caprinos: checklist, distribuição geográfica, especificidade do hospedeiro, filogenia e datação molecular. No segundo capítulo, foram inventariados ciliados em ruminantes domésticos coletados na África, bem como realizada a primeira caracterização morfológica de ciliados (Alveolata, Ciliophora) no rúmen de caprinos domésticos da raça Landim (*Capra hircus* L) em Moçambique. No terceiro capítulo, foram realizadas análises filogenéticas de representantes de ciliados (Ciliophora, Trichostomatia) do rúmen de mamíferos herbívoros utilizando novas sequências da região ITS e sequências disponíveis de 18S-rDNA. No último capítulo, quarto, foi realizado um estudo sobre o estabelecimento sucessivo (sucessão) da comunidade de ciliados (Alveolata, Ciliophora) no rúmen de bezerros mantidos em condições tropicais com diferentes níveis de eficiência alimentar: uma abordagem metagenética (18s-rrna). O primeiro capítulo desta Tese já se encontra publicado e está disponível em: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5165.2.3>. O segundo capítulo foi submetido ao periódico *Small Ruminant Research*. E os dois últimos capítulos, terceiro e quarto, serão submetidos para as seguintes revistas: *Zoological Studies* e *Microbiological Research*, respectivamente.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde que os protozoários ciliados do rúmen foram pela primeira vez descobertos no século XIX por Gruby e Delafond em 1843, estes microrganismos têm sido estudados em diferentes hospedeiros ruminantes e pseudoruminantes. Desde essa época, as primeiras ilustrações de ciliados do rúmen são atribuídas a COLIN (1854) como autor principal que estudou as primeiras observações em mamíferos domésticos, tendo observado inúmeras espécies do grupo, incluindo membros dos gêneros *Blepharocorys* Bundle, 1895, *Bundleia* da Cunha e Muniz, 1928, *Cycloposthium* Bundle, 1896, *Diplodinium* Schuberg, 1888 e *Entodinium* Stein, 1859. Stein (1858), considerado o primeiro autor de trabalhos taxonômicos envolvendo ciliados endossimbiontes de ruminantes, descreveu de forma superficial espécies dos gênero *Entodinium*, *Isotricha* e *Ophryoscolex*, incluindo a descrição da família Ophryoscolecidae (CEDROLA et al., 2020).

A partir desses trabalhos pioneiros, diversos outros estudos registraram e descreveram inúmeras espécies de ciliados no trato gastrointestinal de mamíferos herbívoros (CUNHA, 1914; WERTHEIM, 1934; OGIMOTO; IMAI, 1981; WILLIAMS; COLEMAN, 1992; D'AGOSTO; SANTA-ROSA, 1994; ITO et al., 2010; CEDROLA et al., 2015; USHIDA, 2018; BERBER; GÜRELLI, 2019). Até o final da década setenta, por exemplo, mais de 400 espécies de ciliados do rúmen já haviam sido descritas (CEDROLA et al., 2020), o que evidenciava enorme diversidade para este grupo de microeucariotos endossimbiontes de ruminantes.

A insuficiência de dados ou caracteres morfológicos, como por exemplo os padrões infraciliares, pode criar lacunas na correta identificação dos tricostomatídeos. Por isso, continuam sendo importantes os estudos taxonômicos sobre ciliados do rúmen, sobretudo aqueles estudos que têm por objetivo a modificação, aperfeiçoamento ou melhoria das técnicas ciliatológicas principais utilizadas, preparações semipermanentes com corantes à base de iodo, preparações semipermanentes com corantes à base de metil verde, técnica de protargol, impregnação pelo carbonato de prata e a utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Constitui grande desafio nessa área de estudo, a obtenção de amostras do líquido ruminal de ruminantes e pseudoruminantes vivendo em zonas de difícil acesso. Assim sendo, não existem dúvidas de que é necessário ampliar os esforços de amostragem do conteúdo ruminal, sobretudo, naquelas regiões sem informações de ocorrência de ciliados do rúmen de mamíferos herbívoros, por exemplo, algumas localidades africanas não exploradas. A

ampliação da amostragem permitirá novos estudos de descrição e redescrição das espécies, caracterizações ultraestruturais e, ainda, maior acurácia sobre a distribuição geográfica de ciliados do rúmen.

Nas últimas décadas, abordagens moleculares baseadas em sequências do gene 18S-rDNA foram utilizadas para identificação de espécies (GRAY et al., 1984; GUILLOU et al., 2013; KITTELMANN et al., 2015; LIM, 1996). O gene 18S rRNA foi importante para auxiliar em questões importantes sobre as relações evolutivas entre os ciliados em vários níveis taxonômicos (SHAZIB et al., 2016). Esses estudos revelaram que parte das classificações tradicionais não refletem divergência evolutiva e que as morfoespécies podem conter espécies crípticas. No entanto, as relações filogenéticas em nível de espécie para ciliados do rúmen continuam não resolvidas satisfatoriamente, isso, pode ser causado devido ao alto grau de conservação do gene 18S rRNA (SHAZIB et al., 2016). O uso de outros marcadores, como a região ITS, pode servir de alternativa uma vez que a taxa de mudanças evolutivas desta região é mais de 100 vezes maior que a do gene 18S rRNA, tornando ainda esta região do ITS um dos marcadores mais usados em estudos com foco na variabilidade intraespecífica e em barcode (GOLDMAN et al., 1983; SCHULTZ; WOLF, 2009; WIEMERS et al., 2009; YOUNG; COLEMAN, 2004; COLEMAN, 2003; KELLER et al., 2010; WOLF, 2015; SHAZIB et al., 2016).

Vale destacar ainda que, aspectos como colonização ou instalação sucessiva de ciliados e metagenoma em hospedeiros ruminantes é um tema pouco estudado (LATTEUR, 1953; CONRAD et al., 1958; LENGEMANN; ALLEN, 1959; QUIGLEY et al., 1985; LI et al., 2012; CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2019; GUO et al., 2020), porém, de importante papel ecológico e fisiológico, importante na economia e na saúde dos animais. Representa também um passo importante na criação de esforços e medidas para aumentar a eficiência alimentar dos animais enquanto adultos e ainda, descrever a colonização sequencial de ciliados no rúmen, pode ajudar a desenhar as estratégias eficientes de intervenção para manipular o processo de colonização dos ciliados no rúmen desde o início de vida dos animais.

Nesta perspectiva, a presente tese foi escrita com objetivo geral de compreender a morfologia, taxonomia, ecologia e as relações evolutivas de protozoários ciliados endossimbiontes de mamíferos herbívoros. E de forma específica: ¹elaborar um checklist de espécies que ocorrem no rúmen de caprinos inferindo as relações macroevolutivas dessas espécies; ²determinar a composição genérica e específica de protozoários ciliados do rúmen de caprinos da raça Landim do norte de Moçambique e compilar os registros de ciliados

reportados em ruminantes domésticos de países africanos; ³ analisar as relações filogenéticas de representantes de ciliados do rúmen utilizando o marcador ITS; e ⁴ caracterizar o estabelecimento sucessivo da comunidade de ciliados no rúmen de bezerros da F1 Holandês x Gir, usando o sequenciamento dos fragmentos nas regiões V3 e V4 de gene 18S rRNA em quatro estágios do desenvolvimento dos animais.

REFERÊNCIAS

- BERBER, B.; GÜRELLI, G. Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep in Kastamonu, Turkey, and Infraciliature of *Diplodinium quinquespinosum*, *Metadinium affine*, and *M. tauricum* (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae). **Zootaxa**, 4695(6), 550–558, 2009. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4695.6.5>.
- CEDROLA, F.; ROSSI, M.; DIAS, R.J.P.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. **Zoological Science**, 32(1), 8–15, 2015. <https://doi.org/10.2108/zs140125>.
- CEDROLA, F.; SENRA, M.V.X.; ROSSI, M.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R.J.P. Trichostomatid Ciliates (Alveolata, Ciliophora, Trichostomatia) Systematics and Diversity: Past, Present, and Future. **Frontiers Microbiology**, 10, 2967, 2020.
- COLEMAN, A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends Genetics**, 19, 370–375. 2003. Doi:10.1016/S0168-9525(03)00118-5
- COLIN, G. *Traité de Physiologie Comparée des Animaux; Considérée dans ses Rapports Avec les Sciences Naturelles, la Médecine, la Zootechnie, et L'économie Rurale*. Paris: Baillière, 1854.
- CONRAD, H. R. – HIBBS, J. W. – FRANK, N.: High Roughage System for Raising Calves Base on Early Development of Rumen Function. **Journal of Dairy Science**, 41, 1958: 1248-1261.
- CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; AMEILBONNE, A.; AUFFRET, P.; BERNARD, M.; MIALON, M.M.; DUNIÈRE, L.; FORANO, E. Supplementation of live yeast based feed additive in early life promotes rumen microbial colonization and fibrolytic potential in lambs. **Scientific Reports**, 16:1–6. 2019
- CUNHA, A.M. Sobre os ciliados intestinais dos mamíferos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 6, 212–216, 1914. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761914000300008>.
- D'AGOSTO M.; SANTA-ROSA M.R. Aspectos morfológicos de ciliados de rúmen (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) revelados pelas técnicas do protargol e da reação de Feulgen. **Revista Brasileira de Zoologia**, 11: 215–225, 1994.
- GRAY, M. W.; SANKOFF, D.; CEDERGREN, R. J. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, 12, 5837–5852. 1984. doi:10.1093/nar/12.14.5837
- GOLDMAN, W.E.; GOLDBERG, G.; BOWMAN, L.H.; STEINMETZ, D.; SCHLESSINGER, D. Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. **Molecular and Cellular Biology**, 3, 1488–1500. 1983. Doi:10.1128/MCB.3.8.1488
- GUO, W.; ZHOU, M.; MA, T.; BI, S.; WANG, W.; ZHANG, Y.; HUANG, X.; GUAN, L.L.; LONG, R. Survey of rumen microbiota of domestic grazing yak during different growth

stages revealed novel maturation patterns of four key microbial groups and their dynamic interactions. **Animal microbiome**, 2(1), 1–20. 2020.

GUILLOU, L.; BACHAR, D.; AUDIC, S.; BASS, D.; BERNEY, C.; BITTNER, L.; BOUTTE, C.; BURGAUD, G.; DE VARGAS, C.; DECELLE, J.; DEL CAMPO, J.; DOLAN, J.R.; DUNTHORN, M.; EDVARDBSEN, B.; HOLZMANN, M.; KOOISTRA, W.H.C.F.; LARA, E.; LE BESCOT, N.; LOGARES, R.; MAHÉ, F.; MASSANA, R.; MONTRESOR, M.; MORARD, R.; NOT, F.; PAWLOWSKI, J.; PROBERT, I.; SAUVADET, A.L.; SIANO, R.; STOECK, T.; VAULOT, D.; ZIMMERMANN, P.; CHRISTEN, R. The protist ribosomal reference database (PR2): A catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. **Nucleic Acids Research** 41, D597–D604. 2013. Doi:10.1093/nar/gks1160

ITO, A.; HONMA, H.; GÜRELLI, G.; GÖCMEN, B.; MISHIMA, T.; NAKAI, Y.; IMAI, S. Redescription of phylogenetic position based on the infraciliary bands and 18SSU rRNA gene sequence. **European Journal of Protistology**, 46(3), 180–188, 2010 <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2010.01.005>.

KITTELMANN, S.; DEVENTE, S.R.; KIRK, M.R.; SEEDORF, H.; DEHORITY, B. A.; JANSSEN, P.H. Phylogeny of intestinal ciliates, including *Charonina ventriculi*, and comparison of microscopy and 18S rRNA gene pyrosequencing for rumen ciliate community structure analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, 81, 2433–2444. 2015. Doi:10.1128/AEM.03697-14

KELLER, A.; FÖRSTER, F.; MÜLLER, T.; DANDEKAR, T.; SCHULTZ, J.; WOLF, M. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. **Biology Direct**, 5, 1–12. 2010. Doi:10.1186/1745-6150-5-4

LATTEUR, 1953 (cit.: JANCA1tfK, A. – PROKSOvA, M. – REICHL, J.: Biologic vjZivy sajicich mladat, Praha, **CSAZV**, 1957).

LENGEMANN, F. W. – ALLEN, N. N.: Development of rumen function in the dairy calf. II. Effect of diet upon characteristics of the rumen flora and fauna of young calves. **Journal of Dairy Science**, 42, 1959: 1171-1181

LIM, E. L. Molecular identification of nanoplanktonic protists based on small subunit ribosomal RNA gene sequences for ecological studies 1. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 43, 101– 106. 1996. Doi:10.1111/j.1550-7408.1996.tb04488.x

LI, R. W.; CONNOR, E. E.; LI, C.; BALDWIN, VI, R. L.; SPARKS, M. E. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. **Environmental Microbiology**, 14(1), 129–39. 2012.

OGIMOTO, K.; IMAI, S. *Atlas of Rumen Microbiology*. **Japan Scientific Societies**, 231pp, 1981

QUIGLEY, J.D.; SCHWAB, C.G.; AND HYLTON, W.E. Development of rumen function in calves: nature of protein reaching the abomasum. **Journal of Dairy Science**, 68: 694–702. 1985

SHAZIB, S. U. A.; VĎAČNÝ, P.; KIM, J. H.; JANG, S. W.; SHIN, M. K. Molecular phylogeny and species delimitation within the ciliate genus *Spirostomum* (Ciliophora, Postciliodesmatophora, Heterotrichea), using the internal transcribed spacer region. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 102, 128–144. 2016. Doi:10.1016/j.ympev.2016.05.04

SCHULTZ, J., WOLF, M. ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics. **Molecular Phylogenetics Evolution**, 52, 520–523. 2009.

WERTHEIM, P.P. Les infusoires de l'estomac de *Rupicapra rupicapra* L. **Annales de Parasitologie**, 12 (5), 390–393, 1934. <https://doi.org/10.1051/parasite/1934125390>.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. *The Rumen Protozoa*. **Springer**, New York. 442pp, 1992. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2>.

WIEMERS, M.; KELLER, A.; WOLF, M. ITS2 secondary structure improves phylogenetic estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatus). **BMC Ecology and Evolution**, 9, 300. 2009. Doi:10.1186/1471-2148-9-300

WOLF, M. ITS so much more. **Trends in Genetics**, 31, 175–176. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.02.005>

USHIDA, K. Symbiotic Methanogens and Rumen Ciliates. In: Hackstein J. (eds) (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea. Microbiology Monographs, **Springer**, Cham, 19, 25–35, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98836-8_3.

YOUNG, I.; COLEMAN, A.W. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: A *Drosophila* example. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 30, 236–242. 2004. Doi:10.1016/S1055-7903(03)00178-7

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MAMÍFEROS HERBÍVOROS

Os mamíferos fazem parte de um grupo de animais vertebrados com uma diversidade aproximada de 5416 espécies (WILSON; REEDER, 2005). Incluem nesse grupo animais dos mais diversos tipos, desde um morcego de 8g à uma baleia de 40 toneladas, passando diversos hábitos alimentares: carnívoros (os que se alimentam de outros animais), herbívoros (os que se alimentam de vegetais), insetívoros (os que se alimentam de insetos), detritívoros (os que se alimentam de restos orgânicos) e onívoros (os que se alimentam com diferentes classes de alimentos) (WILSON; REEDER, 2005).

Devido à essa diversidade de morfológica e funcional, os mamíferos desempenham vários e diversificados papéis no ecossistema (BOND-BUCKUP et al., 2010). Ainda, por se enquadrarem no grupo de consumidores, os mamíferos podem comer desde insetos até outros grandes mamíferos, e por serem predadores controlam a quantidade de outros animais, evitando o crescimento exagerado dessas populações que poderiam se tornar pragas ou prejudiciais, permitindo um equilíbrio do sistema natural (BONB-BUCKUP et al., 2010). Tais características, consumidores e predadores, fazem com que os mamíferos estejam presentes em todos os continentes e em todos os tipos de ecossistemas, desde os desertos até as profundezas dos oceanos, por isso, é considerado um dos grupos dominantes depois dos dinossauros (WILSON; REEDER, 2005).

Os mamíferos, tiveram que esperar o seu momento evolutivo, embora a linhagem que lhes originou, a partir dos terapsídeos, tenha aparecido muito antes (WILSON; REEDER, 2005). A extinção dos grandes dinossauros provocou várias radiações adaptativas que permitiram um aumento de linhagens e espécies de mamíferos que foram colonizando os diferentes meios ecológicos (BOND-BUCKUP et al., 2010), e durante o seu processo de evolução e diversificação estimado no final do jurássico, aproximadamente 166 milhões de anos, a partir de um ancestral sinapsídeo, os mamíferos foram adquirindo distintas transformações resultantes das diversas adaptações necessárias ao longo do tempo para que se tornassem herbívoros (WILSON; REEDER, 2005).

2.2 HERBIVORIA EM MAMÍFEROS

Como estratégia alimentar, a herbivoria é amplamente distribuída em outros grupos de animais que incluem aves, peixes, anfíbios e répteis (CAMPBELL, 1996). Dentro da classe Mammalia, a herbivoria é partilhada nas ordens Marsupialia (cangurus, coala, wallabies e

vombates), Rodentia (capivaras, castor, ratos), Lagomorpha (coelhos e lebres), Afrotheria (elefantes, dugongo e peixe boi), Perissodactyla e Artiodactyla (ruminantes, tilópodes e hipopótamos) (CAMPBELL, 1996).

A estratégia alimentar de herbivoria foi bem aproveitada porque algumas transformações morfológicas e fisiológicas foram necessárias, dentes fortes e músculos mandibulares maiores que suportassem o atrito, um sistema digestivo capaz de realizar a fermentação de alimentos contendo celulose (um polissacarídeo composto por unidades de glucose, hemicelulose, e lignina) e o desenvolvimento de pernas longas, redução e perda de dígitos incluindo uma postura do corpo que permitesse uma locomoção rápida (JANIS, 2007).

As transformações em mamíferos herbívoros permitiram o surgimento de dois grupos de fermentadores: monogástricos ou pós-gástrico (ordens Perissodactyla, Artiodactyla, Lagomorpha, Afrotheria, Rodentia, Metatheria e Primatas) e poligástricos (MACKIE, 2002; TRAN, 2016). De forma breve, o processo de fermentação deste grupo é dividido em dois tipos, ou seja, a fermentação do cólon e a fermentação do ceco (HUME; WARNER, 1980). Na fermentação do cólon (elefantes, rinocerontes, equinos) o conteúdo da região próxima do cólon se mistura de maneira livre como se trata de uma área maior de fermentação, e, em contraste, os fermentadores do ceco, apresentam um ceco largo que retém os solutos e as pequenas partículas (o porquinho-de-guine, capivara e javalis, são alguns exemplos de fermentadores do ceco) (HUME; WARNER, 1980).

O outro grupo de mamíferos herbívoros é conhecido como fermentadores poligástricos ou pre-gástricos (MACKIE, 2002; TRAN, 2016). Segundo MACKIE (2002) os mamíferos herbívoros poligástricos podem ser classificados como pseudoruminantes aqueles que apresentam dois pré-estômagos rúmen e retículo (camelos, alpacas, vicunhas, guanacos, lhamas e hipopótamos) e ruminantes verdadeiros os que apresentam três pré-estômagos rúmen, retículo e omaso (bovinos, caprinos, ovinos, girafídeos, antilocaprídeos, cervídeos), não existindo uma distinção clara entre a terceira cavidade (omaso) dos pseudo-ruminantes e a quarta (abomaso) dos ruminantes verdadeiros (GÜRELLI; DAW, 2020).

2.3 ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS RUMINANTES

Apesar de ser um dos grupos de mamíferos com o registro fóssil mais conhecido no Terciário, a origem evolutiva e biogeográfica dos ruminantes no Eoceno permanece um assunto de debate desde o passado (VRBA; SCHALLER, 2000). Existe, por exemplo, grande controvérsia sobre o grupo extinto mais relacionado aos ruminantes. Enquanto alguns autores apontam para Protoceratidae, outros apontam para Amphimerycidae, Dichobunidae ou

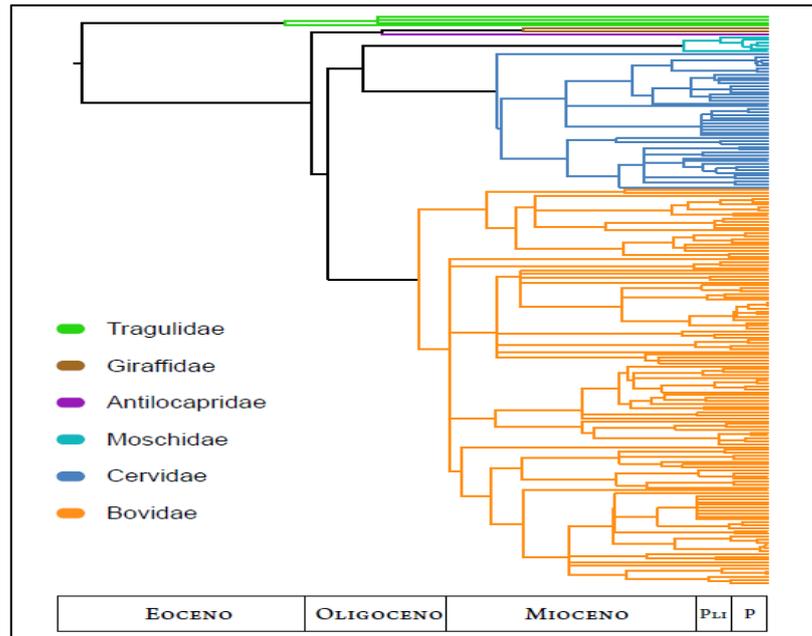
Bunoselenodontia, alguns dos quais são admitidos por vários autores como ruminantes basais (NORRIS, 2000; GEISLER; UHEN, 2005; PROTHERO, 2005; STUCKY, 2005; O'LEARY, GATESY, 2008).

Nosso conhecimento sobre o surgimento e a radiação basal do grupo se deve principalmente a um registro bastante completo das formas de selenodonte do Eoceno Médio da América do Norte (MÉTAIS; VISLOBOKOVA, 2007). No entanto, a descoberta de *Archaeomeryx* na Mongólia (Eoceno Médio) chamou a atenção para o continente asiático como um possível berço do grupo, e desde então, vêm aumentando o registro fóssil conhecido de ruminantes basais neste continente (WEBB; TAYLOR, 1980; MÉTAIS et al., 2000, 2001, 2007). Para muitos, *Archaeomeryx* é o ruminante mais antigo, embora sua posição filogenética dentro de "Tragulina" não seja muito clara e outros o tenham proposto como mais próximo de Pecora (VISLOBOKOVA, 1990).

Pela sua importância na participação dos processos fisiológicos da maioria dos herbívoros ruminantes, a dinâmica evolutiva dos ciliados do rúmen foi sugerida como intimamente associada à radiação de seus hospedeiros (IMAI, 1998; MOON-VAN DER STAAY et al., 2014; VĎAČNÝ, 2015). Por exemplo, a fermentação pregástrica é encontrada em quase todos os membros da ordem Artiodactyla, ou seja, na subordem Ruminantia, as famílias Cervidae, Giraffidae, Bovidae, Antilocapridae e Tragulidae; na subordem Tylopoda, os Camelidae; e, na subordem Suina, os Tayassuidae e Hippopotamidae (HUME; WARNER, 1980). Alguns autores (LEY et al., 2008; MUEGGE et al., 2011; ZHANG et al., 2016), sugerem que mudanças climáticas e alterações na cobertura vegetal foram impulsionadores na coevolução da relação simbiotes-hospedeiros entre ciliados e ruminantes.

Em geral, a evolução de Pecora foi marcado pelas adaptações locomotoras e alimentares, existindo em elas um alto grau de direcionalidade entre os diferentes grupos. Atualmente os Pecora incluem cinco famílias: Antilocapridae, Giraffidae, Bovidae, Moschidae e Cervidae (LÓPEZ-CANTALAPIEDRA, 2012).

Figura 1. Hipótese filogenética para os grupos de ruminantes propostos por HERNANDEZ FERNANDEZ; VRBA (2005), utilizando a morfologia, etologia e informações moleculares. As diferentes cores representam as seis famílias incluídas na subordem Ruminantia.



Fonte: Adaptado de LÓPEZ-CANTALAPIEDRA (2012)

2.4 MECANISMO DE RUMINAÇÃO

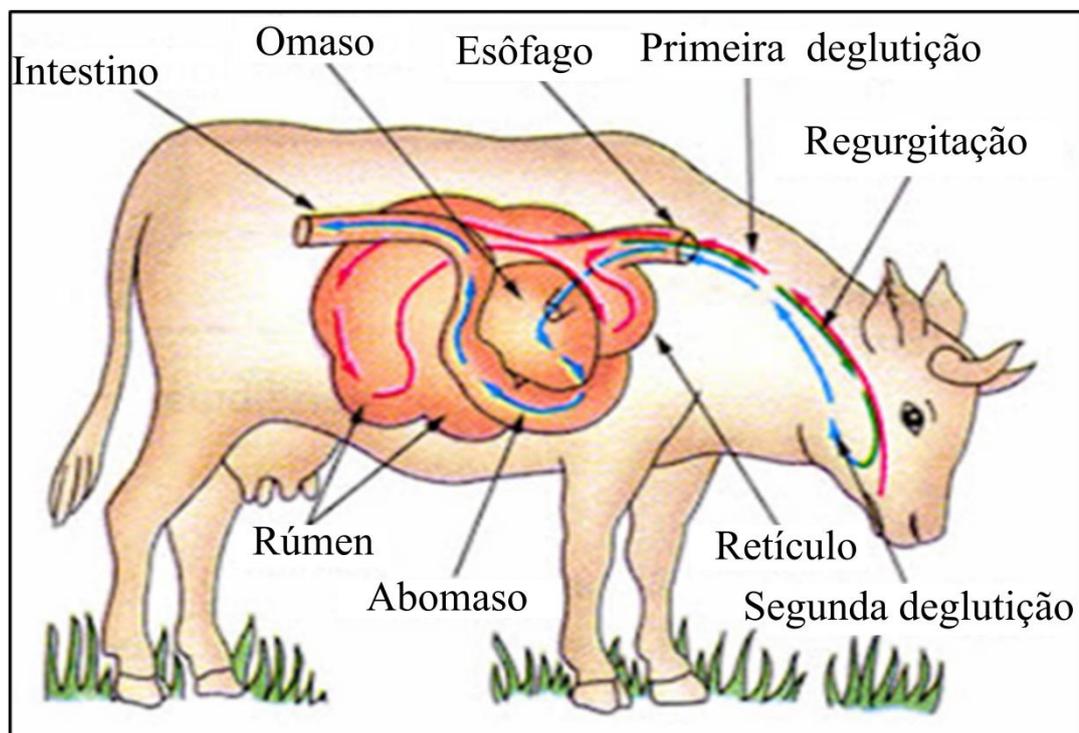
Entre os mamíferos herbívoros, os ruminantes são considerados os mais bem sucedidos, com ampla diversidade taxonômica e distribuição geográfica (FERNANDEZ; VRBA, 2005; JANIS, 2007; RODRIGUES, 2016). Os ruminantes estão agrupados em uma subordem de mamíferos Artiodáctilos, conhecida por Ruminantia, a qual compreende aproximadamente 200 espécies classificadas dentro de seis famílias: Tragulidae, Antilocapridae, Giraffidae, Bovidae, Cervidae e Moschidae (WILSON; REEDER, 2005; FERNANDEZ; VRBA, 2005). Uma das características que dá nome ao grupo é o fato de apresentarem o mecanismo de ruminação que pode ser definido como a regurgitação da ingesta fibrosa do rúmen à boca, remastigação e resalivação, seguida de uma deglutição e retorno do material para o rúmen (WELCH, 1982) (Figura 2).

A ruminação é considerada um comportamento inato dos ruminantes visto que ocorrem, em bovinos recém-nascidos de 5 a 8 dias e em ovinos de 3 a 5 dias, submetidos a uma alimentação com leite, movimentos irregulares de mastigação (MEMBRIVE, 2016).

Em geral, alguns ruminantes como bovinos, ovinos e caprinos começam a ruminar assim que começam a consumir rações sólidas desde a primeira semana de vida. Ao ingerir alimentos, os ruminantes mastigam muito rudimentarmente e, este alimento pouco mastigado, é transportada para o compartimento ruminoreticular. Neste compartimento, as rações absorvem água tornando-se turgescentes, aumentam a densidade, são misturadas ao conteúdo ruminal pré-existente, são fragmentadas por movimentos desencadeados na cavidade

ruminoreticular, e, são, inicialmente, digeridas pelos microrganismos ali existentes (WELCH, 1982). Após um determinado período, pequenas porções da ração ingerida são redirecionadas para a cavidade bucal passando pelo esôfago e faringe, e mastigadas uma segunda vez (WELCH, 1982) (Figura 2). Este processo de ruminação, em alguns animais começa de 30 a 70 min após a ingestão da ração, por exemplo em bovinos, e 20 a 45 min em ovinos, podendo consistir em quatro fases distintas: regurgitação, remastigação, resalivação e redeglutição (MEMBRIVE, 2016).

Figura 2. Ilustração do sistema digestivo de um ruminante adulto representando as partes do trato gastrointestinal e o caminho percorrido pelo processo de ruminação. As setas marcadas em vermelho representam a primeira deglutição do alimento, as setas representadas pela cor verde ilustram o caminho da regurgitação e as setas em azul, o caminho percorrido pelo alimento após a segunda deglutição.



Fonte: <http://bbmascote.blogspot.com/2012/11/processo-digestivo-na-vaca-de-leite-as.html> (acessado em 11 de Agosto de 2021).

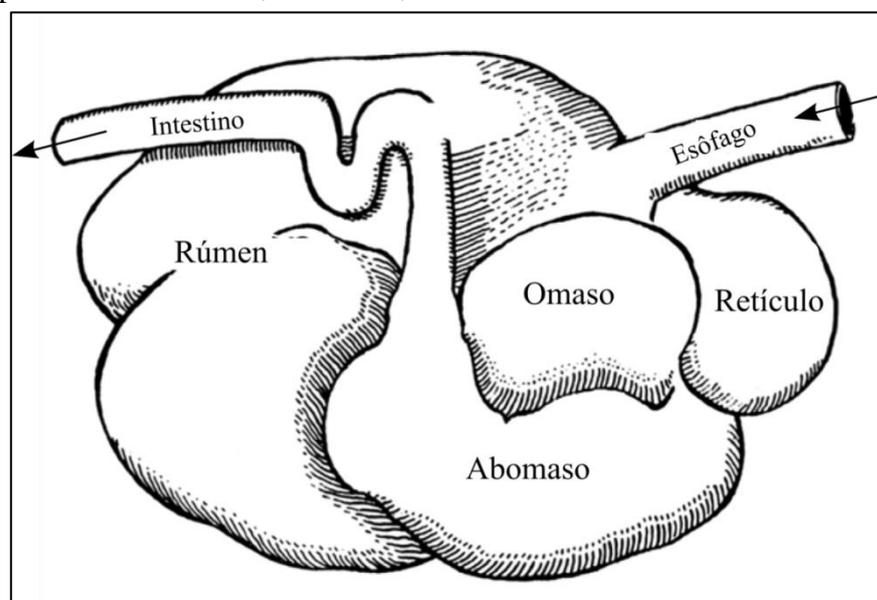
O processo de ruminação proporciona condições para que a ração ingerida seja suficientemente reduzida para passar do retículo ao omaso através do orifício retículo-omasal. Portanto, se a dieta for composta por rações contendo alto teor de fibras, o processo de ruminação torna-se fundamental para o ruminante porque, em sua ausência, a ração não seria fragmentada o suficiente para chegar ao omaso, interrompendo seu trânsito através do compartimento subsequente do tubo digestivo (MEMBRIVE, 2016). Por outro lado, a

ruminação permite uma aceleração da passagem da alimentação através dos pré-estômagos; caso contrário, a alimentação permaneceria lá por muito mais tempo até ficar reduzida a pequenas partículas de alimentação. Esta aceleração da passagem permite a ingestão de mais ração em um determinado período de tempo e, como resultado, uma maior quantidade de substratos ou nutrientes digeríveis fica disponível para o animal obter a energia necessária (MEMBRIVE, 2016).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO ECOSSISTEMA RUMINAL

O rúmen, também conhecido como a câmara fermentativa, constitui um compartimento fundamental dos mamíferos herbívoros ruminantes (RODRIGUES, 2016) (Figura 3), apresentando-se em um formato de saco com uma capacidade volumétrica média de 150-200 litros (MEMBRIVE, 2016; RODRIGUES, 2016). O interior do compartimento ruminoreticular se conecta ao esôfago e ao omaso, através de uma abertura localizada nas extremidades da ranhura reticular. O esôfago se abre dorsalmente para uma região comum aos compartimentos, rúmen e retículo. Posteriormente, o orifício reticular-omasal liga o retículo ao omaso. Este compartimento preenche a maior parte do antímero total esquerdo da cavidade abdominal e, através do segmento caudal-ventral, atravessa o plano médio e atinge a metade direita da cavidade abdominal (MEMBRIVE, 2016).

Figura 3. Representação esquemática do estômago de mamíferos ruminantes, com a ilustração dos compartimentos: Rúmen, Abomaso, Omaso e Retículo.



Fonte: <https://www.infoescola.com/animais/ruminantes/> (Acessado em 13 de Agosto de 2021).

Dentre as câmaras estômocais dos ruminantes, o rúmen, em especial, é colonizado por uma diversidade de microrganismos procariotos (bactérias e archeas) e eucariotos (protozoários ciliados e fungos), considerada uma das mais diversas populações do ecossistema microbiano da natureza (AGARWAL et al., 2015; COMTET-MARRE et al., 2017), desempenhando funções essenciais para os seus hospedeiros. Parte desses microrganismos são especializados na degradação de polissacarídeos vegetais e, portanto, constituem uma comunidade essencial para o fornecimento de energia ao animal hospedeiro (WHITE et al., 2014), ou seja, os ruminantes são capazes de digerir alimentos altamente fibrosos com a ajuda da digestão fermentativa realizada pelos microrganismos presentes no rúmen e no retículo (AGARWAL et al., 2015).

O processo de digestão ocorre pela influência de vários fatores nomeadamente, tempo de retenção das rações no retículo ruminal, mastigação e mistura de saliva, taxa de fluxo de digestão para omaso e parte inferior do trato digestivo, ação tamponante da saliva e remoção contínua dos metabólitos como ácidos graxos voláteis (VFA), amônia, dióxido de carbono e metano (WHITE et al., 2014). A maioria dos ácidos graxos voláteis e amônia que são resultantes desse processo de digestão são posteriormente absorvidos através das paredes dos compartimentos pré-abomasais principalmente por difusão, e os gases CO₂ (dióxido de carbono) e CH₄ (metano) são removidos durante a eructação (capacidade de eliminar os gases produzidos durante a fermentação para o ambiente externo através do esôfago, cavidades oral e anal) (RODRIGUES, 2016; LOZANO et al., 2017).

O processo de eructação é vital para a manutenção do pH no ambiente ruminal e sobrevivência do hospedeiro. No entanto, este processo representa perda de energia para o animal (entre 5-19% da energia oriunda da dieta), além de acarretar danos ambientais (emissão de até 60% de metano ao ambiente) (MALMUTHUGE; GUAN, 2017).

Tabela 1. Composição do ecossistema microbiano do rúmen.

Microrganismos	Número de organismos/g do conteúdo ruminal	Porcentagem da biomassa microbiana
Bacteria	10 ¹⁰ –10 ¹¹	40–50
Protozoa	10 ⁴ –10 ⁶	40–50
Archaea	10 ⁷ –10 ⁸	2–3
Fungos	10 ³ –10 ⁵	3–4

Fonte: Adaptado de AGARWAL et al. (2015) e ROSSI et al. (2017)

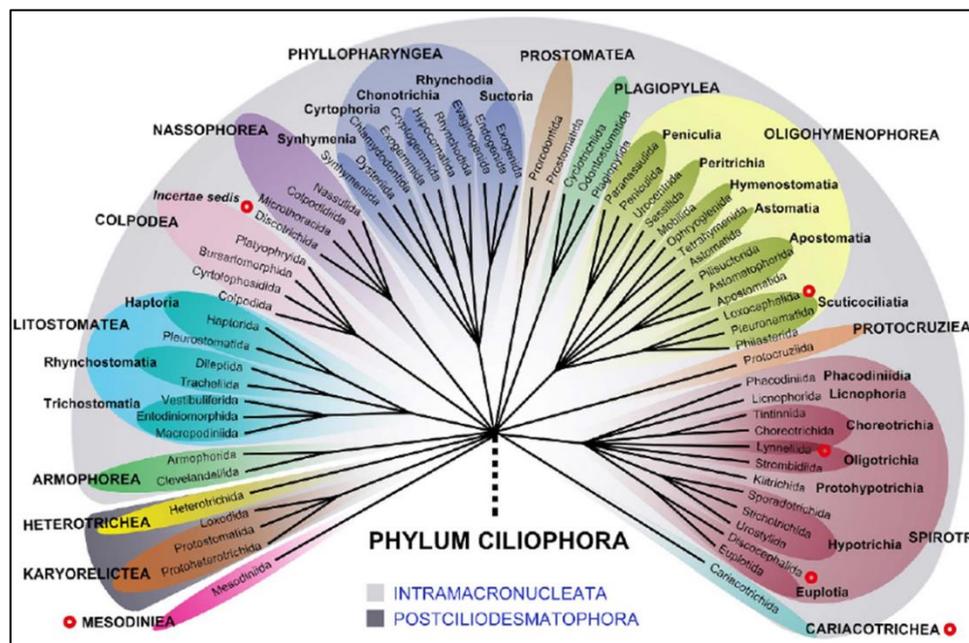
2.6 PROTISTAS CILIADOS DO RÚMEN

Os microeucariotos unicelulares ciliados (Alveolata, Ciliophora) compõem um grupo são amplamente diversificados morfologicamente e incluem mais de 8000 espécies descritas, das quais por volta de 3000 espécies são simbiossomas ou parasitas, sendo distribuídas em uma ampla gama de hospedeiros de invertebrados e vertebrados. Entre os ciliados simbióticos de vertebrados, uma porção significativa é encontrada em simbiose com mamíferos herbívoros, e são distribuídos principalmente em duas subclasses, Trichostomatia Bütschli e Suctoria Clapèrede & Lachmann (LYNN, 2008).

Na classificação de LYNN, 2008 a subclasse Trichostomatia é constituída por três ordens: Entodiniomorpha, Macropodiniida e Vestibuliferida, incluindo aproximadamente 1,000 espécies, 129 géneros e 21 famílias (mais recentemente com nova família proposta) (LI et al., 2022), sendo que a maior parte da diversidade de espécies da subclasse ocorre dentro das ordens Entodiniomorpha e Vestibuliferida (CEDROLA et al., 2020). As características que definem Ciliophora são: dimorfismo nuclear (presença de um macronúcleo e um ou mais micronúcleos), reprodução sexuada por meio de conjugação e presença de uma complexa infraciliatura (LYNN; CORLISS, 1991).

Embora a classificação de LYNN (2008) tenha sido muito útil para subseqüentes classificações, sabe-se que as análises moleculares sugerem a existência da bifurcação dos ciliados em dois clados maiores: Subfilo Intramacronucleata e Subfilo Postciliodesmatophora (Figura 4) (GAO et al., 2016).

Figura 4. Classificação do filo Ciliophora segundo GAO et al., 2016.



A ordem Vestibuliferida é composta por simbioses do trato gastro-intestinal de uma gama de vertebrados, tais como mamíferos placentários, aves, répteis, peixes, anfíbios e insetos, com exceção da espécie *Balantioides coli*, que é considerado o único ciliado que apresenta uma relação de parasitismo em primatas (CORLISS, 1979; WRIGHT, 2015), embora ocorra em outros organismos. No ambiente ruminal, os ciliados vestibuliferídeos estão representados pelas famílias Isotrichidae e Dasytrichidae (LI et al., 2022). Com aproximadamente 15 espécies, estas famílias apresentam ampla distribuição em mamíferos ruminantes, pseudoruminantes e no intestino de não-ruminantes (LYNN, 2008; WRIGHT, 2015; BARDELE et al., 2017).

A ordem Entodiniomorphida é caracterizada pela riqueza de espécies com aproximadamente 260 espécies, sendo amplamente encontradas como simbioses no trato gastrointestinal de diversos hospedeiros mamíferos das ordens Artiodactyla, Perissodactyla, Afrotheria e Rodentia (OGIMOTO; IMAI, 1981; WILLIAMS; COLLEMAN, 1992, LYNN, 2008). Dentro da ordem Entodiniomorphida, a família Ophryoscolecidae Stein, 1859 é considerada a mais diversa, englobando espécies de protistas ciliados que ocorrem somente no rúmen de mamíferos herbívoros ruminantes e pseudoruminantes (OGIMOTO; IMAI, 1981; WILLIAMS; COLLEMAN, 1992; WRIGHT, 2015).

Ophryoscolecidae, compreende aproximadamente 225 espécies de ciliados trichostomatídeos distribuídos ao longo das três subfamílias: Entodiniinae Lubinsky, 1957, Diplodiniinae Lubinsky, 1957, e Ophryoscolecinae Lubinsky, 1957 (CEDROLA et al., 2020). Estas subfamílias são muitas vezes associadas com mamíferos herbívoros ruminantes e participam em processos de digestão de alimentos vegetais ingeridos pelos seus hospedeiros (FIRKINS et al., 2020). Nesse sentido, questões relativas ao metabolismo desses ciliados têm sido intensamente estudadas (FIRKINS et al., 2020; NEWBOLD et al., 2015), enquanto questões relativas a sua sistemática ainda permanecem pouco compreendidas (CEDROLA et al., 2020).

A terceira ordem, Macropodiniida, é composta apenas por ciliados presentes no estômago (não rúmen) de marsupiais das famílias Macropodidae (cangurus, wallabies e wallaru) e Vombatidae (vombates) (LYNN, 2008; VĎAČNÝ, 2018).

2.7 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBFAMÍLIAS DE OPHRYOSCOLECIDAE

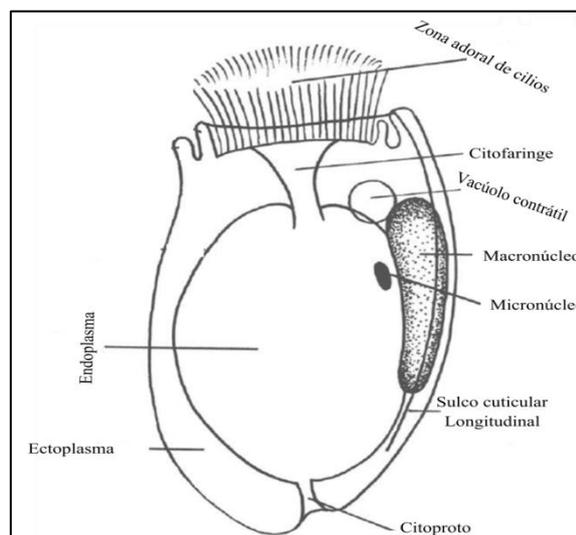
A família Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorphida) é formada por um grupo diverso de ciliados monofilético e simbioses de mamíferos herbívoros, essencialmente associados a ruminantes e pseudoruminantes (CEDROLA et al., 2020; FIRKINS et al., 2020).

Apresentam um papel fundamental no que diz respeito na influência do funcionamento ruminal da maioria dos seus hospedeiros (FIRKINS et al., 2020). Até agora, a família inclui aproximadamente 225 espécies, distribuídas em três subfamílias (Entodiniinae, Diplodiniinae e Ophryoscolecinae) e dezesseis gêneros (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Eodinium*, *Elytroplastron*, *Enoploplastron*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Metadinium*, *Ostracodinium*, *Polyplastron*, *Caloscolex*, *Epidinium*, *Epiplastron*, *Opistotrichum*, e *Ophryoscolex* (WILLIAMS; COLEMAN, 1992), classificados com base na morfologia do corpo, formato e posição dos núcleos, forma das placas esqueléticas, ciliatura e infraciliatura (WILLIAMS; COLEMAN, 1992). Asseguir ilustramos de forma geral e resumida a morfologia das três subfamílias mencionadas acima.

2.7.1 SUBFAMÍLIA ENTODININAE

É composta somente pelo gênero *Entodinium* e é caracterizada por apresentar uma única zona de ciliatura, zona de ciliatura adoral e, um único vacúolo contrátil (Figura 5) (LUBINSKY, 1957c). O gênero *Entodinium*, descrito pela primeira vez por Stein 1914, é caracterizado conforme o formato e tamanho corporal, morfologia do aparato nuclear, da citofaringe e do citoprocto, posição do vacúolo contrátil, além da presença e morfologia de processos caudais (OGIMOTO; IMAI, 1981; WILLIAMS; COLLEMAN, 1992). Alguns estudos (ITO; IMAI, 2006; MISHIMA et al., 2009) mostram que a morfologia da infraciliatura oral das espécies deste gênero tem acrescentado informações relevantes nos estudos morfológicos e taxonômicos das espécies deste grupo. O gênero *Entodinium* é o mais diverso entre os ciliados endossimbiontes de mamíferos herbívoros.

Figura 5. Ilustração da morfologia geral de protozoários da subfamília Entodiniinae.

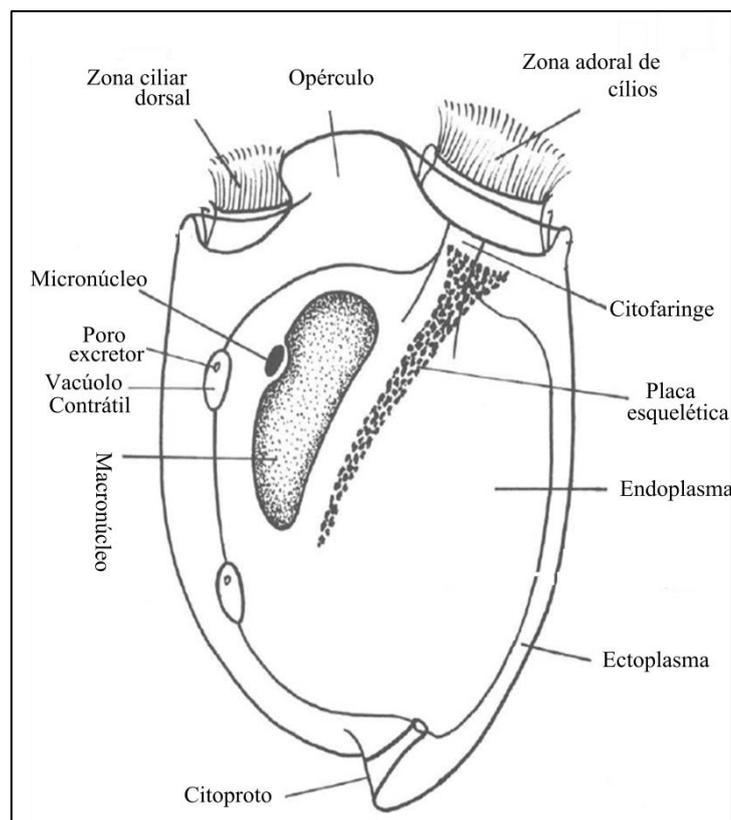


Fonte: Modificado de DEHORITY (1993)

2.7.2 SUBFAMÍLIA DIPLODINIINAE

Apresenta duas zonas de ciliatura, zona de ciliatura adoral e zona de ciliatura dorsal, situadas no mesmo plano transversal (Figura 6) (ROSSI et al., 2015). Dois ou mais vacúolos contráteis estão presentes e o micronúcleo situa-se entre o macronúcleo e a membrana corporal (OGIMOTO; IMAI, 1981). As placas esqueléticas podem estar presentes ou não. Esta subfamília inclui grande parte dos gêneros de ciliados que são comumente descritos no ambiente ruminal (*Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Diploplastron*, *Metadinium*, *Polyplastron*, *Elytroplastron*, *Enoploplastron* e *Ostracodinium* (LUBINSKY, 1957c).

Figura 6. Ilustração da morfologia geral de protozoários da subfamília Diploniinae.



Fonte: Modificado de DEHORITY (1993)

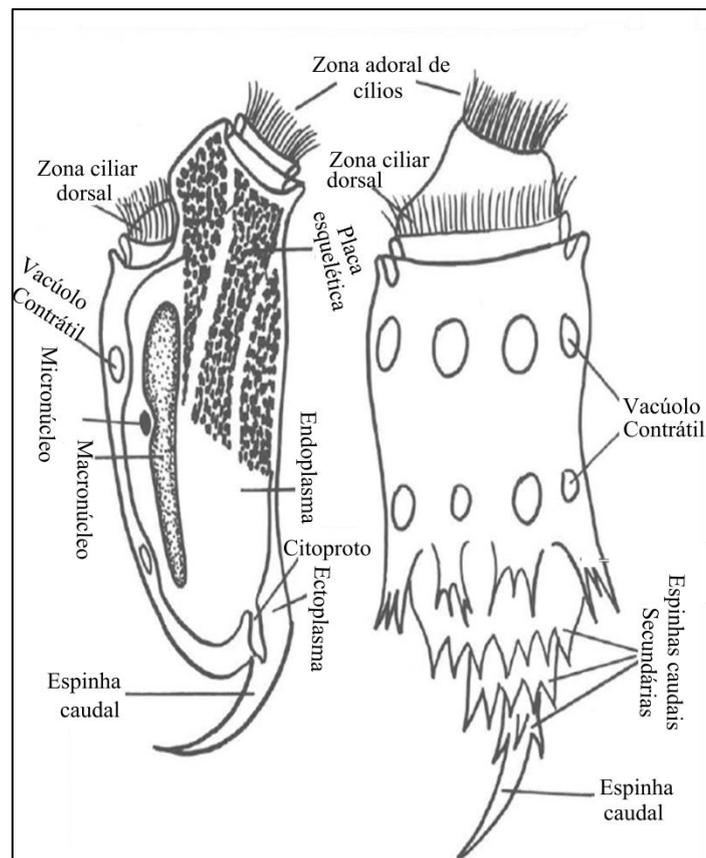
2.7.3 SUBFAMÍLIA OPHRYOSCOLECINAE

É composta pelos gêneros *Epidinium* e *Ophryoscolex* e, como acontece com subfamília Diploniinae, a subfamília Ophryoscolecinae também apresenta duas zonas de ciliatura, porém em planos transversais diferentes. Todos os ciliados desta subfamília

apresentam placas esqueléticas, dois ou mais vacúolos contráteis e o micronúcleo situa-se entre o macronúcleo e a membrana corporal (Figura 7) (LUBINSKY, 1957c).

Os membros do gênero *Epidinium* são caracterizados por um corpo cilíndrico e relativamente longo, com 109 x 46 µm de comprimento, e uma zona ciliar dorsal deslocada posteriormente da zona oral. As espécies do gênero *Epidinium* possuem três placas esqueléticas descritas como dorsal, mediana e ventral. Embora estas placas sejam características do gênero, elas nem sempre são fáceis de observar e a maneira mais simples de identificar o gênero é pela sua forma do corpo. Embora o gênero tenha sido descrito pela primeira vez por FIORENTINI (1889), ele foi classificado como *Diplodinium* e *Ophryoscolex* antes de CRAWLEY (1923) estabelecer o gênero *Epidinium*.

Figura 7- Ilustração da morfologia geral de protozoários da subfamília Ophryoscolecinae.



Fonte: Adaptado de DEHORITY (1993)

Ainda dentro da subfamília Ophryoscolecinae, encontramos ciliados do gênero *Ophryoscolex* descrito pela primeira vez por STEIN (1858). Os organismos deste gênero são os mais complexos vistos estruturalmente e distintos dos protozoários do grupo entodiniomorfo encontrados no rúmen de mamíferos. São geralmente caracterizados por uma formidável variedade de espinhos caudais. A zona dorsal dos cílios é deslocada posteriormente cerca de um terço do comprimento do corpo e forma uma cintura em torno de

três quartos da circunferência do corpo, que é aproximadamente circular em seção transversal. Existem três placas esqueléticas compridas abaixo da superfície direita do corpo (WILLIAMS; COLEMAN, 1992).

Em termos de complexidade estrutural, FURNESS; BUTLER (1988) sugeriram que Ophryoscolecinae apresentam maior complexidade em seu aparelho oral e, portanto, são capazes de fazerem a ingestão de partículas/fibras maiores; Diplodiniinae são capazes de ingerirem fibras contendo fragmentos de tamanho intermediário, e os representantes da subfamília Entodiniinae ingerem fibras menores incluindo bactérias (ROSSI et al., 2015).

Outra característica marcante na família Ophryoscolecidae é a presença da infraciliatura e de acordo com o tipo, existem 12 padrões de infraciliatura oral descritas para família Ophryoscolecidae, nomeadamente: *Entodinium*-tipo, *Diplodinium*-tipo *Diplodinium polygonale*-tipo, *Diplodinium leche*-tipo, *Diplodinium nanum*-tipo, *Eodinium posterovesiculatum*-tipo, *Ostracodinium gracile*-tipo, *Ostracodinium mammosum*-tipo, *Ostracodinium damaliscus*-tipo, *Enoploplastron stoky*-tipo, *Epidinium*-tipo e *Ophryoscolex*-tipo (FERNANDEZ-GALIANO 1959; NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; ITO et al., 1997; ITO; IMAI 1998, 2003, 2005, 2006; ITO et al., 2001, 2002; MISHIMA et al., 2009). ROSSI et al. (2015) sugeriram que a morfologia da infraestrutura oral dentro da subfamília Ophryoscolecidae pode refletir genuinamente divergência evolutiva para o grupo.

2.8 INTERAÇÃO DOS CILIADOS COM OUTROS MICRORGANISMOS DO RÚMEN

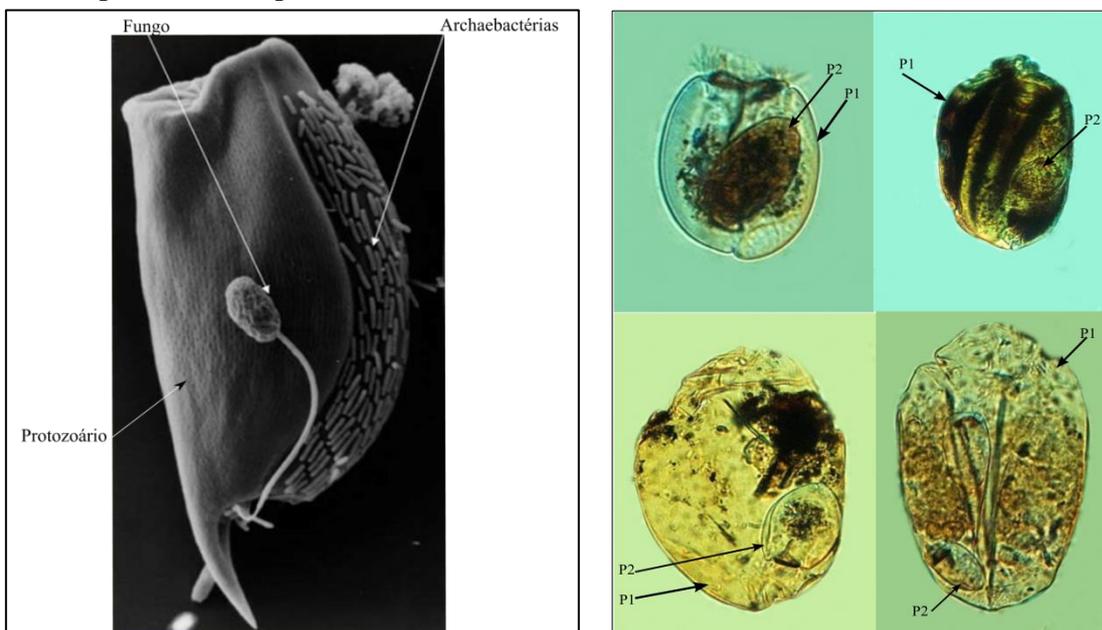
O rúmen, como dizemos anteriormente, apresenta características que mantêm as populações microbianas (KOZLOSKI, 2011, WLODARSK et al., 2017). Por outro lado, DEHORITY (2004) descreve que as interações entre as populações de microrganismos ruminais podem ser de três tipos: parasitismo, onde um microrganismo é favorecido perante algum dano causado a outro; mutualismo, quando os dois são beneficiados, e, comensalismo, quando somente um microrganismo se beneficia e o outro não sofre efeitos (WLODARSK et al., 2017).

No entanto, um comportamento peculiar dos protozoários ciliados do rúmen pode ser constatado (predação), diminuindo a biomassa bacteriana encontrada na forma livre no ambiente (HSU et al., 1991; WLODARSK et al., 2017), e ao mesmo tempo, interfere no número e totalidade das bactérias ruminais (WLODARSK et al., 2017). Além disso, os protozoários ciliados de menor tamanho no rúmen, principalmente os do gênero *Entodinium*, são predados por espécies de maior tamanho, por exemplo, *Diplodinium*, *Polyplastrum*, *Ostracodinium* (FRANZOLIN; DERORITY, 1999). Devido a essa característica predatória

dos ciliados do rúmen, alguns autores (DEHORITY; ORPIN, 1997; WLODARSK et al., 2017) indicam que esta poderia ser a causa da grande diversidade morfológica para espécies que ocupam o ambiente ruminal.

Na interação entre os microrganismos do rúmen, alguns são extremamente dependentes de outros, principalmente em relação ao suprimento de nutrientes, como também aagem de forma antagonista entre si liberando componentes antimicrobianos (WRIGHT et al., 2004; KAMRA, 2005). As interações e interrelações entre as populações de microrganismos ruminais podem apresentar efeito positivo ou negativo, o qual interfere diretamente no hospedeiro, principalmente sobre a digestibilidade e aproveitamento dos nutrientes ingeridos (WLODARSK et al., 2017).

Figura 8. Ilustração sobre a interação de protozoários do rúmen com outros microrganismos (primeira figura) e fotomicrografias evidenciando o comportamento de predação em protozoários ciliados (segunda figura). Legenda: P1 (predador) e P2 (presa). P1-predador; P2-presa



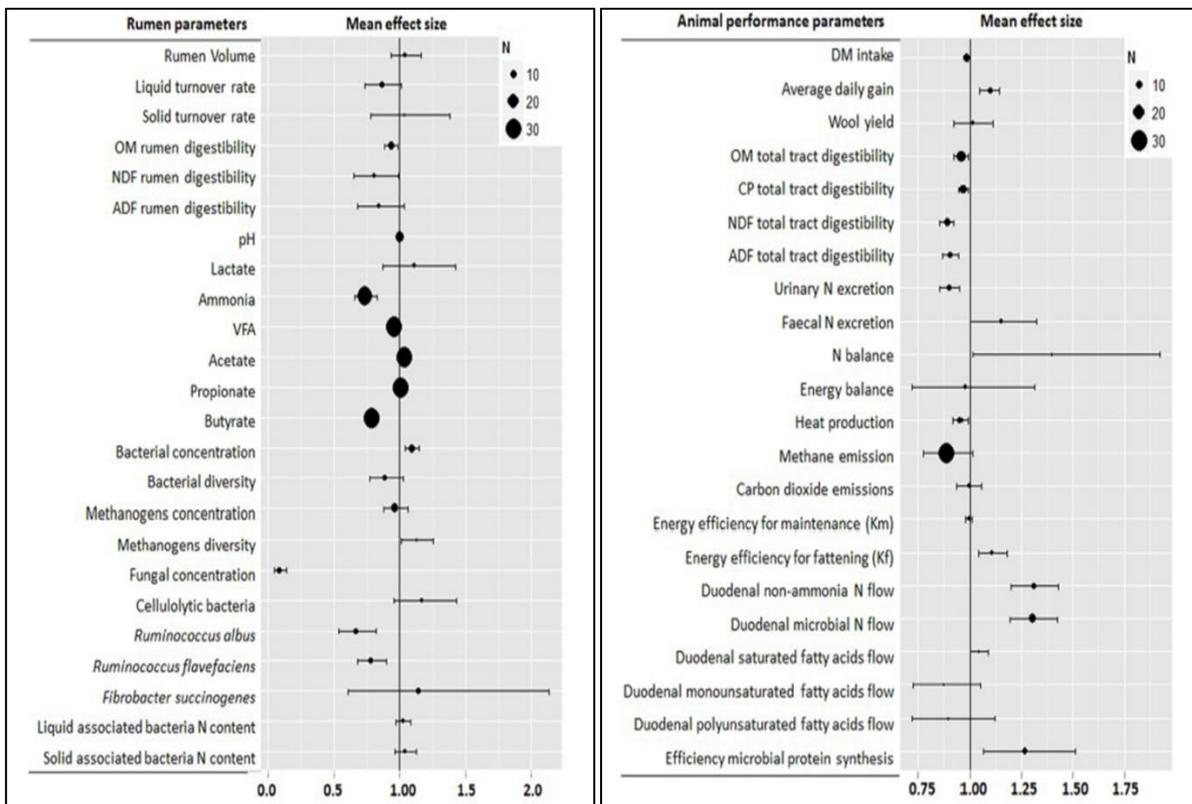
Fonte: Modificado de KOZLOSKI (2011)

Fonte : Elaborado pelo autor (2022)

A importância dos ciliados do rúmen vai além da criação de equilíbrio microbiano, porque a defaunação como processo de remoção de protozoários usando uma larga variedade de técnicas químicas e físicas, revela alterações nos parâmetros do rúmen e no desempenho ou produtividade do animal (Figura 9). Entre os parâmetros ruminais afetados pela remoção dos protozoários, destacamos: diminuição da digestibilidade ruminal, diminuição das quantidades de amônia ruminal, diminuição da quantidade dos ácidos graxos voláteis do rúmen, entre outros (NEWBOLD et al., 2015). E em relação aos efeitos no desempenho do animal, pode-se

mencionar a digestibilidade alimentar baixa, energia absorvida baixa entre outros (NEWBOLD et al., 2015).

Figura 9. Efeito da defaunação nas funções ruminais e desempenho animal. Legenda: OM- Maéria orgânica; NDF- Fibras detergentes neutras; ADF- Fibras detergente acidificadas; DM- Matéria seca; CP- Proteína bruta.



Fonte: NEWBOLD et al. (2015)

2.9 IMPORTÂNCIA DA TAXONOMIA NOS ESTUDOS DE CILIADOS DO RÚMEN

Os estudos taxonômicos são necessários para o conhecimento da biodiversidade existente, sobretudo, com a perda contínua das espécies conhecidas e não conhecidas. Estima-se que nos últimos meio bilhão de anos, a perda das espécies desde os microrganismos aos macrorganismos, seja entre 1000 e 10 000 vezes mais rápida (WILSON, 2003, THALER, 2021). Nos tempos atuais, acredita-se que o conhecimento das espécies viventes esteja a quem da realidade, embora alguns estudos estejam estimando entre 5 a 100 milhões de espécies (WILSON, 2003, THALER, 2021). Apesar das estimativas, apenas 2 milhões foram cientificamente identificadas e descritas (CHERIAN, 2004), daí a necessidade e importância dos estudos taxonômicos de macro e microrganismos.

Estes estudos taxonômicos facilitam o reconhecimento e a descrição das espécies, e propõem as relações ocupadas em um determinado meio, tornando-se um elemento

significativo do estudo da biodiversidade microbiana (CHEN et al., 2016). Um dos clássicos usos da taxonomia envolve estudos baseados nos conhecimentos morfológicos, etológicos e ecológicos. Nas últimas décadas, as análises filogenéticas baseadas em pesquisas com conhecimentos de dados moleculares em Ciliophora, têm contribuído bastante para o aperfeiçoamento dos estudos taxonômicos e sobre sistemática para o grupo (GENTEKAKI et al., 2014; ZHANG et al., 2014; CHEN et al., 2015; LUO et al., 2015; WANG et al., 2015; CHEN et al., 2016).

2.10 MÉTODOS PARA ESTUDOS TAXONÔMICOS DE PROTISTAS CILIADOS

Desde a sua descoberta em 1843 por Gruby e Delafond, os protozoários ciliados do rúmen de mamíferos herbívoros têm sido estudados ao redor do mundo (ITO et al., 1995; SANTRA et al., 1998; GÖÇMEN et al., 2002; MERMER et al., 2003; GÖÇMEN; KARAOGLU, 2005; CARVALHO et al., 2011; GÜRELLI et al., 2016; EBRAHIMI et al., 2018). Porém, os protistas do rúmen constituem um grupo morfológicamente diverso, e por isso, poucos são os métodos capazes de revelar todos os detalhes para uma descrição adequada e completa para todos os grupos de ciliados (FOISSNER, 2014). A descrição de protistas ciliados do rúmen requer, no mínimo, uma coloração com solução à base de iodo e impregnação pelo carbonato de prata. No entanto, observações *in vivo*, colorações com solução de verde brilhante, coloração de protargol, e a utilização da microscopia eletrônica de varredura proporcionam uma ampla gama de caracteres morfológicos essenciais nas descrições taxonômicas dos ciliados (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; IMAI; OGIMOTO, 1978; OGIMOTO; IMAI, 1981; D'AGOSTO; SANTA-ROSA, 1994; D'AGOSTO; CARNEIRO, 1999; ITO; IMAI, 2006).

As observações *in vivo* são essenciais nos estudos taxonômicos pelo fato de permitirem a descrição de informações que não são possíveis identificar em preparações fixadas, porém, devido às dificuldades para manter os microrganismos com vida durante muito tempo em laboratório, são raras as observações de ciliados *in vivo* (SHARP, 1914; KOFOID; MACLENNAN, 1933; NOIROT-TIMOTHÉE, 1960; FOISSNER, 2014; CEDROLA et al., 2015). Existem dois tipos de sistemas para cultivo de ciliados: o sistema de lotes e o sistema de cultura contínua ou rúmen artificial (OGIMOTO; IMAI, 1981), que são caracterizados por serem dois sistemas despendiosos.

Como uma alternativa para observações de ciliados do rúmen *in vivo*, as amostras do conteúdo ruminal podem ser conservadas em recipientes térmicos permitindo a sobrevivência de microrganismos em especial Ophryoscolecidae e Isotrichidae em um período de

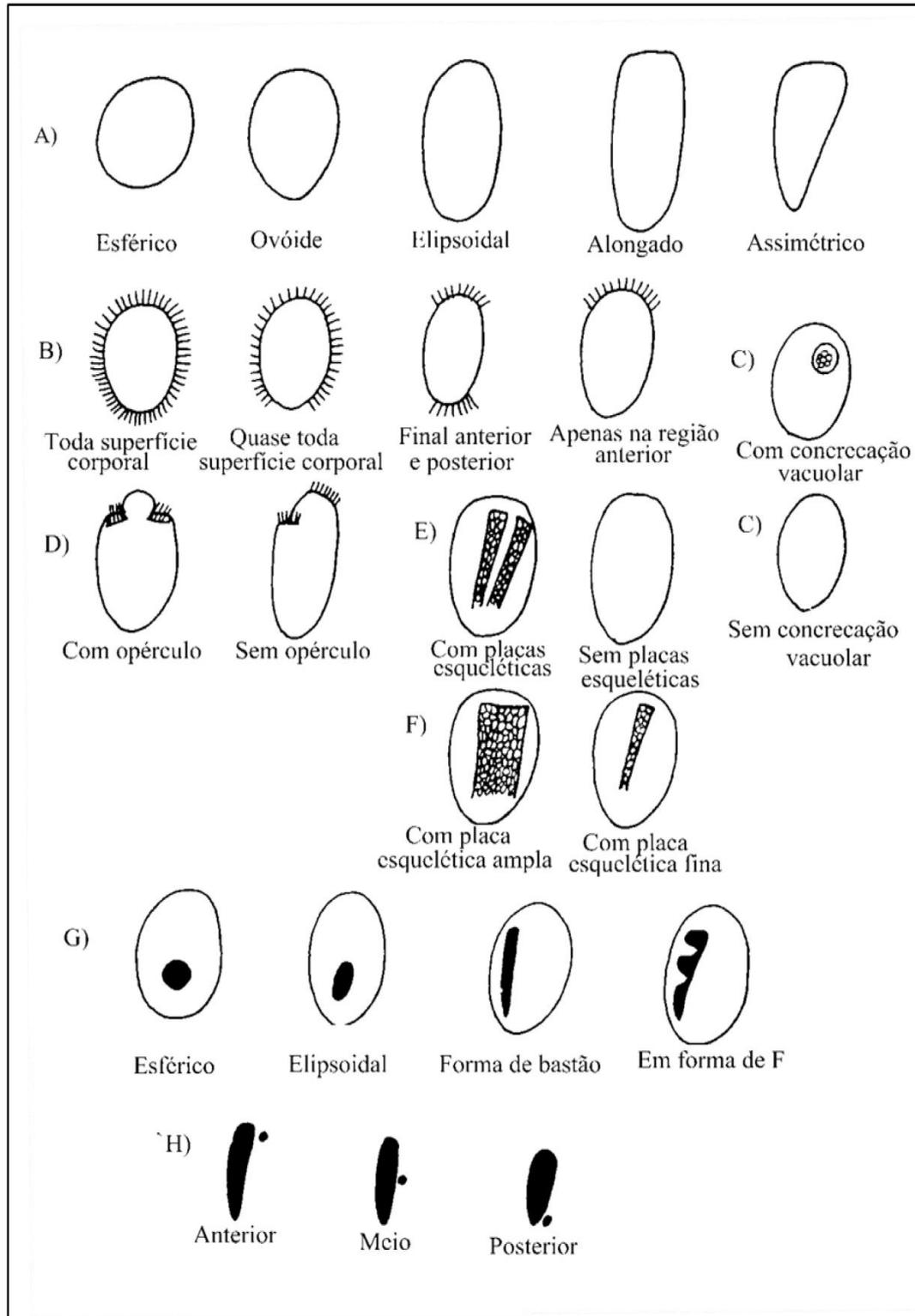
aproximadamente 12h, tempo suficiente para um estudo taxonômico (CEDROLA et al., 2015). As observações *in vivo* permitem analisar as seguintes características: o aspecto das zonas ciliares, forma e coloração do corpo, morfologia do vestíbulo, presença ou ausência de vacuolos contráteis, número e posição de vacúolos contráteis, forma e posição do aparato nuclear, citoprote, e do comportamento dos organismos (Tabela 2) (CEDROLA et al., 2015).

As técnicas de preparação semipermanentes, à base de iodo e de verde brilhantes, são mais comuns nos estudos e revelam importantes traços taxonômicos usados para identificação de gêneros de protistas ciliados (KOFOID; MACLENNAN, 1932; KOFOID; CHRISTENSON, 1933; CLARKE, 1964; DEHORITY, 1984; IMAI, 1988; WILLIAMS; COLEMAN, 1992; D'AGOSTO; CARNEIRO, 1999) (Figura 10). A preparação semipermanente à base de iodo é uma técnica mais adequada para visualização das placas esqueléticas por estas terem afinidade com polissacarídeos. A técnica, preparação à base de iodo, é caracterizada por ser prática, rápida e de fácil reprodução para estudos de ciliados de mamíferos herbívoros (D'AGOSTO; CARNEIRO, 1999). Para visualização de aparatos nucleares dos ciliados, as preparações com verde brilhante são as mais adequadas, sendo as técnicas mais frequentes utilizadas no estudo de ciliados do rúmen (CLARKE, 1964; OGIMOTO; IMAI, 1981; DEHORITY, 1984; CEDROLA, et al., 2015).

Por outro lado, as técnicas que utilizam preparações semipermanentes possibilitam a visualização com detalhes dos caracteres taxonômicos (D'AGOSTO; SANTA-ROSA, 1994; ITO; IMAI, 1998). A técnica de impregnação pelo carbonato de prata descrita pela primeira vez por FERNANDEZ-GALIANO (1976) é rotineiramente usada em estudos taxonômicos de ciliados do rúmen por destacar de forma adequada a infraciliatura oral e somática, bem como, os aparatos nucleares de muitos grupos de ciliados, em especial, Ophryoscolecidae (Tabela 2) (MISHIMA et al., 2009).

Os microscópios eletrônico de varredura e o microscópio de transmissão são ferramentas frequentemente utilizadas nos estudos taxonômicos de ciliados do rúmen (GÜRELLI, 2017). Estas ferramentas, são capazes de mostrar detalhes morfológicos tais como: a ornamentação da superfície externa e os arranjos dos kinetosomas que se formam na região oral da infraciliatura somática, estriações membranosas, poros de vacúolos contráteis, detalhes da ciliatura oral e somática e detalhes morfológicos de lobos ou espinhas na região posterior do corpo (Tabela 2) (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960); IMAI; OGIMOTO, 1978; IMAI; TASHIRO, 1982; IMAI, 1988; IMAI et al., 1992; FOISSNER, 2014; CEDROLA, 2015).

Figura 10. Alguns caracteres morfológicos para identificação de gêneros de ciliados de mamíferos herbívoros. A) Formato corporal; B) Localização das zonas ciliares; C) Vacúolo de concreção; D) Opérculo; E) Placas esqueléticas; F) Formato das placas esqueléticas; G) Formas dos macronúcleos; H) Localização dos micronúcleos.



Fonte: Modificado de OGIMOTO; IMAI (1981)

Tabela 2. Principais estruturas ciliares reveladas por métodos morfológicos. MEV- Microscópio electrónico de varredura, MFS- methyl green formalin-saline , ++ excelente, + Bom, +/- efetivo as vezes, - não revelado.

Estruturas reveladas	Observação em vivo	Solução de Lugol	Solução MFS	Protargol	Carbonato de prata	MEV
Aparato nuclear	+	+/-	++	++	++	-
Zonas ciliares	++	+/-	+/-	+	-	+
Citoprote	+	++	+	+	+	+
Coloração corporal	+	-	-	-	-	-
Ornamentação na superfície corporal	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Forma do corpo	++	+	+	+	+	+
Bandas infraciliares	-	-	-	+/-	++	-
Placas esqueléticas	+	++	+/-	+/-	+/-	-
Lobos caudais ou espinhas	++	++	++	++	++	++
Vacúolos contráteis	++	+	+/-	+/-	+/-	-
Forma do vestíbulo	++	+	+	+/-	+/-	-

Fonte: Adaptado de CEDROLA et al. (2015)

Os dados moleculares e filogenéticos, têm sido usados em estudos de protistas ciliados de mamíferos herbívoros ajudando no esclarecimento da história evolutiva e nas relações filogenéticas das espécies (WRIGHT et al., 1997; WRIGHT; LYNN, 1997; MODEO et al., 2006, 2013). Numerosas técnicas tais como: RFLP (restriction fragment length polymorphism) (REGENSBOGENOVA et al., 2004a; TYMENSEN et al., 2012), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (REGENSBOGENOVA et al., 2004b; MCEWAN et al., 2005; DE LA FUENTE et al., 2009; BELANCHE et al., 2010; KITTELMANN; JANSSEN, 2011), qPCR (real-time polymerase chain) (SYLVESTER et al., 2004; SKILLMAN et al., 2006; BELANCHE et al., 2010; KITTELMANN; JANSSEN, 2011) e o sequenciamento de nova geração (NGS) (KITTELMANN et al., 2013; ISHAQ; WRIGHT, 2014), têm revelado serem úteis em estudos com ciliados do rúmen que colonizam diferentes mamíferos herbívoros. O uso dessas ferramentas tem se mostrado importante no estudo da diversidade microbiana do rúmen, permitindo resultados promissores na identificação, descrição ou redescricao de gêneros e espécies que não eram observados anteriormente com o uso de técnicas tradicionais.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, N.; KAMRA, D. N.; CHAUDHARY, L. C. Rumen microbial ecosystem of domesticated ruminants. In *Rumen microbiology: from evolution to revolution*. Springer, New Delhi, 17-30, 2015
- BARDELE, C.F. *Aviisotricha hoazini* n. gen., n. sp., the Morphology and Molecular Phylogeny of an Anaerobic Ciliate from the Crop of the Hoatzin (*Opisthocomus hoazin*), the Cow Among the Birds. **Protist**, 168:335-351, 2017
- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; DREIER, C. Biodiversidade dos Campos de Cinema da Serra. **Libretos**, 2 edição, Porto Alegre, 2010.
- BELANCHE, A.; BALCELLS, J.; DE LA FUENTE, G.; YAÑEZ-RUIZ, D.R.; FONDEVILA, M.; CALLEJA, L. Description of development of rumen ecosystem by PCR assay in milk-fed, weaned and finished lambs in an intensive fattening system. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 94:648–658, 2010
- CARVALHO, L.F.P.B.; AMORIM, G. L.; MATOS, D.S.; BATISTA, A.M.V.; MORAES, A.C.A.; CABRAL, A. M.D. Protozoários do rúmen de caprinos submetidos a dieta com casca de soja. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 12(1), 244–253, 2011.
- CEDROLA, F.; ROSSI, M.; ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS, R.J.P.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. **Zoological Science**, 32: 8–15. 2015
- CAMPBELL, N. A. *Biology* (4th edition) Benjamin Cummings, New York. 1996.
- CEDROLA, F.; SENRA, M.V.X.; ROSSI, M.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R.J.P. Trichostomatid Ciliates (Alveolata, Ciliophora, Trichostomatia) Systematics and Diversity: Past, Present, and Future. **Frontiers Microbiology**, 10, 2967, 2020.
- CEDROLA, F.; SENRA, M, V,X.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R,J.P. Insights into the systematics of the family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorphida). **Eukaryotic Microbiology**, e12915, 2022, <https://doi.org/10.1111/jeu.12915>
- CLARKE, R.T.J. Ciliates of the rumen of domestic cattle (*Bos taurus* L.). *New Zealand Journal of Agricultural Research* 7: 248–257, 1964
- CHEN, X., MA, H., AL-RASHEID, K.A.S., MIAO, M. Molecular data suggests the ciliate *Mesodinium* (Protista: Ciliophora) might represent an undescribed taxon at class level. **Zoological Systematic**, 40, 31–40. 2015
- CHEN, X., PAN, H.B., HUANG, J., WARREN, A., AL-FARRAJ, S.A., GAO, S. New considerations on the phylogeny of ciliates (Protozoa, Ciliophora): expanded sampling to understand their evolutionary relationships. **Zoologica Scripta**, 45, 334–348, 2016.

CHERIAN, P.T. Getting the Measure of India's Insect Diversity: 41-54. Perspectives on Biosystematics and Biodiversity (eds. Rajmohana K., Sudheer K, Girish P & Santosh S) TCN Com.vol. March 2004:1-666, 2004.

COMTET-MARRE, S.; PARISOT, N.; LEPERCQ, P.; CHAUCHEYRAS-DURANDI, F.; MOSONI, P.; ERIC, P.; BAYAT, A.R.; SHINGFIELD, K.J.; PEYRET, P.; FORANO, E. Metatranscriptomics Reveals the Active Bacterial and Eukaryotic Fibrolytic Communities in the Rumen of Dairy Cow Fed a Mixed Diet. **Frontiers in Microbiology**, 8:1-13, 2017.

CORLISS, J. The ciliated protozoa; characterization, classification and guide to the literature. 2nd ed. Oxford: **Pergamon Press**, 455p, 1979.

CRAWLEY, H. Evolution in the family Ophryoscolecidae. **Proceedings National Academy of Science, U.S.A.** 75, 393-412. 1978

D'AGOSTO M.; CARNEIRO M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16: 725-729, 1999

D'AGOSTO M.; SANTA-ROSA M.R. Aspectos morfológicos de ciliados de rúmen (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) revelados pelas técnicas do protargol e da reação de Feulgen. **Revista Brasileira de Zoologia**, 11: 215-225, 1994.

DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; ABECIA, L.; DEHORITY, B.A.; FONDEVILA, M. Rumen protozoal diversity in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) as compared with domestic goats (*Capra hircus*). **European Journal of Protistology**, 45: 112-120, 2009.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, 48: 182-185, 1984.

DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**, CRC Press. 1993.

DEHORITY, B. A. Rumen microbiology. Nottingham: Nottingham University Press, 2nd ed. 2004. 372 p.

DEHORITY, B. A.; ORPIN, G.C. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. The Rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson and C. S. Stewart. **Blackie Academic**, 1997, 2:196-245

EBRAHIMI, S.H.; VALIZADEH, R.; MIRI, V.H. Rumen Microbial Community of Saanen Goats Adapted to a High-Fiber Diet in the Northeast of Iran. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, 8(2), 271-279, 2018.

FERNÁNDEZ, M.H.; VRBA, E.S. A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. **Biological Reviews**, 80: 269-302, 2005.

FERNANDEZ-GALIANO, D. Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with pyritinated silver carbonate method. **Transactions of the American Microscopical Society**, 95: 557–560, 1976.

FERNANDEZ-GALIANO, D. La infraciliación en *Cycloposthium edentatum* Strelkow. **Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural**, 57:139–150, 1959

FIRKINS, J.L.; YU, Z.; PARK, T.; PLANK, J.E. Extending Burk Dehority's perspectives on the role of ciliate protozoa in the rumen. **Frontiers in Microbiology**, 11, 123,2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00123>

FIorentini, A. Intorno ai Protisti Stomaco dei Bovini. Pavia: **Frat Fusi**,1889

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. Comparison of protozoal populations and digestion rates between water buffalo and cattle fed an all forage diet. **Journal Applied Animal Research**, 16(1):33–46, 1999

FOISSNER, W. An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa'. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, 64: 271–292, 2014

FURNESS, D. N.; BUTLER, R. D. The functional and evolutionary significance of the ultrastructural of the Ophryoscolecidae (Order Entodiniomorphida). **Journal of Protozoology**, 35:34–38, 1988

GAO, F.; HUANG, J.; ZHAO, Y.; LI, L.; LIU, W.; MIAO, M.; ZHANG, Q.; LI, J.; YI, Z.; EL-SEREHY, H.A.; WARREN, A.; SONG, W. Systematic studies on ciliates (Alveolata, Ciliophora) in China: progress and achievements based on molecular information. **European Journal of Protistology**, 61, 409–423. 2017

GEISLE, J.H.; UHEN, M. Phylogenetic Relationships of Extinct Cetartiodactyls: Results of Simultaneous Analyses of Molecular, Morphological, and Stratigraphic Data. **Journal of Mammalian Evolution**, 12(1-2):145–160. 2005

GENTEKAKI, E., KOLISKO, M., BOSCARO, V., BRIGHT, K.J., DINI, F., DI GIUSEPPE, G., GONG, Y., MICELI, C., MODEO, L., MOLESTINA, R.E., PETRONI, G., PUCCIARELLI, S., ROGER, A.J., STROM, S.L., LYNN, D.H. Large-scale phylogenomic analysis reveals the phylogenetic position of the problematic taxon *Protocruzia* and unravels the deep phylogenetic affinities of the ciliate lineages. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 78, 36–42, 2014.

GÜRELLI, G.; DAW, A.F.O.E. Endosymbiotic Ciliated Protozoan Biota of Dromedary Camels and Domestic Cattle in Tunisia. **Zootaxa**, 4859(3), 409–418, 2020. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4859.3.6>.

GÜRELLI, G.; CANBULAT, S.; ALDAYAROV, N.; DEHORITY, B.A. Rumen ciliate protozoa of domestic sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra aegagrus hircus*) in Kyrgyzstan. **FEMS Microbiology Letters**, 363, 6, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw028>

- GÜRELLİ, G. Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep (*Ovis aries*) in İzmir, Turkey and Scanning Electron Microscopic Observations. **Zootaxa**, 4286(4), 545.2017. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4286.4.7>
- GÖÇMEN, B.; DEHORITY, B. A.; RASTGELDI, S. The Occurrence of the Rumen Ciliate *Metadinium banksi* Dehority, 1985. (Ophryoscolecidae, Entodiniomorphida) from Domestic Goats (*Capra hircus* L.) in South eastern Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 26, 367–370, 2002.
- GÖÇMEN, B.; KARAOĞLU, A. Entodiniid Ciliates (Entodiniidae, Entodiniomorphida) Living In The Rumen Of Domesticated Goats (*Capra hircus* L.) in Southeastern Turkey, **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 29 (3), 211–218, 2005.
- GRUBY, D.; DELAFOND, O. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans l'intestins, pendant la digestion des animaux herbivores e carnivores. **Comptes Rendus Academic Science Hebdomadaires Seances**, 17: 1304–1308, 1843
- HSU, J. T.; FAHEY, G.C.; MARCHEN, JR.N.R.; MACKIE, R.I. Effects of defaunation and various nitrogen supplementation regimens on microbial numbers and activity in the rumen of sheep. **Journal of Animal Science**, 69:1279, 1991
- HUME, I. D.; WARNER, A. C. I. Evolution of microbial digestion in mammals. In Digestive physiology and metabolism in ruminants (pp. 665-684). **Springer**, Dordrecht, 1980
- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary bands in rumen ophryoscolecid ciliate, *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), observed by light microscopy. **Journal of Eukaryotic and Microbiology**, 45:628–636.1998
- ITO, A.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S. Light microscopic observations of infraciliature and morphogenesis in six species of rumen *Ostracodinium ciliates*. **Journal of Eukaryotic and Microbiology**, 48:440–448, 2001.
- ITO, A.; IMAI, S. Light microscopical observation of infraciliary bands of *Eodinium postero-vesiculatum* in comparison with *Entodinium bursa* and *Diplodinium dentatum*. **Journal of Eukaryotic and Microbiology**, 50:34–42. 2003.
- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliature and morphogenesis in three rumen *Diplodinium* Ciliates, *Diplodinium polygonale*, *Diplodinium leche*, and *Diplodinium nanum*, observed by light microscopy. **Journal of Eukaryotic and Microbiology**, 52:44–51. 2005.
- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary band pattern of rumen ophryoscolecid ciliates. **Endocrinology Cell Research**, 17: 103–110, 2006.
- ITO, A.; IMAI, S.; MANDA, M.; OGIMOTO, K. Rumen ciliates of Tokara Native Goat in Kagoshima, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, 57(2), 355–357, 1995. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.355>

ITO, A.; ARAI, N.; TSUTSUMI, Y.; IMAI, S. Ciliate protozoa in the rumen of sassaby antelope, *Damaliscus lunatus lunatus*, including the description of a new species and form. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 44:586–591.1997.

ITO, A.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S. Descriptions of new Parentodinium ciliates in the family Parentodiniidae n. fam, from *Hippopotamus amphibius* in comparison with some entodiniomorphs from horses and cattle. **European Journal of Protistology**, 37:405–426. 2002.

IMAI, S.; TSMITSUMI, Y.; YUMURA, S.; MULENGA, A. Ciliate protozoa in the rumen of Kafue Lechwe, *Kobus leche kafuensis*, in Zambia, with the description of four new species. **Journal of Protozoology**, 39: 564–572, 1992.

IMAI, S. Phylogenetic taxonomy of rumen ciliate protozoa based on their morphology and distribution. **Journal of Applied Animal Research**, 13(1-2), 17-36, 1998.

IMAI, S. Ciliate protozoa in the rumen of Kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with the description of four new species. **Journal of Protozoology**, 35: 130–136, 1988.

IMAI, S.; TASHIRO, H. A resin-pulverizing procedure for scanning electron microscopy of rumen ciliates (Protozoa: Ciliophora). **Transactions of the American Microscopical Society**, 101: 299–302, 1982.

IMAI, S.; OGIMOTO, K. Scanning electron and fluorescent microscopic studies on the attachment of spherical bacteria to ciliate protozoa in the ovine rumen. **Japan Journal of Veterinary Science**, 40: 9–19, 1978

ISHAQ, S.L.; WRIGHT, A.D.G. Design and validation of four new primers for next-generation sequencing to target the 18S rRNA gene for gastrointestinal ciliate protozoa. **Applied of Environmental and Microbiologist**, 80: 5515–5521, 2014.

JANIS, C.M. Artiodactyl Paleoecology and Evolutionary Trends. In D. R. Prothero & S. E. Foss, eds. *The Evolution of Artiodactyls*. Baltimore, MD: **The Jones Hopkins Press**, pp. 292–302, 2007.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, 2005, 89(1):124-134.

KOZLOSKI, G.V. *Bioquímica dos ruminantes*. 3ª Ed. UFSM, Santa Maria , 212 p. 2011.

KOFOID, C.A.; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn III. *Epidinium* Crawley, *Epiplastron* gen.nov., and *Ophryoscolex* Stein. **University of California Publications in Zoology**, 39: 1–34, 1933

KOFOID, C.A.; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn II. The genus *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, 37: 53–152, 1932

KITTELMANN, S.; JANSSEN, P.H. Characterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer, and cattle, feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. **FEMS Microbiology and Ecology**, 75: 468–481, 2011

- KITTELMANN, S.; SEEDORF, H.; WALTERS, W.A.; CLEMENTE, J.C.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I.; JANSSEN, P. H. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. **PLoS One**, 8: 1–11, 2013.
- LOZANO, M. G.; GARCIA, Y. P.; ARELLANO, K. A.; ORTIZ, C. L.; BALAGURUSAMY, N. Livestock methane emission: microbial ecology and mitigation strategies. **Livestock Science SelimSekkin**, IntechOpen, 51-69, 2017.
- LÓPEZ- CANTALAPIEDRA. J. Análisis evolutivos y ecológicos de rumiantes basados en datos filogenéticos. 2011.
- LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; SCHLEGEL, M.L.; TUCKER, T.A.; SCHRENZEL, M.D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, 320 (5883), 1647-1651, 2008.
- LI, Z.; WANG, X.; ZHANG, Y.; YU, Z.; ZHANG, T.; DAI, X.; PAN, X.; JIANG, R.; YAN, Y.; LIU, Y.; GAO, S.; LI, F.; HUANG, Y.; TIAN, J.; YAO, J.; XING, X.; SHI, T.; NING, J.; YAO, B.; HUANG, H.; JIANG, Y. Genomic insights into the phylogeny and biomass-degrading enzymes of rumen ciliates. **bioRxiv**, 2022.
- LYNN, D.H. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature 3rd ed., **Springer**, 2008.
- LYNN, D.H.; CORLISS, J.O. Microscopic Anatomy of Invertebrates. John Wiley & Sons, Inc., New York. p.333–467, 1991.
- LUBINSKY, G. Studies on the evolution of Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha) III. Phylogeny of the Ophryoscolecidae based on their comparative morphology. **Canadian Journal of Zoology**, 35:141 –159, 1957c.
- LUO, X.; GAO, F.; AL-RASHEID, K.A.S.; WARREN, A.; HU, X.; SONG, W.B. Redefinition of the hypotrichous ciliate *Uncinata*, with descriptions of the morphology and phylogeny of three urostylids (Protista, Ciliophora). **Systematics and Biodiversity**, 13,455–471, 2015.
- MISHIMA, T.; KATAMOTO, H.; HORII, Y.; KAKENGI, V.A.M.; ITO, A. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle *Bos taurus indicus*, and the infraciliature of *Entodinium palmare* n.sp. and *Enoploplastron stoky* (Buisson, 1924). **European Journal of Protistology**, 45: 77–86, 2009.
- MODEO, L.; ROSATI, G.; ANDREOLI, I.; GABRIELLI, S.; VERNI, F.; PETRONI, G. Molecular systematics and ultrastructural characterization of a forgotten species: *Chattonidium setense* (Ciliophora, Heterotrichea). **Proceedings of Japan Academy**, 82: 359–374, 2006.

- MODEO, L.; PETRONI, G.; LOBBAN, C.S.; VERNI, F.; VANNINI, C. Morphological, ultrastructural and molecular characterization of *Euplotes rosati* n.sp. (Ciliophora, Euplotida) from Guam. **Journal of Eukariotic Microbiology**, 60: 25–36, 2013
- MALMUTHUGE, N.; GUAN, L.L. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 8:1-7, 2017
- METAIS, G.; VISLOBOKOVA, I. Basal Ruminants. In *The Evolution of Artiodactyls*, eds Prothero DR, Foss SE. The John Hopkins University Press, Baltimore. 189–212. 2007.
- METAIS, G.; BENAMMI, M.; CHAIMANEE, Y.; JAEGER, J.; TUN, T.; THEIN, T.; DUCROCQ, S. Discovery of new ruminant dental remains from the Middle Eocene Pondaung Formation (Myanmar): reassessment of the phylogenetic position of *Indomeryx*. **CR Academic Science Paris Ser, II** 330(11):805–811. 2000
- METAIS, G.; CHAIMANEE, Y.; JAEGER, J.; DUCROCQ, S. Eocene bunoselenodont Artiodactyla from southern Thailand and the early evolution of Ruminantia in South Asia. **Naturwissenschaften**, 94(6):493–498. 2007
- METAIS, G.; CHAIMANEE, Y.; JAEGER, J.J.; DUCROCQ, S. New remains of primitive ruminants from Thailand: evidence of the early evolution of the Ruminantia in Asia. **Zoological Scripta**, 30(4):231–248. 2001
- MCEWAN, N.R.; ABECIA, L.; REGENSBOGENOVA, M.; ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; NEWBOLD, C.J. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. **Letters in Applied Microbiology**, 41: 97–71, 2005.
- MACKIE, R.I. Mutualistic Fermentative Digestion in the Gastrointestinal Tract: Diversity and Evolution. **Integrative and Comparative Biology**, 42:319–326, 2002.
- MEMBRIVE, C. M. B. Rumenology. *Anatomy and Physiology of the Rumen.* , 10.1007/978-3-319-30533-2(Chapter 1), 1–38, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_1
- MERMER, A.; RASTEGELDI, S.; ERGEN, G.; GOÇMEN, B. Occurrence of the Rumen Ciliate, *Elytroplastron bubali* (Dogiel,1928) in Turkish Domestic Goats (*Capra hircus*). **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 27 (4), 270–272, 2003.
- MOON-VAN DER STAAY, S.Y.; VAN DER STAAY, G.W.M.; MICHALOWSKI, T.; JOUANY, J.P.; PRISTAS, P.; JAVORSKÝ, P.; KIŠIDAYOVÁ, S.; VARADYOVA, Z.; MCEWAN, N.R.; NEWBOLD, C.J.; ALEN, T.; GRAAF, R.; SCHMID, M.; HUYNEN, M.A.; HACKSTEINA, J.H.P. The symbiotic intestinal ciliates and the evolution of their hosts. **European Journal of Protistology**, 50:166–173, 2014
- MUEGGE, BD.; KUCZYNSKI, J.; KNIGHTS, D.; CLEMENTE, J.C.; GONZÁLEZ, A.; FONTANA, L.; HENRISSAT, B.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. **Science**, 332: 970–974, 2011

- NEWBOLD, C. J.; DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; RAMOS-MORALES, E.; MCEWAN, N.R. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. **Frontiers in Microbiology**, 6, 1312, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structures et ultrastructures. **Annales des Sciences Naturelles Zoologie**, 12: 526–718, 1960
- NORRIS, C. The cranium of *Leptotragulus*, a hornless protoceratid (Artiodactyla: Protoceratidae) from the Middle Eocene of North America. **Journal of Vertebrates and Paleontology**, 20(2):341–348. 2000
- OGIMOTO, K.; IMAI, S. Atlas of Rumen Microbiology, Tokyo: **Japan Scientific Societies, Press**, 1981
- O' LEARY, M.; GATESY, J. Impact of increased character sampling on the phylogeny of Cetartiodactyla (Mammalia): combined analysis including fossils. **Cladistics**, 24(4):397–442, 2008.
- PROTHERO, D.R. Protoceratidae. In *Evolution of Tertiary Mammals of North America*, eds Janis CM, Scott KM, Jacobs LL. **Cambridge University Press**, Cambridge. Pp. 431–438. 2005
- ROSSI, M.F. Taxonomia, morfologia e filogenia molecular de protistas ciliados (Protista, Ciliophora) encontrados em ruminantes domésticos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2013
- RODRIGUES, P.H.M. Control and Manipulation of Ruminant Fermentation. In D. D. Millen, M. B. Arrigoni, ; R. D. L. Pacheco, eds. *Rumenology*. **Springer**, pp. 157-188, 2016
- REGENSBOGENOVA, M.; KISIDAYOVA, S.; MICHALOWSKI, T.; JAVORSKY, P.; MOON-VAN DER STAAY, S.Y.; HACKSTEIN, J.H.P.; MCEWAN, N.R.; JOUANY, J.P.; NEWBOLD, J.C.; PRISTAS, P. Rapid identification of rumen protozoa by Restriction Analysis of Amplified 18S rRNA gene. **Acta Protozoology**, 43: 219–224, 2004a
- REGENSBOGENOVA, M.; PRISTAS, P.; JAVORSKY, P.; MOON-VAN DER STAAY, S.Y.; MOON-VAN DER STAAY, G.W.M.; HACKSTEIN, J.H.P.; HACKSTEIN, NEWBOLD, C.J.; MCEWAN, N.R. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. **Letters of Applied Microbiology**, 39: 144–147, 2004b.
- ROSSI, M.F.; DIAS, R.J.P.; SENRA, M.V.X.; MARTINELE, I.; CARLOS A. G. SOARES, C.A.G.; D'AGOSTO, M. Molecular Phylogeny of the Family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Litostomatea) Inferred from 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 62, 584–590, 2015. <https://doi.org/10.1111/jeu.12211>
- ROSSI, M. F.; MELLO, B.; SCHRAGO, C. G. Performance of hidden markov models in recovering the standard classification of glycoside hydrolases. **Evolutionary Bioinformatics**, 13, 1–5, 2017. <https://doi.org/10.1177/1176934317703401>

- SANTRA, A.; KARIM, S.A.; MISHRA, A.S.; CHATURVEDI, O.H.; PRASAD, R. Rumen ciliate protozoa and fibre utilization in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, 30(1), 13–18. 1998. [https://doi.org/10.1016/S09214488\(98\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S09214488(98)00078-9).
- SYLVESTER, J.T.; KANARTI, S.K.R.; YU, Z.; MORRISON, M.; FIRKINS, J.L. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. **Journal of Nutrition**, 134: 3378–3384, 2004.
- SKILLMAN, L.C.; TOOVEY, A.F.; WILLIAMS, A.J.; WRIGHT, A-DG. Development and validation of real time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between Entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. **Applied Environmental and Microbiology**, 72: 200–206, 2006.
- SHARP, R. *Diplodinium ecaudatum* with an account of neuromotor apparatus. **University of California Publications in Zoology**, 13: 43–122, 1914.
- STEIN, F. Über mehrere neue im pansen der wiederkäuer lebende infusionstiere. **Abhandlungen derk Böhmischen Gesellschaft der Wissenschaften**, .10, 69–70, 1858.
- STUCKY, R.K. Eocene bunodont and bunoselenodont Artiodactyla (“dichobunids”). In *Evolution of Tertiary Mammals of North America*, eds Janis CM, Scott KM, Jacobs LL. **Cambridge University Press**, Cambridge. Pp. 358–374. 2005.
- THALER, D.S. Is Global Microbial Biodiversity Increasing, Decreasing, or Staying the Same? **Frontiers in Ecology and Evolution**. 9:565649, 2021.
- TYMENSEN, L.; BARKLEY, C.; MCALLISTER, T.A. Relative diversity and community structure analysis of rumen protozoa according to TRFLP and microscopic methods. **Journal of Microbiology Methods**, 88: 1–6, 2012
- TRAN, L.A.P. Interaction between Digestive Strategy and Niche Specialization Predicts Speciation Rates across Herbivorous Mammals. **The american naturalist**, 187: 468-480, 2016
- VRBA, E.S.; SCHALLER, G.B. Introduction. In *Antelopes, Deer, and Relatives: Fossil Record, Behavioral Ecology, Systematics and Conservation*, eds Vrba ES, Schaller GB. **Yale University Press**, New Haven, 1-8. 2000
- VISLOBOKOVA, I.A. The basic features of historical development and classification of the Ruminantia. **Paleontology Journal**, 4:3-14, 1990.
- VĎAČNÝ, P. Estimation of divergence times in litostomatean ciliates (Ciliophora: Intramacronucleata), using Bayesian relaxed clock and 18S rRNA gene. **European Journal of Protistology**, 51(4),321–334, 2015
- VĎAČNÝ, P. Evolutionary Associations of Endosymbiotic Ciliates Shed Light on the Timing of the Marsupial–Placental Split. **Molecular Biology and Evolution**, 35(7):1757-1769, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy071>.
- WANG,P., GAO,F., HUANG,J., STRÜDER-KYPKE,M., YI,Z. A case study to estimate the applicability of secondary structures of SSU-rRNA gene in taxonomy and phylogenetic analyses of ciliates. **Zoologica Scripta**, 44,574–585, 2015

- WRIGHT, A-DG.; LYNN, D.H. Phylogenetic analysis of the rumen ciliate family Ophryoscolecidae based on 18S ribosomal RNA sequences, with new sequences from *Diplodinium*, *Eudiplodinium* and *Ophryoscolex*. **Canadian Journal of Zoology**, 75: 963–970, 1997
- WRIGHT, A.D.G.;KENNEDY, P.; O’NEILL, C.J.; TOOVEY, A.F.; POPOVSKI, S.; REA, S.M.; PIMM, C.L.; KLEIN, L. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. **Vaccine**, 2004, 22(29-30):3976- 3985.
- WILSON, D.E.; REEDER, D.M. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference (3rd ed), **Johns Hopkins University Press**, 2,142 pp, 2005
- WILSON, E.O. What is Nature Worth For? Part 1: Span ZLIV-4: 54-57 Part 2: XLIV: 23-29, 2003.
- WELCH, J. G. Rumination, Particle Size and Passage from the Rumen. **Journal of Animal Science**, 54(4), 885–894, 1982. <https://doi.org/10.2527/jas1982.544885x>
- WHITE, B. A.; LAMED, R.; BAYER, E. A.; FLINT, H. J. Biomass utilization by gut microbiomes. **Annual Review of Microbiology**, 68, 279–296, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155618>
- WLODARSKI, L; MAEDA, E. M; FLUCK, A. C; GILIOLI, D. Microbiota ruminal: diversidade, importância e caracterização. **Revista Eletrônica de Veterinária**, 18,1–20. 2017.
- WRIGHT, A-DG.; DEHORITY, B.A.; LYNN, D.H. Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorpha) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 44: 61–67, 1997.
- WRIGHT, A.D.J. Rumen Protozoa. In A. K. Puniya, R. Singh, & D. N. Kamra, eds. Rumen Microbiology, From Evolution to Revolution. **Springer**, pp. 113–120, 2015
- WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The Rumen protozoa, New York: **Springer-Verlag**, 423 pp, 1992.
- ZHANG,Z; XU, D.; WANG, L.; HAO, J.; WANG, J.; ZHOU, X.;WANG, W.; QIU, Q.; HUANG, X.; ZHOU, J.; LONG, R.; ZHAO, F.; SHI, P. Convergent Evolution of Rumen Microbiomes in High-Altitude Mammals. **Current Biology**, 26: 1–7, 2016.
- ZHANG, Q., YI,Z., FAN,X., WARREN,A., GONG,J., SONG,W.B. Further insights into the phylogeny of two ciliate classes Nassophorea and Prostomatea (Protista,Ciliophora). **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 70, 162–170, 2014.

3 CAPÍTULO 1

CILIADOS DO RÚMEM (ALVEOLATA, CILIOPHORA) ASSOCIADOS COM CAPRINOS: CHECKLIST, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, ESPECIFICIDADE DO HOSPEDEIRO, FILOGENIA E DATAÇÃO MOLECULAR

3.1 RESUMO

Embora seja representativa a diversidade (~35 espécies) e a distribuição mundial de caprinos (Ruminantia, Bovidae, Caprinae) ao redor do mundo, os estudos sobre diversidade de ciliados simbioses nestes mamíferos são escassos quando comparados com outros ruminantes. O presente trabalho realizou uma revisão e checklist de espécies com base em estudos taxonômicos, morfológicos e ecológicos de protozoários ciliados do rúmen de caprinos, apresenta distribuição geográfica e hospedeiros, bem como estima as relações macroevolutivas das espécies observadas nos estudos. Para tal, revisamos a literatura disponível nas bases de dados, os desenhos esquemáticos foram realizados com base em informações presentes na descrição original dos táxons e as relações filogenéticas inferidas com base em análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. De acordo com a revisão, 72 espécies e 14 gêneros de ciliados já foram registrados associados a caprinos. Em análise sobre associação entre gêneros de ciliados e hospedeiros caprinos, ficou demonstrado que os ciliados estão mais associados com caprinos domésticos (*Capra hircus*-14 gêneros), em comparação com selvagens (*Rupicapra rupicapra* - seis gêneros, *Capra ibex* -um gênero e *Capra pyrenaica* -um gênero). Treze países foram identificados no mapa de distribuição como locais onde já foram observadas espécies de ciliados associadas com caprinos. A rede de interação ciliados e seus hospedeiros evidenciou que as espécies de ciliados associadas com caprinos ocorrem em outras espécies de mamíferos herbívoros. As hipóteses filogenéticas recuperadas demonstram que as espécies de ciliados em caprinos formam um grupo merofilético com idades máxima e mínima de cerca de ~8.2Ma e ~2.4Ma. Constatou-se igualmente que, grande parte dos estudos sobre diversidade de ciliados em caprinos não utiliza todas as técnicas necessárias e de forma integrativa, mas que isso é fundamental para descrições detalhadas e melhor conhecimento desta parcela da biodiversidade.

Palavras-chave: Caprinae. Ruminantes. Espécies de ciliados. Simbioses. Trichostomatia.

3.2 INTRODUÇÃO

O ecossistema microbiano do trato digestivo de mamíferos herbívoros é um ambiente complexo formado por comunidades de bactérias, vírus, arqueias metanogênicas, fungos e protozoários ciliados (GÜRELLI; DAW, 2020). Os protozoários ciliados estabelecem relações simbióticas com os hospedeiros de modo a obter condições adequadas para o seu ciclo de vida (WRIGHT et al., 2011). Essas relações permitem a ocorrência de processos fermentativos por meio de atividades físicas e microbiológicas, o que facilita a transformação de componentes provenientes da dieta, em produtos úteis (ácidos graxos voláteis - AGVs, proteína microbiana, vitaminas, etc) para o hospedeiro (ZEINELDIN et al., 2018). Similarmente, os hospedeiros mantêm a população microbiana no rúmen ao ingerir e triturar os alimentos com regularidade e criam condições apropriadas para o crescimento microbiano, como pH ótimo, anaerobiose, temperatura e umidade adequadas (LOZANO et al., 2017).

Os protozoários ciliados do rúmen podem contribuir com cerca de 50% da biomassa viável no ambiente ruminal, possuem tamanho de 20-200 μm (CHOUDHURY et al., 2012; NEWBOLD et al., 2015; FRANCISCO et al., 2019), são unicelulares, anaeróbicos, e ainda, não patogênicos ao hospedeiro (OGIMOTO; IMAI, 1981; WLODARSKI et al., 2017). Estes protozoários ciliados são classificados na subclasse Trichostomatia Butschli 1889, nas subordens Vestibuliferida Puytorac et al. 1974 e Endodiniomorphida Reichenow in Doflein e Reichenow 1929 (LYNN, 2008).

Vestibuliferida é representada em grande parte, por endossimbiontes de vários vertebrados, como mamíferos placentários herbívoros, anfíbios, répteis, aves, exceto pela espécie *Balantioides coli* Malmstein 1857 (CORLISS, 1979), que é o único parasito da subclasse ocorrendo em humanos (WILLIAMS; COLEMAN, 1992; LYNN, 2008). A família Isotrichidae é representada pelos ciliados vestibuliferídeos no ambiente ruminal, tendo sido registrada em pseudoruminantes, ruminantes verdadeiros e no trato digestivo de não-ruminantes (WRIGHT, 2015). A ordem Entodiniomorphida (~700 espécies) é diversamente encontrada no trato gastrointestinal de diversos hospedeiros mamíferos das ordens Artiodactyla, Perissodactyla, Afrotheria e Rodentia (OGIMOTO; IMAI, 1981; WILLIAMS; COLEMAN, 1992; LYNN, 2008). A família Ophryoscolecidae é a mais diversa dentro da ordem Entodiniomorphida, e inclui espécies de protozoários ciliados que ocorrem essencialmente em mamíferos herbívoros ruminantes verdadeiros e pseudoruminantes (OGIMOTO; IMAI, 1981; WRIGHT, 2015).

Dentre os grupos de mamíferos ruminantes que abrigam ciliados endossimbiontes do trato gástrico, os caprinos são muito pouco estudados (CEDROLA et al., 2020), pois as

pesquisas baseadas em morfologia, taxonomia, ecologia e filogenia de ciliados simbioses de mamíferos herbívoros têm sido conduzidas, na sua maior parte, em hospedeiros como bovinos, ovinos, camelos, búfalos, llamas, girafas, elefantes, como mostra o trabalho de CEDROLA et al. (2020), que faz uma revisão bibliográfica de pesquisas com protozoários ciliados do trato digestivo de diferentes hospedeiros.

Ainda, os poucos trabalhos existentes com ciliados do ambiente ruminal de caprinos focam, essencialmente, em aspectos relacionados com a fisiologia do hospedeiro (KOCABATMAZ et al., 1992; SHI et al., 2008; ABUBAKR et al., 2013; AZIZ et al., 2018; LANGDA et al., 2020), sendo escassos estudos taxonômicos que envolvem protozoários ciliados associados a este grupo de mamíferos ruminantes, dificultando dessa forma, o conhecimento da sua ciliatura e outros caracteres importantes. Por isso, o objetivo deste trabalho foi de elaborar um inventário de espécies que ocorrem no rúmen de caprinos além de inferir as relações macroevolutivas das mesmas espécies.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 REVISÃO DA LITERATURA: BASE DE DADOS

De modo a obtermos informações sobre registros de espécies e distribuição geográfica de ciliados associados com hospedeiros caprinos, revisamos a literatura disponível nas seguintes plataformas: Google Scholar, Google Books, PubMed, Scielo, Scopus, MGRast e Web of Science (LUBINSKY, 1955; LUBINSKY, 1957; CHRISTL, 1958; IMAI et al., 1978; LEE, 1979; CRHA et al., 1985; FERNANDEZ-GALIANO; CAMPOS, 1992; ITO et al., 1995; GURUNG et al., 2002; GÖÇMEN; ATATUR, 2002; GÖÇMEN et al., 2002; MERMER et al., 2003; RASTGELD; GÖÇMEN, 2003; TALAR et al., 2004; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004; GÖÇMEN; KARAOĞLU, 2005; GÖÇMEN et al., 2005; DE LA FUENTE et al., 2006; GÖÇMEN; SEZGIN, 2006; MERMER et al., 2006; DE LA FUENTE et al., 2009; BARAKA, 2012; GÜRELLI, 2014; GÜRELLI et al., 2016; MOHAMED, 2017). A busca foi realizada usando todas as décadas disponíveis desde 1843 à 2020 nas diferentes bases de dados, bem como a combinação das seguintes palavras-chave: Ruminants, “Goats”, “*Capra hircus*”, “*Rupicapra rupicapra*”, “*Capra ibex*”, “Rumen”, “Protists”, “Protozoa”, “Ciliates”, “Ciliate distribution”, “Ciliates endosymbionts”, “Rumen protozoa”, “Ciliate fauna” and “Studies on ciliates”. O inventário foi organizado em formato de tabela (Tabela 1), constituída em subclasse, ordem, família, espécie e os países onde as espécies foram registradas.

3.3.2 DESENHOS ESQUEMÁTICOS

Os desenhos esquemáticos das espécies mais frequentes de protozoários ciliados registradas em caprinos foram feitos com base em informações presentes na descrição original dos táxons (CHRISTL, 1958; FERNANDEZ-GALIANO; CAMPOS, 1992; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004; GÖÇMEN et al., 2005). Todos os esquemas encontram-se orientados com a superfície anterior para o topo da página.

3.3.3 MAPA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Para compreender a distribuição geográfica das espécies associadas com caprinos foi elaborado um mapa de distribuição geográfica, contendo o número de espécies e as respectivas localidades. Os dados quantitativos foram tabulados no Excel indicando o país e a quantidade de espécies. A planilha foi inserida no programa ArcgisPro 2.1 e os números foram inseridos nos limites políticos de cada país correspondente.

3.3.4 CILIADOS E SEUS HOSPEDEIROS

Com objetivo de compreender a relação entre as espécies hospedeiras e os gêneros dos protozoários ciliados foi esquematizado um diagrama circular por meio do programa online <http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/>. Os dados foram tabulados no Excel indicando os hospedeiros (*Capra ibex*, *Capra pyrenaica*, *Rupicapra rupicapra* e *Capra hircus*) e a quantidade de gêneros associados.

A especificidade entre as espécies de ciliados e seus hospedeiros foi investigada usando uma rede de interações ciliados-hospedeiros. As espécies de ciliados utilizadas na rede foram incluídas por serem as que ocorrem em caprinos e em outros hospedeiros. Para tal, os dados de presença/ausência obtidos, foram tabulados no Excel e a rede de interação foi plotada no Software Rstudio através do pacote bipartite versão 2.15. A lista de hospedeiros utilizada foi obtida por meio de referências (DOGIEL, 1928; VASILY; MITCHELL, 1974; DEHORITY, 1974; WILKINSON; VAN HOVEN, 1976; KLEYNHANS; HOVEN, 1976; VAN HOVEN et al., 1979; DEHORITY, 1987; TOWNE et al., 1988; DEHORITY, 1995; SELIM et al., 1996; DEHORITY, 1997; WRIGHT; LYNN, 1997; SELIM et al., 1999; FRANZOLIN; DEHORITYL, 1999; DEHORITY et al., 1999; SU et al., 2000; TALAR et al., 2004; IMAI et al., 2004; DE LA FUENTE et al., 2006; DEL VALLE et al., 2008; OBANDA et al., 2008; MARTINELE; D'AGOSTO, 2008; MISHIMA et al., 2009; BOOYSE; DEHORITY, 2012; BARAKA, 2012; BOOYSE et al., 2014; BOOYSE et al., 2015; CERÓN CUCCHI et al., 2016; CEDROLA et al., 2016; KIMURA et al., 2017; CEDROLA et al.,

2017; GÜRELLI, 2017; GÜRELLI, 2018; CEDROLA et al., 2018) publicadas em distintas plataformas de bases de dados (CrossRef, Google Scholar e PubMed) usando como palavras-chave os nomes científicos das espécies de ciliados e os respectivos nomes vulgares (populares) dos hospedeiros.

3.3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICA

Um dataset de 18S-rDNA de ciliados representando a subclasse Trichostomatia foi montado usando o banco de dados GenBank (Setembro de 2020). Uma sequência representante da subclasse Haptoria (*Spathidium papilliferum*) foi escolhida como grupo externo.

Como critérios de curadoria do banco de dados, somente foram selecionadas sequências maiores de 1.300 bp e de organismos identificados a nível específico. O alinhamento foi realizado no programa MAFFT v.7.0 (KATO et al., 2019) e inspecionado visualmente usando o software SeaView v.7.5.8 (GOUY et al., 2009). Os sítios pobremente alinhados foram removidos usando o software online Gblocks v. 0.91b (CASTRESANA, 2000), permitindo a obtenção de uma matriz de 1.549 pares de base. Esta matriz curada foi usada para inferência filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) por meio de software RAxML v.8.2.4 (STAMATAKIS, 2014). O modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I foi escolhido como o melhor modelo pelo software JmodelTest v.2.1.4 (DARRIBA et al., 2012) implementado na Plataforma MEGAX v.10.0.5 (KUMAR et al., 2018). O suporte dos ramos foi estimado usando o critério de convergência de bootstrap no software RAxML v.8.2.4 (STAMATAKIS, 2014), com 550 pseudoréplicas.

A análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada usando o programa MrBayes in XSEDE v.3.2.6 (RONQUIST et al., 2012) após um milhão de gerações em duas simulações simultâneas e independentes de Markov Chain Monte Carlo com três cadeias quentes e uma fria. Todas as árvores restantes depois do *burn-in* de 25% foram utilizadas para o cálculo das probabilidades posteriores por meio da regra de maior consenso.

3.3.6 DATAÇÃO MOLECULAR

Para estimar o tempo de divergência das espécies de protozoários ciliados associadas a caprinos, usamos a função RelTime (TAMURA et al., 2012) implementado no programa MEGAX v.10.0.5 (KUMAR et al., 2018). Com a ausência de registros fósseis para a subclasse Trichostomatia, a estimativa do tempo de divergência foi realizada utilizando calibração secundária a partir do tempo estimado para subclasse Trichostomatia, segundo

COSTA et al. (2021). A calibração foi feita na raiz de Trichostomatia usando a topologia de Máxima Verosimilhança, utilizando respectivamente como idades mínima e máxima, 3.8Ma e 23.8Ma.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE CILIADOS ASSOCIADAS COM CAPRINOS

Os primeiros relatos de ciliados vivendo no trato digestivo de mamíferos herbívoros foram realizados por GRUBY; DELAFOND (1843), que na época, os chamaram de “animáculos”. Apesar das observações, os autores não descreveram e tampouco desenharam as espécies. Assim, os primeiros relatos contendo desenhos esquemáticos com ciliados do rúmen, só apareceram anos mais tarde, sendo atribuídos a COLIN (1854) as primeiras ilustrações de tricostomatídeos em observações vivas com amostras de mamíferos domésticos. Formalmente, F. STEIN (1858) foi o autor que trouxe publicação, taxonômica sobre ciliados tricostomatídeos, descrevendo espécies dos gêneros *Isotricha*, *Entodinium*, *Ophryoscolex* e da família Ophryoscolecidae, em ruminantes. Após essas primeiras constatações, os estudos com ciliados do rúmen foram ocupando um espaço considerável com relatos de descrições ou redescrições taxonômicas, morfológicas, ecológicas e filogenéticas em diferentes hospedeiros e espaços geográficos (CUNHA, 1914; WERTHEIM, 1934; OGIMOTO; IMAI, 1981; WILLIAMS; COLEMAN, 1992; D’AGOSTO; SANTA-ROSA, 1998; ITO et al., 2010; CEDROLA et al., 2015; USHIDA, 2018; BERBER; GÜRELLI, 2019).

No que diz respeito aos ciliados em caprinos, uma das primeiras análises foi registrada em 1934 com estudos morfológicos e quantitativos realizados por Wertheim em caprinos selvagens. Nesta ocasião, o autor quantificou e observou em três ruminantes (*Rupicapra rupicapra*) quatro gêneros de ciliados (*Entodinium*, *Epidinium*, *Anoplocladus* e *Ophryoscolex*), tendo descrito uma nova forma *Ophryoscolex caudatus rupicaprae*, caracterizada a partir da espécie *Ophryoscolex caudatus* que foi descrita por EBERLEIN (1895). O caráter distintivo do *O. caudatus rupicaprae*, consiste no formato dos espinhos caudais, os quais em sua superfície dorsal, possuem o formato simples e não bifurcado como é habitual nas espécies do gênero (WERTHEIM, 1934). Neste estudo de 1934, Wertheim identificou: *Entodinium babici* Wertheim, 1933; *Entodinium simplex* Dogiel, 1925; *Entodinium nanellum* Dogiel, 1921; *Anoplocladus babici* Wertheim, 1933; *Anoplocladus costatum major* Dogiel, 1925; *Epidinium ecaudatum* Fiorentini forma *posterolatum* Wertheim, 1933; e *Epidinium ecaudatum* Fiorentini forma *posterolato-caudatum* Wertheim, 1933.

Com conhecimento dos resultados de Wertheim em animais selvagens, CHRISTL (1955; 1958) trabalhou com *Rupicapra rupicapra* e *Capra ibex* e utilizando formalina 10% a 20% para fixação das amostras e iodo para coloração dos organismos, observou 18 espécies de ciliados distribuídas em quatro gêneros (*Entodinium*, *Anoplodinium*, *Eudiplodinium* e *Ophryoscolex*), das quais três eram espécies novas (*Entodinium rupicaprae*, *Anoplodinium rupicaprae* e *Eudiplodinium maggioides*), isto em *Rupicapra rupicapra*. Em *Capra ibex*, encontrou quatro novas espécies (*Entodinium alpinum*, *Entodinium ibicis*, *Entodinium couturieri* e *Entodinium wertheimi*) (Figura 1). Em estudo similar, publicado por LUBINSKY (1955), foram observadas quatro espécies (*Entodinium ovinum* Dogiel, 1927; *Entodinium longinucleatum* Dogiel, 1925; *Eremoplastron bovis* Dogiel, 1927 e *Epidinium caudatum* Fiorentini, 1889). Dois anos mais tarde, LUBINSKY (1957) identificou em *Capra hircus*, os ciliados *Entodinium caudatum* f. *loboso-spinosum* Dogiel, 1925 e *Entodinium simulans* Lubinsky, 1957.

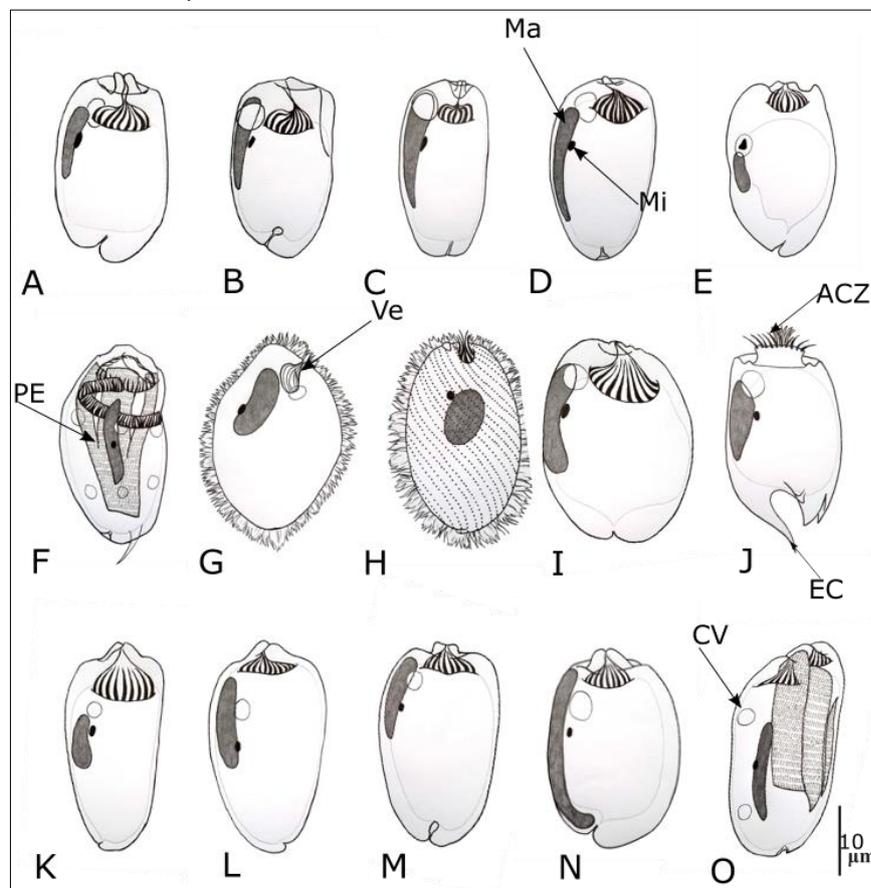
Nas três décadas seguintes (1960, 1970 e 1980) as técnicas ciliatológicas foram aprimoradas e a utilização de câmaras como Fuchs Rosenthal chamber para contagem de ciliados, o uso de “methyl green-formalin-saline”, “acid carmine”, “Garazzi's glycerin hematoxylin”, “Heidenheim ferrous hematoxylin”, para observações de traços morfológicos (aparatos nucleares) e “chlor-zinc-iodide” (placas esqueléticas), permitiu uma melhora nos estudos. Nesse intervalo de tempo, foram observadas algumas espécies de ciliados associadas com hospedeiros caprinos (LEVINE, 1961; IMAI et al., 1978; LEE, 1979; OGIMOTO; IMAI, 1981; CRHA et al., 1985; MATSUMOTO et al., 1989; OLIVEIRA et al. 1989) sendo que ao final da década de 1980 já era possível contabilizar 24 espécies de ciliados trichostomatídeos associados a estes hospedeiros.

Na década de 1990, os estudos com estes hospedeiros foram caracterizados, em sua maioria, por abordagens taxonômicas. As técnicas como impregnação pelo carbonato de prata, descrita por FERNANDEZ-GALEANO (1976) e mais tarde adaptada por outros autores como ITO; IMAI (1998; 2006) para estudo de ciliados do rúmen; o uso de soluções de Lugol e “methyl green-formalin-saline” (MFS) para coloração das placas esqueléticas e aparatos nucleares, respectivamente; câmaras de Mac Master, de Fuchs-Rosenthal para contagem e estimativa da densidade de células, permitiram a realização de algumas descrições morfológicas da época (KOCABATMAZ et al., 1992; ITO et al., 1995).

Por meio destas técnicas mencionadas acima, FERNANDEZ-GALIANO; CAMPOS (1992) descreveram *Ophryoscolex monoacanthus* (Figura 1), chegando a propor na época, uma hipótese sobre as relações filogenéticas que seriam estabelecidas entre as nove espécies

do gênero *Ophryoscolex*, descritas até então. Para os autores, as configurações caudais poderiam representar o estágio evolutivo em que as espécies se encontravam. Assim, espécies com maior número e maior complexidade em seus processos caudais eram consideradas as mais derivadas. No entanto, essa ideia não tem sido corroborada em reconstruções filogenéticas recentes (ROSSI et al., 2015, CEDROLA et al., 2017).

Figura 1. Desenhos esquemáticos das espécies de ciliados do rúmen descritas em caprinos (CHRISTL, 1958; FERNANDEZ-GALIANO; CAMPOS, 1992; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004; GÖÇMEN et al., 2005). A. *Entodinium alpinum*; B. *Entodinium ibicis*; C. *Entodinium couturier*; D. *Entodinium wertheimi*; E. *Entodinium salmani*; F. *Ophryoscolex monoacanthus*. G-H: frequent species on observations in goat rumen samples; G. *Isotricha prostoma*; H. *Dasytricha ruminantium*; I. *Entodinium dubardi*; J. *Entodinium caudatum*; K. *Entodinium exiguum*; L. *Entodinium minimum*; M. *Entodinium simplex*; N. *Entodinium longinucleatum*; O. *Epidinium ecaudatum*. Abreviações: ACZ, zona adoral de ciliatura; CV, vacúolo contrátil; EC, espinha caudal; Ma, macronúcleo; Mi, micronúcleo; Ve, vestíbulo; PE, placa esquelética. Escala de barras: 10µm.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Ainda nesta década (1990), alguns estudos tiveram seus objetivos focados para melhoria da digestibilidade microbiana no rúmen de caprinos, por meio do fornecimento de diferentes dietas (KOCABATMAZ et al., 1992), como se pode ler, inclusive, no trabalho de

SANTRA et al. (1998), ao concluir que a digestibilidade de fibras em caprinos é maior comparada com os ovinos, o que pode explicar possivelmente a existência de maior número de protozoários ciliados por amostra nestes ruminantes.

No intervalo dos anos 2000 a 2010, estudos zootécnicos ganharam destaque em hospedeiros caprinos (NETO et al., 2005; ARGÔLO, 2007). Estes estudos tinham como principal enfoque as potencialidades destes mamíferos e o incremento da produtividade, com objetivos de avaliar os diferentes efeitos da acidose láctica ruminal, estudar as características físico-químicas e microbiológicas do fluido ruminal, inclusive nos parâmetros ruminais que influenciam no bem-estar deste grupo de ruminantes. Além deste tipo de estudos, essa época é também marcada pela caracterização taxonômica de ciliados endossimbiontes associados aos hospedeiros que revisamos neste trabalho, na Turquia (GÖÇMEN; ATATUR, 2002; GÖÇMEN et al., 2002; RASTGELDI; GÖÇMEN, 2003; MERMER et al., 2003; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004; GÖÇMEN et al., 2005; GÖÇMEN; SAZGIN, 2006), com observações de 15 gêneros; na Espanha (DE LA FUENTE et al., 2009), com nove gêneros; Nepal (GURUNG et al., 2002), com oito gêneros; no Irã (TALAR et al., 2004), com cinco gêneros, e, na Islândia (DE LA FUENTE et al., 2006), com quatro gêneros.

Com o passar do tempo, as abordagens nos estudos de protozoários ciliados associados com hospedeiros caprinos foram mudando e novas técnicas passaram a ser empregadas. Nos últimos dez anos, o uso de técnicas integrativas, que permitem descrever aspectos morfológicos e moleculares têm sido amplamente utilizadas. BARAKA (2012) e METZLER-ZEBELI et al.(2013), usando câmaras de Burker, Neubauer, Sedgwick-Rafter com modificações de D'AGOSTO; CARNEIRO (1999), formalina 18,5%, MFS e Lugol, observaram 19 espécies classificadas em sete gêneros; por sua vez, GÜRELLI (2014) e GÜRELLI et al. (2016) observaram 31 espécies pertencentes à 15 gêneros. Digestibilidade, fermentação ruminal e a substituição de dietas em uso nos caprinos são também alguns exemplos de estudos frequentes neste período em referência (CARVALHO et al., 2011; RUFINO et al., 2011; ABUBAKR, 2013; AZIZ et al., 2018). Estes autores demonstram que a abundância e composição dos ciliados dependem de diferentes fatores, tais como: saúde dos animais, tipo de hospedeiro, localização geográfica e dietas consumidas.

Além das técnicas que permitem as descrições morfológicas, o aprimoramento de técnicas moleculares é um dos marcos importantes no estudo da microbiota em caprinos neste período, sobretudo, o uso de diversas ômicas na análise da diversidade microbiana no ambiente ruminal dos hospedeiros. DENMAN et al. (2015); ASANUMA et al. (2015); LIU et al. (2017); CREMONESI et al. (2018); DO et al. (2018); LEI et al. (2019); LANGDA et al.

(2020) e SHEN et al. (2020) estudaram a microbiota caprina usando a metagenômica para identificar e caracterizar o perfil da ciliatofauna, identificar os fatores que influenciam a qualidade do rúmen, além de analisar as categorias funcionais de genes na degradação de diferentes dietas. Outras ômicas (metabômica, transcriptômica e proteômica) têm sido igualmente usadas nos estudos com caprinos para diferentes finalidades que incluem: investigação sobre a influência das dietas sobre a microbiota, verificação dos efeitos de restrição alimentar sobre a microbiota e avaliação das mudanças na expressão proteica (MAO et al., 2016; ABECIA et al., 2018; GUO et al., 2019; ZHANG et al., 2019; WANG et al., 2020; PARREIRA et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

O uso dessas ferramentas tem revelado serem importantes no estudo da diversidade microbiana associada com caprinos, permitindo resultados promissores na identificação, descrição ou redescricao de gêneros e espécies que não foram previamente observados com o uso de técnicas tradicionais (HENDERSON et al., 2015; EBRAHIMI et al., 2018).

3.4.2 CHECKLIST DE ESPÉCIES E GÊNEROS DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS ASSOCIADOS COM CAPRINOS

Observamos um total de 72 espécies distribuídas em 14 gêneros de protozoários ciliados em caprinos selvagens e domésticos (*Capra ibex*, *Capra pyrenaica*, *Rupicapra rupicapra* e *Capra hircus*) (Tabela 1; Figura 2). Este resultado se mostrou inferior comparado com o total de espécies de ciliados da subclasse Trichostomatia associadas com ovinos selvagens e domésticos, em que se estima em um total de 137 espécies ao redor do mundo (BOOYSE; DEHORITY, 2011; CEDROLA et al., 2016; CEDROLA et al., 2020). Esta diferença no número de espécies associadas pode estar relacionada com o menor número de publicações disponíveis com a ciliatofauna caprina.

Tabela 1. Espécies de protozoários ciliados que ocorrem em caprinos e observadas em vários estudos ao redor do mundo.

Subclasse/Ordem/Família/ Gêneros/Espécies	Checoslováquia [1]	Egito [2]	Itália [3]	Irã [4]	Islândia [5]	Japão [6]	Coréia [7]	Quirguistão [8]	Líbia [9]	Nepal [10]	Paquistão [11]	Espanha [12]	Turquia [13]
Trichostomatia Butschli, 1889													
Vestibuliferida de Puytorac et al., 1974													
Isotrichidae Poche, 1913													
<i>Isotricha</i> Stein Stein, 1858													
<i>I. intestinalis</i> Stein, 1858	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>I. prostoma</i> Stein, 1858	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Dasytricha</i> Schuberg, 1888													
<i>D. ruminatum</i> Schuberg, 1888	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Entodiniomorphida Reichenow in Doflein & Reichenow, 1929													
Ophryoscolocidae Stein, 1858													
<i>Entodinium</i> Stein, 1859													
<i>E. cervi</i> Kubikova, 1935	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. dubardi</i> Buisson, 1923	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>E. exiguum</i> Dogiel, 1925	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>E. laeve</i> Dogiel, 1925	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. loboso-spinosum</i> , Dogiel, 1925	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. nanellum</i> , Dogiel, 1922	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>E. parvum</i> Buisson, 1923	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>E. rupicaprae</i> Christl, 1955	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. caudatum</i> Stein, 1858	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>E. longinucleatum</i> Dogiel, 1925	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. constrictum</i> Dogiel, 1974	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

.....continua na página seguinte

Subclasse/Ordem/Família/ Gêneros/Espécies	Checoslováquia [1]	Egito [2]	Itália [3]	Irã [4]	Islândia [5]	Japão [6]	Coréia [7]	Quirguistão [8]	Líbia [9]	Nepal [10]	Paquistão [11]	Espanha [12]	Turquia [13]
<i>E. bursa</i> Stein, 1858	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>E. salmani</i> Gocmen and Rastgeldi, 2004	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. ovinum</i> Dogiel, 1927	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. rectangulatum</i> Kofoid and MacLennan, 1930	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>E. minimum</i> Schuberg, 1888	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>E. bovis</i> Wertheim, 1935	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. ellipsoideum</i> Kofoid and MacLennan, 1930	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. simulans</i> Lubinsky, 1957	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>E. dalli</i> Dogiel, 1974	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. williamsi</i> Gocmen and Okten, 1996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. basoglui</i> Okten and Gocmen, 1996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. constatum</i> MacLennan, 1935	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>E. vorax</i> Dogiel, 1925	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. ekendrae</i> Das-Gupta, 1935	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. convexum</i> MacLennan, 1935	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. alpinum</i> Christl, 1958	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. rostratum</i> Fiorentini, 1889	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. semahatae</i> Öktem et al., 1997	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. ibicis</i> Christl, 1958	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. couturier</i> Christl, 1958	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. werthermi</i> Christl, 1958	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. babici</i> Wertheim, 1933	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

.....continua na página seguinte

Subclasse/Ordem/Família/ Gêneros/Espécies	Checoslováquia [1]	Egito [2]	Itália [3]	Irã [4]	Islândia [5]	Japão [6]	Coréia [7]	Quirguistão [8]	Líbia [9]	Nepal [10]	Paquistão [11]	Espanha [12]	Turquia [13]
<i>Diplodinium</i> Schuberg, 1888													
<i>D. rangiferi</i> Dogiel, 1925	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>D. dentatum</i> Stein, 1858	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. costatum</i> Dogiel, 1925	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. anisacanthum</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>D. crista-galli</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>D. flabellum</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>D. anacanthum</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. monacanthum</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>D. diacanthum</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eudiplodinium</i> Dogiel, 1927													
<i>Eud. magii</i> Fiorentini, 1889	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Eud. bovis</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Eud. dilobum</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eud. affine</i> Dogiel and Fedorowa, 1925	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Ostracodinium</i> Dogiel, 1927													
<i>O. quadrivesiculatum</i> K. and Mac L, 1932	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>O. trivesiculatum</i> K. and Mac L, 1932	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Metadinium</i> Awerinzew and Mutafova, 1914													
<i>M. banksi</i> Dehority, 1985	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. affine</i> Dogiel and Fedorowa, 1925	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>M. medium</i> Awerinz & Mutafova, 1914	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>M. minorum</i> Dehority, 1975	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>M. tauricum</i> Dogiel & Fedorowa, 1925	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Diploplastron</i> Kofoid and MacLennan, 1932													
<i>Dipl. affine</i> Dogiel and Fedorowa, 1925	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Subclasse/Ordem/Família/ Gêneros/Espécies	Checoslováquia [1]	Egito [2]	Itália [3]	Irã [4]	Islândia [5]	Japão [6]	Coréia [7]	Quirguistão [8]	Líbia [9]	Nepal [10]	Paquistão [11]	Espanha [12]	Turquia [13]
<i>Eremoplastron</i> Kofoid and MacLennan, 1932													
<i>Er. impalae</i> Dogiel, 1925	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Er. bovis</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Enoplastron</i> Kofoid and MacLennan, 1932													
<i>Eno. triloricatum</i> Dogiel, 1925	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Elytroplastron</i> Kofoid and Mac Lennan, 1932													
<i>Ely. bubali</i> Dogiel, 1928	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Polyplastron</i> Dogiel, 1927													
<i>Poly. Multivesiculatum</i> D.& F, 1925	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Epidinium</i> Crawley, 1923													
<i>Ep.bicaudatum</i> Sharp, 19 14	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ep.graini</i> Gocmen, 2000	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ep. ecaudatum</i> Fiorentini, 1889	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Ep. cattanei</i> Sharp, 1914	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Ep. caudatum</i> Fiorentini, 1889	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Ep. parvicaudatum</i> A. & Mutafova, 19 14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Ophryoscolex</i> Stein, 1858													
<i>Oph. caudatus</i> Eberlein, 1895	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Oph.purkynjei</i> Stein, 1858	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Oph. monoacanthus</i> F-G&Campos 1992	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Oph.bicoronatus</i> Dogiel, 1927	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

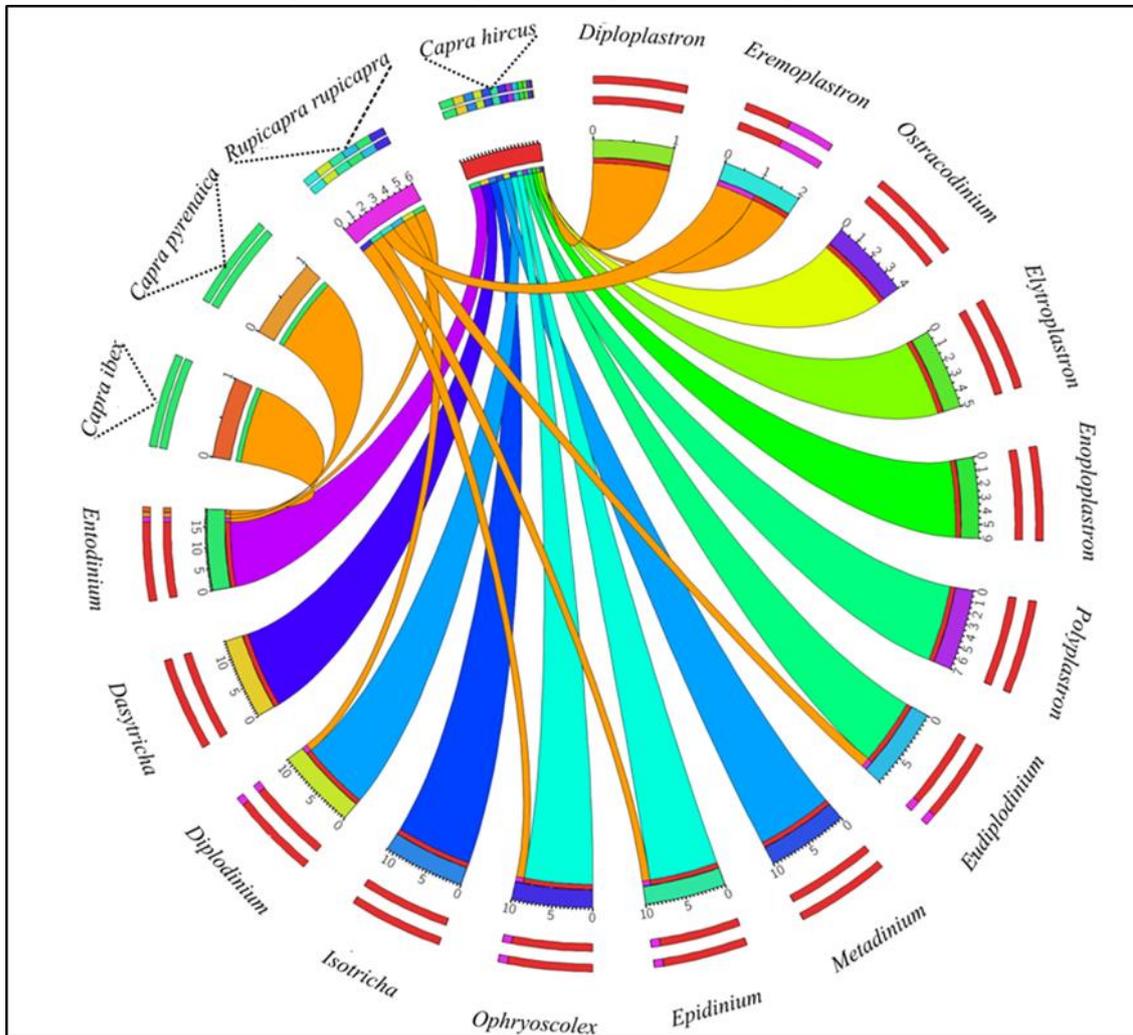
Fonte: 1] CRHA et al., 1985; [2] BARAKA, 2012; [3] CHRISTL, 1958; [4] TALARI et al., 2004; [5] DE LA FUENTE et al., 2006; [6] IMAI et al., 1978; ITO et al., 1995; [7] LEE, 1979; [8] GÜRELLI et al., 2016; [9] MOHAMED, 2017; [10] GURUNG et al., 2002; [11] LUBINSKY, 1955; LUBINSKY, 1957 [12]; FERNANDEZ-GALIANO & CAMPOS, 1992; DE LA FUENTE et al., 2009; [13] GÖÇMEN & ATATUR, 2002; GÖÇMEN & KARAOĞLU, 2005; GÖÇMEN & RASTGELDI, 2004; GÖÇMEN & SEZGIN, 2006; GÖÇMEN et al., 2002; GÖÇMEN et al., 2005; MERMER et al., 2003; MERMER et al., 2006; RASTGELD & GÖÇMEN, 2003; GÜRELLI, 2014.

Nos estudos sobre protozoários ciliados associados com caprinos, o gênero *Entodinium* foi o mais frequente (Figura 2), e as espécies *Entodinium nanellum*, *Entodinium caudatum*, *Entodinium longinucleatum*, *Entodinium exiguum*, *Entodinium dubardi*, *Entodinium simplex*, *Entodinium minimum*, *Epidinium ecaudatum*, *Isotricha prostoma* e *Dasytricha ruminantium*, as mais frequentes nas preparações das amostras (Figura 2 e Tabela 1). Esta observação é similar aos resultados publicados com protozoários ciliados associados com outros hospedeiros, em que os gêneros e espécies acima mencionados têm sido os mais frequentes nas observações. SELIM et al. (1996) realizaram estudo comparativo de ciliados do rúmen de três hospedeiros (búfalo, bovinos e ovinos) no Egito, tendo detectado a ocorrência de 20 espécies comuns entre búfalos e bovinos, enquanto 12 espécies foram comuns entre ovinos e os outros dois hospedeiros. Do estudo, o gênero *Entodinium*, com as espécies *Entodinium simplex*, *Entodinium nanellum* e *Entodinium exiguum*, apareceram mais frequentes em todos três hospedeiros.

BARAKA (2012) fez um estudo com 180 ruminantes domésticos, compostos por camelos, búfalos, bovinos, ovinos e caprinos. Similarmente, as espécies comuns presentes em todos os ruminantes foram: *Dasytricha ruminantium*, *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum* e *Epidinium bicaudatum*, mostrando, de igual maneira, serem as espécies frequentes nos estudos de protozoários ciliados associadas com ruminantes, principalmente domésticos. Como exemplo de outros estudos, com maior frequência de espécies da família Ophryoscolecidae, podemos citar OBANDA et al. (2008), em rinocerontes; FRANZOLIN; WRIGHT (2016), em búfalos; GÜRELLI (2016) e CEDROLA et al. (2020), em bovinos; e em camelos dromedários (GÜRELLI; DAW, 2020).

Visando identificar quais gêneros de ciliados do rúmen se associam a cada um dos hospedeiros foi plotado um diagrama circular (Figura 2). A espécie hospedeira *Capra hircus* teve maior associação com ciliados (14 gêneros), comparada com caprinos selvagens: *Capra ibex* que teve registro de um gênero, *Capra pyrenaica* também registrou associação com um gênero e *Rupicapra rupicapra* com seis gêneros.

Figura 2. Representação esquemática da associação de gêneros de protozoários ciliados e as espécies hospedeiras da subfamília Caprinae. Os números ao redor do círculo, representam a quantidade de vezes em que um gênero foi observado num hospedeiro. As cores vermelhas, rosa, caramelo e laranja escura das barras, representam, respectivamente, os hospedeiros *Capra hircus*, *Rupicapra rupicapra*, *Capra pyrenaica*, *Capra ibex* e os gêneros neles associados. As fitas no meio do círculo indicam a associação entre as espécies hospedeiras e os gêneros.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

DEHORITY; ODENYO (2003) em estudo envolvendo amostras de hospedeiros selvagens (girafa, antílope, impala, gazela africana, gazela-de-grant, elande, vaca-do-mato e gnu) e amostras de ruminantes domésticos (zebu, ovinos e caprinos) demonstraram que em ruminantes domésticos havia uma porcentagem muito mais elevada de ciliados do gênero *Entodinium*, comparada com a menor porcentagem em hospedeiros selvagens do estudo. Uma das hipóteses que pode explicar o menor número de gêneros associados a selvagens, além dos hábitos alimentares, pode estar associada com o complexo processo de obtenção e coleta de

amostras, comportamento dos ungulados selvagens, se compararmos as mesmas variáveis em animais domésticos. Este fato, pode permitir que haja mais estudos com ruminantes de ambientes domésticos do que em selvagens (ARAUJO et al., 2020).

3.4.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ESPECIFICIDADE

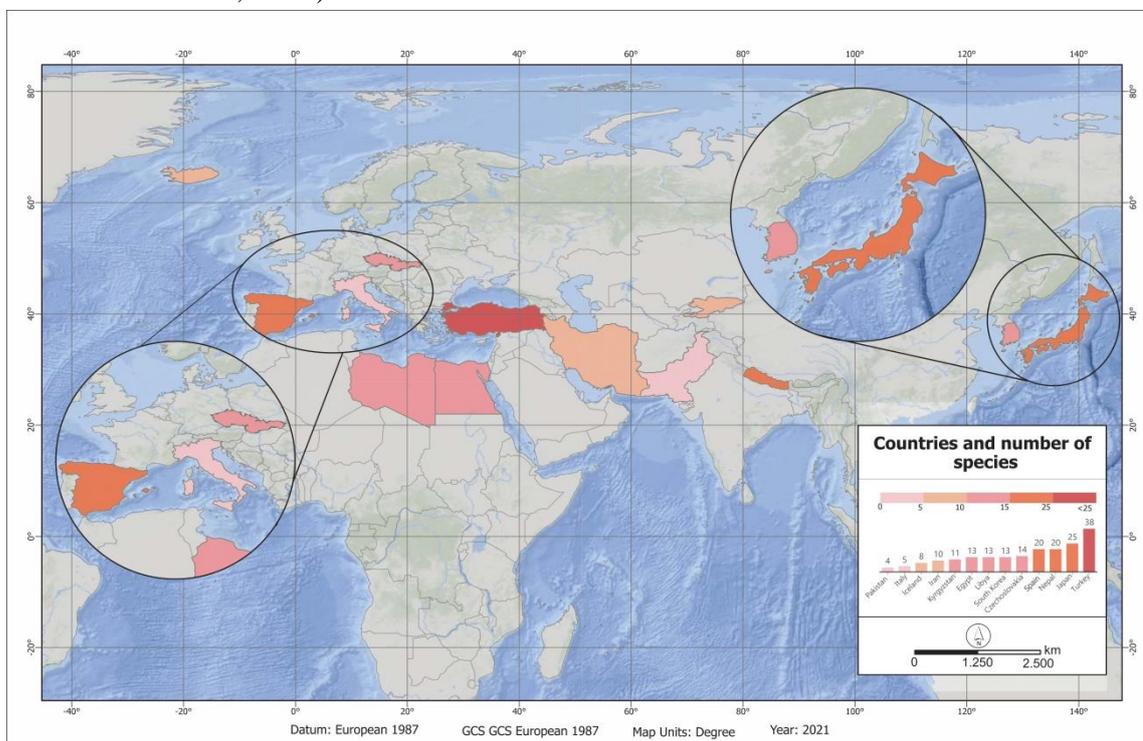
Os protozoários ciliados simbioses são representados aproximadamente por 3.000 organismos conhecidos (LYNN, 2008), dos quais em torno de 1000 espécies pertencem a subclasse Trichostomatia (LYNN, 2008). Essas comunidades de ciliados endossimbiontes têm sido observadas em hospedeiros de quase todas as regiões geográficas ao redor do mundo (KOFOID, 1935; SELIM et al., 1996; ITO; IMAI, 2000; CAMERON; O'DONOGHUE, 2003; DEHORITY; ODENYO, 2003; TALAR et al. 2004; MISHIMA et al., 2009; GÜRELLI; AKMAN, 2016; CEDROLA et al., 2017; ITO et al., 2017; GÜRELLI, 2019). Nesta revisão, identificamos 13 países onde os protozoários ciliados associados com caprinos já foram observados (Figura 3).

Dos 13 países evidenciados no mapa, destacam-se o Japão e Turquia como localidades com maior distribuição do número de espécies (≥ 25) de protozoários ciliados. Contrariamente a essas duas localidades, a Itália e Paquistão, ficaram representadas com ≤ 5 espécies por região. As localidades com os números intermediários da quantidade de espécies foram Islândia com oito espécies, Irão com dez espécies, Quirguistão com onze espécies, Egito com treze espécies, Líbia com treze espécies, Coreia do Sul com treze espécies, Tchecoslováquia com quatorze espécies, Espanha com vinte espécies e Nepal também com vinte espécies (Figura 3).

O número de espécies de ciliados observadas em cada região do mapa foi influenciado pela quantidade de estudos realizados nessas localidades. Turquia com um total de dez estudos (GÖÇMEN; ATATUR, 2002; GÖÇMEN et al., 2002; RASTGELD; GÖÇMEN, 2003; MERMER et al., 2003; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004; GÖÇMEN; KARAOĞLU, 2005; GÖÇMEN et al., 2005; GÖÇMEN; SEZGIN, 2006; MERMER et al., 2006; GÜRELLI, 2014), Japão com dois estudos (IMAI et al., 1978; ITO et al., 1995), Nepal um estudo (GURUNG et al., 2002), Espanha dois estudos (FERNANDEZ-GALIANO; CAMPOS, 1992; DE LA FUENTE et al., 2009), antiga Tchecoslováquia um estudo (CRHA et al., 1985), Coreia do Sul um estudo (LEE, 1979), Líbia um estudo (MOHAMED, 2017), Egito um estudo (BARAKA, 2012), Quirguistão um estudo (GÜRELLI et al., 2016), Irão um estudo (TALARI et al., 2004), Islândia um estudo (DE LA FUENTE et al., 2006), Paquistão dois estudos (LUBINSKY, 1955; LUBINSKY, 1957) e Itália com um estudo (CHRISTL, 1958).

De forma similar, o número de hospedeiros caprinos usados para o processo de coleta das amostras em cada estudo pode ter influenciado a quantidade das espécies em cada região, por exemplo, nos estudos realizados na Turquia, foram utilizados 86 caprinos na coleta de amostras, comparados com um hospedeiro usado no estudo da Itália.

Figura 3. Distribuição geográfica e quantitativa das espécies de protozoários ciliados associadas com caprinos. Algumas regiões no mapa (Espanha, Tchecoslováquia, Itália, Coreia do Sul e Japão) foram ampliadas para melhor visualização dos limites geográficos (LUBINSKY, 1955; CHRISTL, 1958; IMAI et al., 1978; LEE, 1979; CRHA et al., 1985; FERNANDEZ-GALIANO; CAMPOS, 1992; ITO et al., 1995; GURUNG et al., 2002; GÖÇMEN; ATATUR, 2002; GÖÇMEN et al., 2002; MERMER et al., 2003; RASTGELD; GÖÇMEN, 2003; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004; TALAR et al., 2004; GÖÇMEN et al., 2005; GÖÇMEN; KARAOĞLU, 2005; DE LA FUENTE et al., 2006; MERMER et al., 2006; GÖÇMEN; SEZGIN, 2006; DE LA FUENTE et al., 2009; BARAKA, 2012; GÜRELLI, 2014; GÜRELLI et al., 2016; MOHAMED, 2017).



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Em termos de hospedeiros, os organismos endossimbiontes da subclasse Trichostomatia são distribuídos no trato digestivo de quase todos os animais herbívoros pertencentes a Artiodactyla, Perissodactyla e Proboscida (OGIMOTO; IMAI, 1981). Alguns desses ciliados possuem ampla distribuição em hospedeiros, porém, outros têm sido limitados em um grupo determinado de hospedeiros (CEDROLA et al., 2020), tendo sido relatado que alguns ciliados do rúmen de gado bovino sobrevivem no rúmen de caprinos (DOGIEL;

WINOGRADOWA-FEDOROWA, 1930). Ainda relativo à especificidade, um distinto padrão de associação tem sido reconhecido e apesar de não ser comum, existem ciliados mais associados e frequentemente encontrados na região pré-gástrica e outros na região pós-gástrica dos seus hospedeiros (OGIMOTO; IMAI, 1981, MOON-VAN DER STAAY et al., 2014).

De uma forma geral e sob ponto de vista ecológico, os organismos da subclasse Trichostomatia são considerados bastante promíscuos pelo fato de um número consideravelmente maior ter sido encontrado não só em espécies hospedeiras estreitamente relacionadas, mas também, com aqueles comparativamente distantes (WILLIAMS; COLEMAN, 1992; DEHORITY, 1995; KITTELMANN; JANSSEN, 2011; VĎAČNÝ, 2018) no trato digestivo de cavalos, zebras, rinocerontes, hipopótamos, roedores, búfalos, marsupiais (Figura 4) (CEDROLA et al., 2020), em aves (BARDELE et al., 2017), em peixes, anfíbios e répteis (LEVINE, 1985; BRADBURY, 1994), em primatas (VALLO et al., 2012; SCHOVANCOVÁ et al., 2013).

As espécies de ciliados associadas com caprinos mostram ocorrência em outros hospedeiros, tais como antílope, antílope africano, alpaca, búfalo, cabrito azul antílope bontebok, bisonte, gado bovino, camelos, cervos, capivara, alce, gazela-persa, girafa, cudo, lhamas, boi-almiscarado, rinocerontes, ovinos, cabra-de-leque, facocero, gnu, yak, dentre outros (Figura 4).

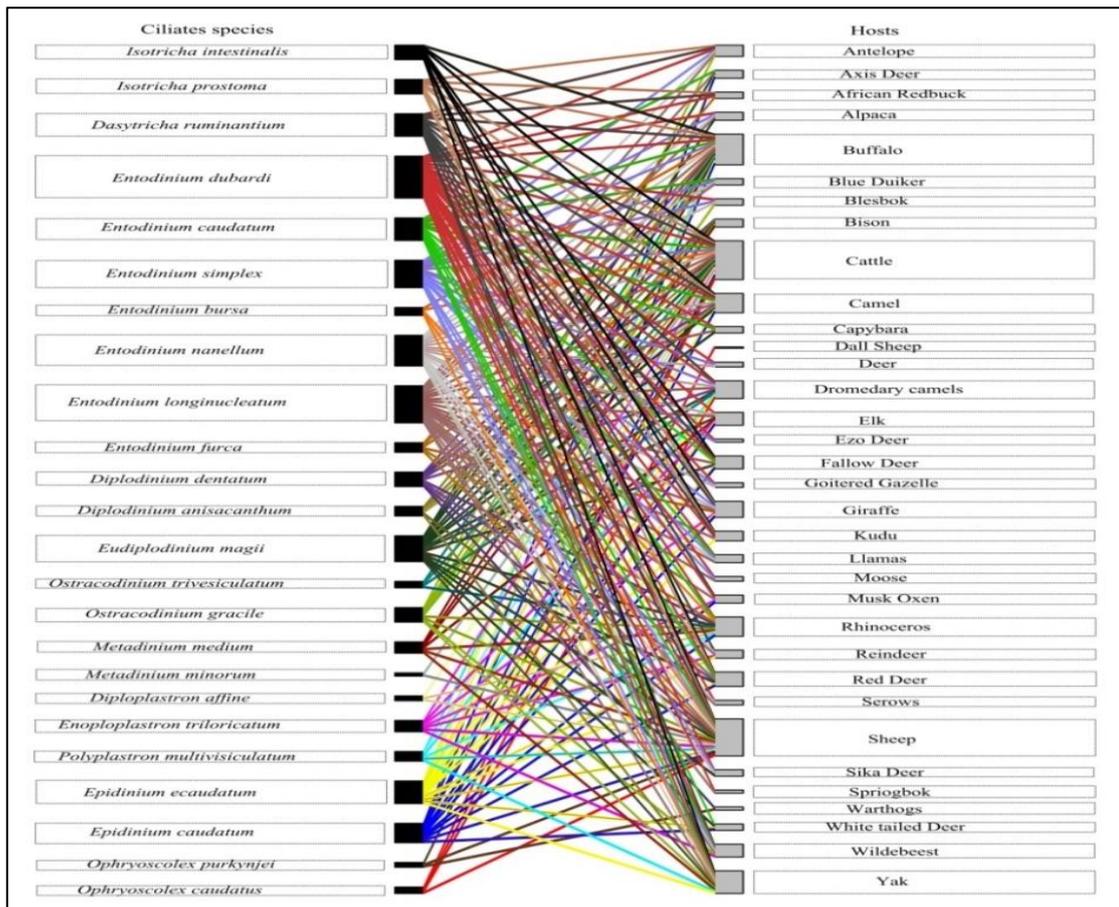
Na rede de interação ilustrada, as espécies *Entodinium caudatum*, *Entodinium longinucleatum*, *Entodinium nanellum*, *Entodinium simplex*, *Entodinium dubardi*, *Epidinium caudatum*, *Epidinium ecaudatum* e *Eudiplodinium magii* foram observadas em caprinos e outros hospedeiros, incluindo cervos e alces (Figura 4).

Por outro lado, os hospedeiros: gado bovino, búfalo, ovinos, camelos, bisonte, e yak foram os que apresentaram maior associação com protozoários ciliados das seguintes espécies: *Isotricha intestinalis*, *Isotricha prostoma*, *Dasytricha ruminantium*, *Entodinium dubardi*, *Entodinium caudatum*, *Entodinium simplex*, *Entodinium bursa*, *Entodinium nanellum*, *Entodinium longinucleatum*, *Entodinium furca*, *Diplodinium dentatum*, *Diplodinium anisacanthum*, *Eudiplodinium magii*, *Ostracodinium trivesiculatum*, *Ostracodinium gracile*, *Metadinium medium*, *Metadinium minorum*, *Diploplastron affine*, *Enoploplastron triloricaum*, *Polyplastron multivesiculatum*, *Epidinium ecaudatum*, *Epidinium caudatum*, *Ophryoscolex purkynjei* e *Ophryoscolex caudatus*.

Essa diferença na quantidade de espécies de ciliados associadas com hospedeiros, deve-se possivelmente pelo fato de os primeiros (deer, white-tailed e moose) apresentarem os

hábitos alimentares com menos fibra, e os segundos (cattle, buffalo, sheep, camels, bison e Yak) menos seletivos e com mais fibras na dieta (OGIMOTO; IMAI, 1981).

Figura 4. Rede de interação entre espécies de protozoários ciliados associadas com caprinos e outros hospedeiros. As barras com as cores cinza e preta representam alguns hospedeiros que se associam com ciliados e as espécies de protozoários ciliados, respectivamente. As setas de cores (preto ao vermelho), representam as associações entre hospedeiros e espécies de ciliados. O tamanho das barras cinza e preta, representam os hospedeiros e espécies de ciliados com maior ou menor associação vice-versa.



Fonte: (DOGIEL, 1928; DEHORITY, 1974; VASILY; MITCHELL, 1974; WILKINSON; VAN HOVEN, 1976; KLEYNHANS; HOVEN, 1976; VAN HOVEN et al., 1979; DEHORITY, 1987; TOWNE et al., 1988; DEHORITY, 1995; SELIM et al., 1996; DEHORITY, 1997; WRIGHT; LYNN, 1997; SELIM et al., 1999; DEHORITY et al., 1999; FRANZOLIN; DEHORITY, 1999; SU et al., 2000; IMAI et al., 2004; TALAR et al., 2004; DE LA FUENTE et al., 2006; OBANDA et al., 2008; DEL VALLE et al., 2008; MARTINELE; D'AGOSTO, 2008; MISHIMA et al., 2009; BOOYSE; DEHORITY, 2012; BARAKA, 2012; BOOYSE et al., 2014; BOOYSE et al., 2015; CERÓN CUCCHI et al., 2016; CEDROLA et al., 2016; CEDROLA et al. 2017; KIMURA et al., 2017; GÜRELLI, 2017; GÜRELLI, 2018; CEDROLA et al., 2018)

3.4.4 NOTAS FILOGENÉTICAS

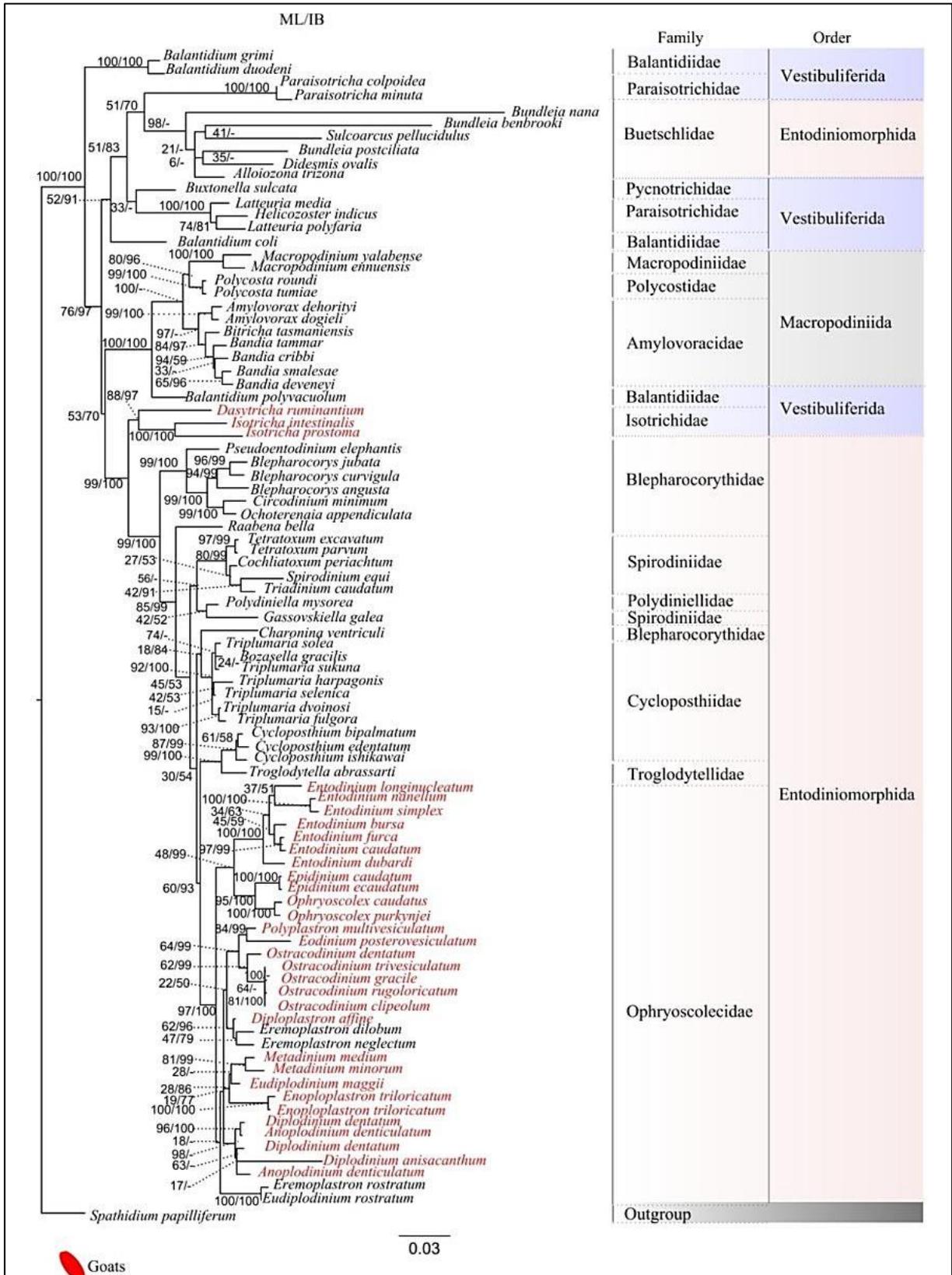
Todas as espécies de ciliados registradas até o momento no rúmen de caprinos são endossimbiontes da subclasse Trichostomatia. Foi observada grande semelhança entre as topologias obtidas neste estudo, com base nas análises de ML e BI. Os ciliados associados a caprinos formam um grupo merofilético (Figura 5). Ambas as inferências filogenéticas recuperaram uma divisão de todas as espécies em três ordens (Vestibuliferida, Macropodiniida e Entodiniomorphida), sendo que as espécies associadas com caprinos ficaram restritas a duas famílias distintas com alto valor de suporte, Ophryoscolecidae (97/100) e Isotrichidae (99/100) (Figura 5). Esta tendência de agrupamento de protozoários ciliados endossimbiontes observada nesta revisão tem sido reportada em outros estudos anteriores com as espécies da subclasse Trichostomatia (VĎAČNÝ, 2018; CEDROLA et al., 2020).

Ainda sobre a topologia, a ordem Entodiniomorphida ficou dividida em dois clados, um constituído pelas espécies da família Buetschliidae, e a outro formado pelas espécies das famílias Ophryoscolecidae, Cycloposthiidae, Troglodytellidae, Spirodiniidae, Polydiniellidae e Blepharocorythidae. A ordem Vestibuliferida ficou formada por três clados separados, o primeiro constituído pelas famílias Balantidiidae e Paraisotrichidae, o segundo pelas famílias Pycnotrichidae, Paraisotrichidae e Balantidiidae e por último, o terceiro formada por espécies das famílias Isotrichidae e Balantidiidae (Figura 5).

Ambas as topologias recuperaram altos valores de suporte (100% de ML e 100% de IB) nos clados das seguintes espécies: *Entodinium simplex* e *Entodinium nanellum*, *Entodinium furca* e *Entodinium caudatum*, *Ophryoscolex purkynjei* e *Ophryoscolex caudatus*, *Epidinium caudatus* e *Epidinium ecaudatum*, *Isotricha intestinalis* e *Isotricha prostoma*. Por outro lado, outros clados formados similarmente por espécies de ciliados associadas com caprinos tiveram os seguintes valores de suporte: *Metadinium minorum* e *Metadinium medium* (81ML/99BI), *Eodinium posterovisiculatum* e *Polyplastron multivesiculatum* (84ML/99BI), e o clado constituído por *Anoplodinium denticulatum* e *Diplodinium dentatum* (96ML/100BI) (Figura 5).

Figura 5. Árvore filogenética obtida por máxima verossimilhança representando relações evolutivas de algumas espécies de ciliados, com base em sequências de 18S rDNA. A cor vermelha representa as espécies observadas em estudos com amostras de rúmen de caprinos. A subclasse Haptoria foi escolhida como grupo externo. Os valores em cada nó da árvore significam, respectivamente: valores de máxima verossimilhança (ML)

bootstrap e inferência bayesiana (BI) de probabilidade posterior. A barra de escala representa 3 substituições por 100 posições de nucleotídeos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.4.5 ORIGEM E DIVERSIFICAÇÃO DE CILIADOS EM CAPRINAE

Em geral, estima-se que a subclasse Trichostomatia pode ter surgido dentro da ordem Spathidiida há aproximadamente 260 Ma, num período estimado em máximo e mínimo em torno de ~168 - 395 Ma (VĎAČNÝ, 2015). No entanto, inferências do tempo de divergência, têm estimado que o processo de radiação da subclasse pode ter ocorrido logo após o início do Cretáceo, estimado em ~ 135 Ma, período pelo qual, pode ter ocorrido o processo de separação dos mamíferos therios em dois grupos, marsupiais e placentários (VĎAČNÝ, 2018). Por conseguinte, as linhagens Vestibuliferida e Entodiniomorphida podem ter surgido antes de ~ 65 Ma, sendo que a radiação de espécies de ciliados do rúmen, representados majoritariamente pela família Ophryoscolecidae, podem ter surgido segundo os autores, um pouco depois de ~ 65 milhões de anos (VĎAČNÝ, 2018).

Nós inferimos que, a origem de espécies de protozoários ciliados associadas com caprinos (família Isotrichidae e família Ophryoscolecidae) foi estimada para ~ 8.2 Ma e ~ 2.4 Ma, nos períodos Neogeno e Quaternário, respectivamente (Figura 6). O intervalo de confiança (CI) de 95% foi de (4.3 - 15.5) Ma para família Isotrichidae e (1.0 - 5.7) Ma para família Ophryoscolecidae. Este resultado, mostra uma estimativa de datação bem mais recente dos protozoários ciliados associados com caprinos, sendo diferente se comparado com os resultados dos trabalhos anteriores que estimam em um tempo muito mais antigo em ~ 36 Ma (ROSSI et al., 2017) e ~ 45 Ma (WRIGHT; LYNN, 1997) para a família Ophryoscolecidae.

As diferenças de estimativa aqui observadas podem estar relacionadas com os diferentes métodos utilizados nas análises de datação, especificamente, na variação dos pontos de calibração utilizados (Tabela 2). WRIGHT; LYNN, (1997) utilizaram a informação fóssil do hospedeiro como ponto de calibração, e por outro lado, ROSSI et al. (2017) fizeram as estimativas do tempo para o grupo baseando-se em informações primárias de dados fósseis (Tabela 2). A calibração primária é um método mais adequado, mas que neste caso como não há informações de registro fóssil, o que foi possível fazer é reestimar a datação com idades previamente estimadas para o clado. Por isso, neste trabalho, foi utilizada uma calibração secundária, com os pontos de 3.8Ma como mínimo e 23.8Ma como máximo (COSTA et al., 2021). Para além da aplicação de métodos diferentes nos estudos que envolvem datações, as calibrações secundárias tem sido apontadas como fator que contribui na falta de exatidão nas estimativas do tempo molecular (GRAUR; MARTIN, 2004; SCHENK, 2016).

Tabela 2. Métodos de estimativa de tempo de divergência das classes de ciliados simbiotes

	Modelo do relógio molecular/Prior da taxa evolutiva	Prior para calibração	Tipo de dados	Método utilizado
Wright & Lynn, 1997	Estrito	Calibrações baseadas no registro fóssil do hospedeiro	Nucleotídeos	Distância genética
Vd'ačný, 2015	Bayesiano relaxado: taxa independente e correlação de taxas	Calibrações baseadas nas estimativas disponíveis por Wright & Lynn (1997)	Nucleotídeos	MCMCtree
Rossi et al., 2017	Relaxado com verossimilhança penalizada	Calibrações flexíveis	Nucleotídeos	TreePL
Vd'ačný, 2018	Bayesiano relaxado	Calibração baseada na origem dos hospedeiros e dos seus períodos de radiação	Nucleotídeos	MCMCtree
Rataj & Vd'ačný, 2018	Bayesiano: modelo evolutivo, taxa heterogênia, relógio relaxado, distribuição normal do prior e processo de nascimento e morte	Calibrações baseadas no registro fóssil de hospedeiros	Nucleotídeos	MCMCtree
Fernandes & Schrago, 2019	Bayesiano relaxado: modelo de taxas independentes e de taxas correlatadas	Calibrações baseadas no registro fóssil de ciliados	Aminoácidos	MCMCtree
Fernandes & Schrago, 2019	Bayesiano relaxado: modelo de taxas independentes e de taxas correlatadas	Calibrações baseadas nos valores adquiridos na análise de dataset de proteínas	Nucleotídeos	MCMCtree
Costa et al., 2021	Relógio baseado no método de máxima verossimilhança	Calibrações baseadas no registro fóssil de ciliados	Nucleotídeos	Reltime-ML
Presente estudo	Relógio baseado no método de máxima verossimilhança	Calibrações secundárias	Nucleotídeos	Reltime-ML

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

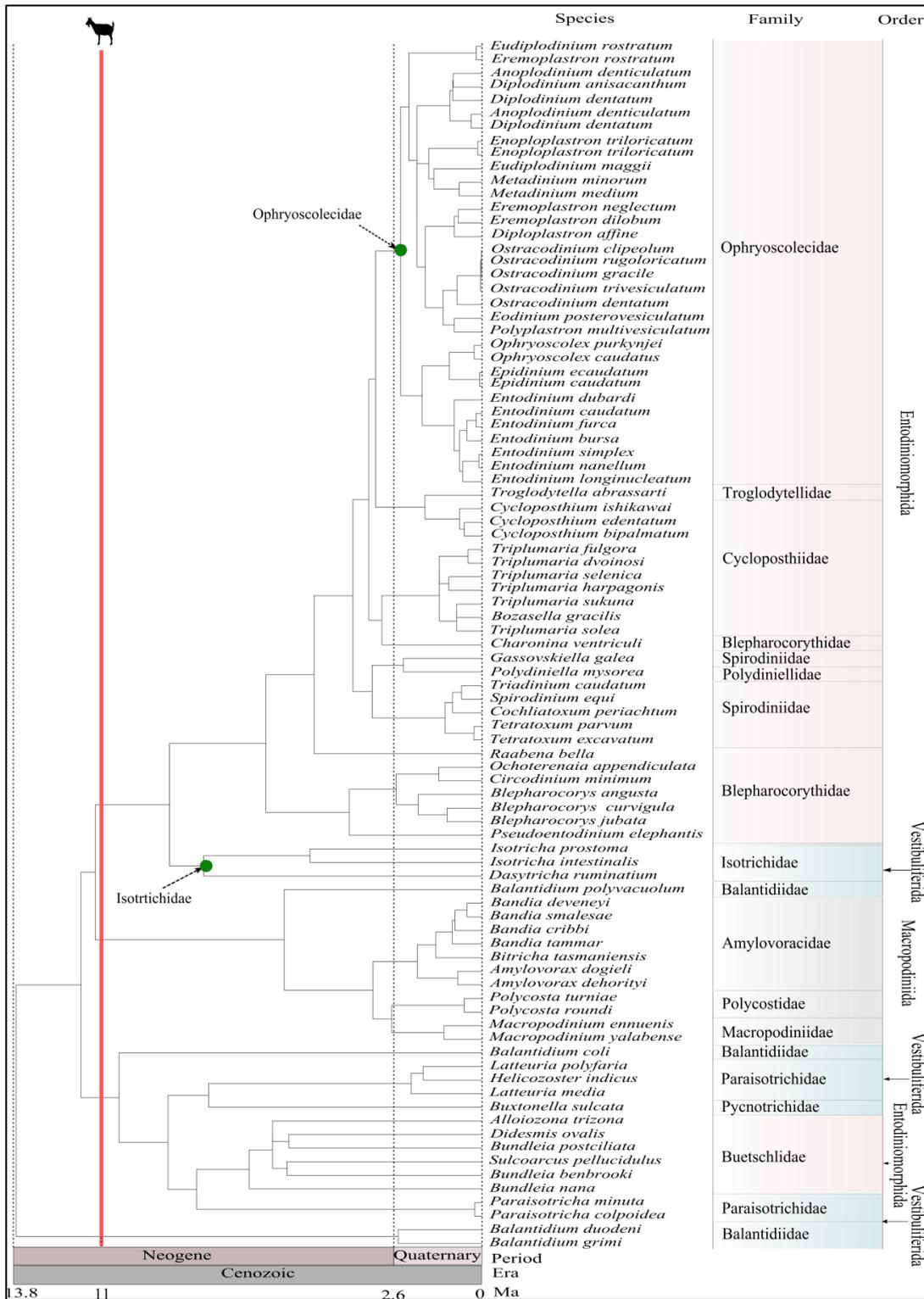
A subordem Ruminantia pode ter surgido a partir da radiação de artiodáctilos selenodontes (WEBB; TAYLOR, 1980). A sua maior taxa de diversificação foi sugerida ter ocorrido durante o Cenozoico num intervalo entre 20-30Ma (FERNANDEZ; VRBA, 2005; ROSSI et al., 2017). A subordem inclui aproximadamente 200 espécies existentes distribuídas em seis famílias (Tragulidae, Giraffidae, Antilocapridae, Moschidae, Cervidae e Bovidae) e constitui o grupo mais importante de herbívoros terrestres de grande porte em mamíferos (FERNANDEZ; VRBA, 2005).

Dentro de Ruminantia, a família Bovidae inclui aproximadamente 140 espécies vivas, distribuídas em 48 gêneros e seis subfamílias (Bovinae, Cephalophinae, Hippotraginae, Alcelaphinae, Antilopinae e Caprinae) (HASSANIN; DOUZERY, 1999; HUANG et al., 2005). Embora não existam consensos sobre a radiação da subfamília Caprinae (ovinos, caprinos e espécies afins que vivem principalmente em habitats remotos e montanhosos), a partir de dados fósseis, alguns estudos apontam que uma possível radiação deste grupo pode ter ocorrido a partir de ~14 Ma (VRBA, 1985) até a mais recente radiação Miocênica (GENTRY, 1994). Um outro grupo de autores (ROPIQUET; HASSANIN, 2005 a, b; LALUEZA-FOX et al., 2005) têm proposto uma radiação baseada em calibrações moleculares. E segundo estes, a radiação da subfamília Caprinae pode ter ocorrido a partir de ~11 Ma a ~6.2 Ma (Figura 6).

Apesar das controvérsias continuarem, o grupo majoritário dos ruminantes atuais considerados potenciais hospedeiros de Ophryoscolecidae são de origem pós-glacial, em que a sua diversificação é estimada ter ocorrido não antes do Plioceno/Pleistoceno (SPRINGER et al., 2003; MOON-VAN DER STAAY et al., 2014). De acordo com os métodos utilizados nesta revisão, a idade de 8.2Ma num intervalo de confiança entre 4.3-15.5Ma foi proposta para espécies de ciliados (Isotrichidae) associadas com caprinos. Similarmente, 2.4Ma num intervalo de confiança de 1.0-5.7Ma foi proposta como a idade das espécies de ciliados (Ophryoscolecidae) igualmente associadas com caprinos (Figura 6 e Tabela 3).

Considerando o período de radiação proposto para Caprinae, as idades propostas neste trabalho, permitem inferir a hipótese de que, nos períodos Neogene e Quaternário (era Cenozoica), já eram momentos do tempo geológico com condições adequadas para a diversificação dos protozoários ciliados associados com caprinos, visto que, nessa altura já existia um nicho para sua colonização. Futuramente, esperamos que estudos possam confirmar esses dados com calibrações primárias a partir do estudo de fósseis para o grupo.

Figura 6. Filogenia datada de ciliados endossimbiontes da subclasse Trichostomata. A faixa vermelha vertical, representa o período da radiação da subfamília Caprinae (ROPIQUET; HASSANIN, 2005 a, b). Os círculos de cor verde, representam os nós e o possível período em milhões de anos de diversificação das famílias Isotrichidae (4.3-15.5) e Ophryoscolecidae (1.0-5.7). Ma: milhões de anos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Tabela 3. Tempo de divergência(Ma) da raiz de Ciliophora e das classes de ciliados simbioses por estudo. Ma- Milhões de anos, *-Apenas para Ophryoscolecidae ,**- Apenas para Ophryoscolecidae e Isotrichidae.

	Raiz de					Oligohymen-
	Ciliophora	Litostomatea	Trichostomatia	Armophorea	Phyllopharyngea	ophorea
Wright & Lynn, 1997	2200	(1685-1872)	(656-590)	-	-	(1980-2200)
Vd'ačný, 2015	-	680(627-764)	260(168-395)	-	-	-
Rossi et al., 2017	-	-	~36*	-	-	-
Vd'ačný, 2018	-	-	~135	-	-	-
Rataj & Vd'ačný, 2018	-	-	-	-	-	1256.42
Fernandes & Schrago, 2019	1034 (691-585)	334 (181-585)	-	318 (154-580)	-	775 (496-1058)
Fernandes & Schrago, 2019	1143 (1061-1242)	539(436-600)	-	409(186-557)	483(229-713)	799 (662-1058)
Costa et al., 2021	823 (719-942)	368(274-493)	9.5(4-24)	-	222(229-713)	307(258-366)
Presente estudo	-	-	(1.0-15.5)**	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

3.5 CONCLUSÕES

Realizamos uma breve revisão e checklist de espécies por meio de trabalhos de taxonomia, morfologia, ecologia de protozoários ciliados associados com hospedeiros da subfamília Caprinae. De acordo com a revisão, 72 espécies e 14 gêneros de ciliados já foram registrados associados a caprinos domésticos e selvagens (*Capra hircus*, *Rupicapra rupicapra*, *Capra pyrenaica* e *Capra ibex*). As hipóteses filogenéticas recuperadas demonstram que as espécies associadas a caprinos formam um grupo merofilético, sendo agrupadas nas famílias Ophryoscolecidae e Isotrichidae. De acordo com os métodos utilizados no trabalho, uma idade máxima e mínima em torno de 8.2Ma e 2.4Ma, foi proposta para espécies de ciliados associadas com caprinos, Ophryoscolecidae e Isotrichidae, respectivamente. Com este resultado, permite concluir ainda que, nos períodos Neogene e Quaternário já era possível a diversificação dos ciliados de caprinos, visto que nessa época o nicho para sua colonização já era disponível. Para além de ser o primeiro trabalho de checklist envolvendo protozoários ciliados em caprinos, constatamos igualmente que a escassez de publicações de trabalhos de descrição taxonômica e morfológica de ciliados do rúmen nestes hospedeiros, contribui com a falta de conhecimento da ciliatofauna deste grupo de ruminantes. Assim, enfatizamos a importância na utilização de várias técnicas e de forma integrativa para melhoria nas descrições detalhadas e melhor conhecimento da composição da fauna de ciliados.

REFERÊNCIAS

- ASANUMA, N.; YOKOYAMA, S.; HINO, T. Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. **Animal Science Journal**, 86(4), 378–384, 2015. <https://doi.org/10.1111/asj.12307>.
- ABECIA, L.; MARTÍNEZ-FERNANDEZ, G.; WADDAMS, K.; MARTÍN-GARCÍA, A.I.; PINLOCHE, E.; CREEVEY, C. J.; DENMAN, S.E.; NEWBOLD, C. J.; YÁÑEZ-RUIZ, D. R. Analysis of the Rumen Microbiome and Metabolome to Study the Effect of an Antimethanogenic Treatment Applied in Early Life of Kid Goats. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2227, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02227>.
- ABUBAKR, A.R.; ALIMON, A.R.; YAAKUB, H.; ABDULLAH, N.; IVAN, M. Digestibility, rumen protozoa, and ruminal fermentation in goats receiving dietary palm oil by-products. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 12, 147–154, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.11.002>.
- ARGÔLO, L. S. Microbiota ruminal de cabras lactantes alimentadas com algaroba (prosopis juliflora (sw) dc): Análise funcional e molecular. **Doctoral dissertation**, Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia–Uesb, 2007. 123pp.
- ARAUJO, B. M.; DA SILVA, Z. R. J.; ROMÁN, P. R.; SALINAS, C. O. Comparison of two parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in a population of iberian ibex (*capra pyrenaica schinz*, 1838) in the sierra de guadarrama national park (spain). **Archives of Veterinary Science**, 25,2, 2020. <https://doi.org/10.5380/avs.v25i2.70646>
- AZIZ, H.A.; NASSAR, M.S.; BADWAY, H.S.; ABD ELRAHAMAN, M. H. Rumen fermentations and rumen ciliate protozoa of goat kids fed diets with different concentrate: roughage ratio. **Egyptian Journal Nutrition and Feeds**, 21(3), 667–683, 2018. <https://doi.org/10.21608/EJNF.2018.75770>.
- BARAKA, T.A . Comparative Studies of Rumen pH, Total Protozoa Count, Generic and Species Composition of Ciliates in Camel, Buffalo, Cattle, Sheep and Goat in Egypt. **Journal of American Science**, 8 (2), 655–669, 2012.
- BARDELE, C. F.; SCHULTHEI, S.; LYNN, D. H.; WRIGHT, A. D. G.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; OBISPO, N. E. *Aviisotricha hoazini* n. gen., n. sp., the morphology and molecular phylogeny of an anaerobic ciliate from the crop of the Hoatzin (*Opisthocomus hoazin*), the cow among the birds. **Protist**, 168(3), 335–351, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2017.02.002>.
- BRADBURY, P. C. Ciliates of fish. Parasitic protozoa. **Academic Press**, 1994. 81–138pp
- BERBER, B.; GÜRELLI, G. Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep in Kastamonu, Turkey, and Infraciliature of *Diplodinium quinquespinosum*, *Metadinium affine*, and *M. tauricum*

(Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae). **Zootaxa**, 4695(6), 550–558, 2009. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4695.6.5>.

BOOYSE, D.; DEHORITY, B. A. Rumen protozoa in South African sheep with a summary of the worldwide distribution of sheep protozoa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 78(1), 1–7, 2011.

BOOYSE, D. G.; DEHORITY, B. A. Protozoa and digestive tract parameters in Blue wildebeest (*Connochaetes taurinus*) and Black wildebeest (*Connochaetes gnou*), with description of *Entodinium taurinus* n. sp. **European Journal of Protistology**, 48(4), 283–289, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2012.04.004>.

BOOYSE, D. G.; DEHORITY, B. A.; REININGHAUS, B. Rumen ciliates in the African (Cape) buffalo (*Syncerus caffer caffer*) living in the vicinity of the Orpen Gate entrance into Kruger National Park, South Africa. **Zootaxa**, 3846 (1), 138–144, 2014.

BOOYSE, D. G.; DEHORITY, B. A.; MYBURGH, J. G. The effect of acid drinking water on rumen protozoa in the blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*). **Zootaxa**, 4052(5), 577–582, 2015.

CARVALHO, L.F.P.B.; AMORIM, G. L.; MATOS, D.S.; BATISTA, A.M.V.; MORAES, A.C.A.; CABRAL, A. M.D. Protozoários do rúmen de caprinos submetidos a dieta com casca de soja. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 12(1), 244–253, 2011.

CAMERON, S.L.; ADLARD, R.D.; O'DONOGHUE, P. J. Molecular evidence for an independent radiation of holotrich trichostome ciliates in Australian marsupials. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 20, 302–310, 2001. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0986>.

CAMERON, S.L.; O'DONOGHUE, P. J. Trichostome ciliates from Australian marsupials. IV. Distribution of the ciliate fauna. **European Journal of Protistology**, 39(2), 139–147, 2003. <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00892>

CASTRESANA, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. **Molecular Biology and Evolution**, 17 (4), 540–552, 2000. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>

CEDROLA, F.; ROSSI, M.; DIAS, R.J.P.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. **Zoological Science**, 32(1), 8–15, 2015. <https://doi.org/10.2108/zs140125>.

CEDROLA, F.; MARTINELE, I.; DIAS, R. J. P.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO M. Rumen ciliates in Brazilian sheep (*Ovis aries*), with new records and redescription of *Entodinium contractum* (Entodiniomorphida: Ophryoscolecidae). **Zootaxa**, 4088(2), 292–300, 2016. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4088.2.10>.

CEDROLA, F.; DIAS, R. J. P.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. Description of *Diploplastron dehorityi* sp.nov. (Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae), a new rumen ciliate from Brazilian sheep. **Zootaxa**, 4258, 581–585, 2017. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4258.6.8>

- CEDROLA, F.; ROSSI, M.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. J.P. Morphology and description of infraciliary bands pattern in four *Metadinium* Awerinzew & Mutafova, 1914 species (Ciliophora, Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) with taxonomic notes on the genus. **Zootaxa**, 4500(4), 574–580, 2018. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4500.4.6>.
- CEDROLA, F.; SENRA, M. V. X.; ROSSI, M.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. J. P. Trichostomatid Ciliates (Alveolata, Ciliophora, Trichostomatia) Systematics and Diversity: Past, Present, and Future. **Frontiers Microbiology**, 10, 2967, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02967>
- CERÓN CUCCHI, M. E.; MARCOPPIDO, G. A.; DEKKER, A.; FONDEVILA, M.; DE LA FUENTE, G.; MORICI, G.; CRAVERO, S. L. P. Ciliate protozoa of the forestomach of llamas (*Lama glama*) from locations at different altitude in Argentina. **Zootaxa**, 20, 49–56, 2016.
- CHRISTL, H. Beiträge Zur Kenntnis der Panseninfusorien Einheimischer Wiederkäuer I Gemse (*Rupicapra rupicapra* L). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, 17, 185–192, 1955. <https://doi.org/10.1007/BF00259321>.
- CHRISTL, H. *Entodinium alpinum* n. sp. (*caliata*) aus dem Pansen eines Alpensteinbockes (*Capra ibex ibex*). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, 18, 297–307, 1958. <https://doi.org/10.1007/BF00259659>.
- CRHA, J.; HRABE, V.; KOUBEK, P. Rumen ciliate fauna in the chamois (*Rupicapra rupicapra* L.). **Acta Veterinaria Brno**, 54, 141–147, 1985. <https://doi.org/10.2754/avb198554030141>.
- CREMONESI, P.; CONTE, G.; SEVERGNINI, M.; TURRI, F.; MONNI, A.; CAPRA, E.; RAPETTI, L.; COLOMBINI, S.; CHESSA, S.; BATTELLI, G.; ALVES, S.P.; MELE, M.; CASTIGLIONI, B. Evaluation of the effects of different diets on microbiome diversity and fatty acid composition of rumen liquor in dairy goat. **Animal**, 12(9), 1–11, 2018. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003433>.
- CHOUHDURY, P.K.; SIROHI, S.K.; PUNIYA, A. K. *Harnessing the diversity of rumen microbes using molecular approaches*. In: Sirohi SK, Walli TK, Singh B, Singh N (eds) *Livestock Green House Gases: emission and options for mitigation*. Satish Serial Publishing House. Delhi, Section-B, Chapter-6, pp. 65–82, 2012.
- COLIN, G. *Traité de Physiologie Comparée des Animaux; Considérée dans ses Rapports Avec les Sciences Naturelles, la Médecine, la Zootechnie, et L'économie Rurale*. Paris: **Baillière**, 1854.
- CORLISS, J.O. A salute to fifty-four great microscopists of the past: a pictorial footnote to the history of protozoology. Part II. **Transactions of the American Microscopical Society**, 98 (1), 26–58, 1979. <https://doi.org/10.2307/3225939>
- COSTA, S. F.; DIAS, R. J. P.; ROSSI, M. F. Macroevolutionary analyses of ciliates associated with hosts support high diversification rates. **International Journal for Parasitology**, 0020–7519, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.03.006>

CUNHA, A.M. Sobre os ciliados intestinais dos mamíferos. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 6, 212–216, 1914. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761914000300008>.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModel-test 2: more models, new heuristic and parallel computing. **Natural Methods**, 9:772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

DENMAN, S.E.; MARTINEZ, F.G.; SHINKAI, T.; MITSUMORI, M.; MCSWEENEY, C.S. Metagenomic analysis of the rumen microbial community following inhibition of methane formation by a halogenated methane analog. **Frontiers in Microbiology**, 6, 1087, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01087>.

DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of Alaskan moose (*Alces americana*), musk-ox (*Ovibos moschatus*) and Dall mountain sheep (*Ovis dalli*). **Journal of Protozoology**, 21 (1), 26–32, 1974. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1974.tb03612.x>.

DEHORITY, B. A. Rumen Ophryoscolecoid Protozoa in the Hindgut of the Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) 1. **The Journal of Protozoology**, 34(2), 143–145, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03150.x>

DEHORITY, B.A. Rumen Ciliates of the Pronghorn Antelope (*Antilocapra americana*), Mule Deer (*Odocoileus hemionus*), White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) and Elk (*Cervus canadensis*) in the Northwestern United States. **Archiv Protistenk**, 146(1), 29–36, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(11\)80252-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80252-6)

DEHORITY, B. A. Rumen ciliate protozoa in Australian red deer (*Cervus elaphus* L.). **Archiv für Protistenkunde**, 148(1-2), 157–165, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(97\)80041-3](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(97)80041-3)

DEHORITY, B. A.; DEMARAIS, S.; OSBORN, D. A. Rumen Ciliates of White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*), Axis Deer (*Axis axis*), Sika Deer (*Cervus nippon*) and Fallow Deer (*Dama dama*) from Texas. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 46(2), 125–131, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04595.x>

DEHORITY, B.A.; ODENYA, A.A. Influence of Diet on the Rumen Protozoal Fauna of Indigenous African Wild Ruminants. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 50(3), 220–223, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00121.x>

DEL VALLE, I.; DE LA FUENTE, G.; FONDEVILA, M. Ciliate protozoa of the forestomach of llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*) from the Bolivian Altiplano. **Zootaxa**, 1703(1), 62–68, 2008. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1703.1.4>.

DE LA FUENTE, G.; SKIRNISSON, K.; DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of Icelandic cattle, sheep, goats and reindeer. **Zootaxa**, 1377, 47–60, 2006.

DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; ABECIA, L.; DEHORITY, B.A.; FONDEVILA, M. Rumen protozoal diversity in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) as compared with domestic goats (*Capra hircus*). **European Journal of Protistology**, 45(2), 112–120, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2008.07.001>.

D'AGOSTO, M.; SANTA-ROSA, M.R. Influência do hospedeiro no perfil populacional e nas populações de ciliados do rúmen de bovinos. **Revista Brasileira de Zoologia**, 15(2), 389–396, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751998000200012>.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16 (3), 725–729, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000300011>.

DO, H.T.; DAO, T. K.; NGUYEN, K. H. V.; LE, N. G.; NGUYEN, T. M. P.; LE, T. L.; PHUNG, T. N.; STRAALLEN, N. M. V.; ROELOFS, D.; TRUONG, N. T. Metagenomic analysis of bacterial community structure and diversity of lignocellulolytic bacteria in Vietnamese native goat rumen. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 31(5), 738–747, 2017. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0174>.

DOGIEL, V.; WINOGRADOWA-FEDOROWA, T. Experimentelle Untersuchungen zur Biologie der Infusorien des Wiederkäuermagens. **Wiss Archives Landwirtsch, Abt, B, 3**, 172–188, 1930.

DOGIEL, V. La faune d'infusoires habitant l'estomac du buffle et du dromadaire. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, 6(3), 323–338, 1928.

EBERLEIN, R. Ober die im Wiederkäuermagen vorkommenden ciliaten Infusorien. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie**, 59, 233–304, 1895.

EBRAHIMI, S.H.; VALIZADEH, R.; MIRI, V.H. Rumen Microbial Community of Saanen Goats Adapted to a High-Fiber Diet in the Northeast of Iran. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, 8(2), 271–279, 2018.

FERNANDEZ-GALIANO, D. Silver Impregnation of Ciliated Protozoa: Procedure Yielding Good Results with the Pyridinated Silver Carbonate Method. **American Microscopical Society**, 95(4), 557–560, 1976. <https://doi.org/10.2307/3225377>.

FERNANDEZ-GALIANO, D.; CAMPOS, M. I. *Ophryoscolex monoacanthus* n. sp., an Entodiniomorphid Ciliate in the Rumen of the Chamois *Rupicapra rupicapra*. **American Microscopical Society**, 111(1), 44–49, 1992. <https://doi.org/10.2307/3226725>.

FERNÁNDEZ, M.H.; VRBA, E.S. A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. **Biological Reviews**, 80(2), 269–302, 2005. <https://doi.org/10.1017/s1464793104006670>.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. Comparison of protozoal populations and digestion rates between water buffalo and cattle fed an all forage diet. **Journal of Applied Animal Research**, 16 (1), 33–46, 1999. <https://doi.org/10.1080/09712119.1999.9706260>.

FRANZOLIN, R.; WRIGHT, A.D.G. Microorganisms in the rumen and reticulum of buffalo (*Bubalus bubalis*) fed two different feeding systems. **BMC Research Notes**, 9(1), 1–5, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2046-y>.

FRANCISCO, A. E.; SANTOS-SILVA, J. M. V.; PORTUGAL, A. P.; ALVES, S. P. B.; BESSA, R. J. Relationship between rumen ciliate protozoa and biohydrogenation fatty acid profile in rumen and meat of lambs. **PLOS ONE**, 14 (9), e0221996, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221996>.

GENTRY, A.W. The Miocene differentiation of old world Pecora (Mammalia). **Historical Biology**, 7(2), 115–158, 1994. <https://doi.org/10.1080/10292389409380449>

GÖÇMEN, B.; DEHORITY, B. A.; RASTGELDI, S. The Occurrence of the Rumen Ciliate *Metadinium banksi* Dehority, 1985. (Ophryoscolecidae, Entodiniomorphida) from Domestic Goats (*Capra hircus* L.) in South eastern Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 26, 367–370, 2002.

GÖÇMEN, B.; ATATUR, M.K. Some Rumen Ciliates (Isotrichidae, Trichostomatida; Epidininae, Ophryoscolecidae) of the Domestic Goat (*Capra hircus* L.) from Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 26, 15–26, 2002.

GÖÇMEN, B.; RASTGELDI, S. A New Rumen Ciliate from the Turkish Domestic Goat (*Capra hircus* L.): *Entodinium salmani* n.sp. (Entodiniidae, Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, 28, 295–299, 2004.

GÖÇMEN, B.; KARAOĞLU, A. Entodiniid Ciliates (Entodiniidae, Entodiniomorphida) Living In The Rumen Of Domesticated Goats (*Capra hircus* L.) in Southeastern Turkey, **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 29 (3), 211–218, 2005.

GÖÇMEN, B.; RASTGELDI, S.; KARAGLU, S.; A'KAN, H. K. N. Rumen ciliated protozoa of the turkish domestic goats (*Capra hircus* L.). **Zootaxa**, 1091(1), 53–64, 2005. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1091.1.4>.

GÖÇMEN, B.; SEZGIN, Y. Rumen Ciliate, *Ophryoscolex purkynjei* Stein, 1858 (Sensu Göçmen, 1999) of the Domestic Goats (*Capra hircus*) in Northern Cyprus. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 30 (3), 246–251, 2006.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. Sea View version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, 27(2), 221–224, 2009. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>.

GRAUR, D.; MARTIN, W. Reading the entrails of chickens: molecular timescales of evolution and the illusion of precision. **TRENDS in Genetics**, 20(2), 80–86, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.12.003>

GRUBY, D.; DELAFOND, O. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans l'intestin, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. **CR Academic Science**, 17, 1304–1308, 1843.

GÜRELLI, G. Rumen ciliate fauna (Ciliophora, Protista) of Turkish domestic goats living in İzmir, Turkey. **Turkish journal of zoology**, 38, 136–143, 2014. <https://doi.org/10.3906/zoo-1303-21>.

GÜRELLI, G.; CANBULAT, S.; ALDAYAROV, N.; DEHORITY, B. A. Rumen ciliate protozoa of domestic sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra aegagrus hircus*) in Kyrgyzstan. **FEMS Microbiology Letters**, 363, 6, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw028>.

GÜRELLI, G.; AKMAN, F. T. B. Rumen ciliate biota of domestic cattle (*Bos taurus taurus*) in Stambul, Turkey and infraciliature of *Metadinium medium* (Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae). **Acta Protozool**, 53, 173–182, 2016. <https://doi.org/doi:10.5152/tpd.2012.55>.

GÜRELLI, G. Rumen ciliates of domestic cattle (*Bos taurus taurus*) in Kastamonu, Turkey, with the description of a new species. **European Journal Protistology**, 56, 51–59, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.07.002>.

GÜRELLI, G. Rumen ciliate fauna of domestic sheep (*Ovis aries*) in İzmir, Turkey and scanning electron microscopic observations. **Zootaxa**, 4286(4), 545–554, 2017. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4286.4.6>

GÜRELLI, G. Infraciliature of *Eudiplodinium dilobum*, *E. rostratum*, and *E. maggii* (Ciliophora, Entodiniomorphida). **Communication Journal of Biology**, 2(2), 16–18, 2018. <https://doi.org/10.31594/commagene.477309>.

GÜRELLI, G. New entodiniomorphid ciliates, *Buetschlia minuta* n. sp., *B. cirrata* n. sp., *Charonina elephantii* n. sp., from Asian elephants of Turkey. **Zootaxa**, 4545, 419–433, 2019. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4545.3.6>

GÜRELLI, G.; DAW, A. F. O. E. Endosymbiotic Ciliated Protozoan Biota of Dromedary Camels and Domestic Cattle in Tunisia. **Zootaxa**, 4859(3), 409–418, 2020. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4859.3.6>.

GURUNG, H.B.; PARAJULI, N.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S.; KOBAYASHI, Y. Rumen ciliate faunae of water Buffalo (*Bubalus bubalis*) and Goat (*Capra hircus*) in Nepal. **Journal of Veterinary Medical Science**, 64(3), 265–267, 2002. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.265>.

GUO, C.; SUN, D.; WANG, X.; MAO, S. A Combined Metabolomic and Proteomic Study Revealed the Difference in Metabolite and Protein Expression Profiles in Ruminal Tissue From Goats Fed Hay or High-Grain Diets. **Frontiers in Physiology**, 10, 66, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00066>.

HASSANIN, A.; DOUZERY, E. J. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular phylogenetics and evolution**, 13(2), 227–243, 1999. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0619>

HENDERSON, G.; COX, F.S.; JONKER, A.; YOUNG, W.; JANSSEN, P.H.; ZUNINO, P. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, 5, 14567, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep14567>.

HUANG, L.; NIE, W.; WANG, J.; SU, W.; YANG, F. Phylogenomic study of the subfamily Caprinae by cross-species chromosome painting with Chinese muntjac paints. **Chromosome Research**, 13(4), 389–399, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-0977-6>

IMAI, S.; KATSUNO, M.; OGIMOTO, M. Distribution of Rumen Ciliate Protozoa in Cattle, Sheep and Goat and Experimental Transfaunation of Them. **Japan Journal of Zootech Science**, 49(7), 494–505, 1978. <https://doi.org/10.2508/chikusan.49.494>.

IMAI, S.; OKU, Y.; MORITA, T.; IKE, K. Rumen ciliate protozoal fauna of reindeer in Inner Mongolia, China. **Journal of Veterinary Science**, 66(2), 209–212, 2004. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.209>.

ITO, A.; IMAI, S.; MANDA, M.; OGIMOTO, K. Rumen ciliates of Tokara Native Goat in Kagoshima, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, 57(2), 355–357, 1995. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.355>.

ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary bands in the rumen ophryoscolecid ciliate *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), observed by light microscopy. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 45(6), 628–636, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb04559.x>.

ITO, A.; IMAI, S. Ciliates from the cecum of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Bolivia. The families Hydrochoerellidae n. fam., Protohallidae, and Pycnotrichidae. **European Journal Protistology**, 36, 53–84, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0932-4739\(00\)80023-1](https://doi.org/10.1016/s0932-4739(00)80023-1)

ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary band pattern of rumen ophryoscolecid ciliates. **Endocytobiosis Cell Research**, 17, 103–110, 2006.

ITO, A.; HONMA, H.; GÜRELLI, G.; GÖCMEN, B.; MISHIMA, T.; NAKAI, Y.; IMAI, S. Redescription of phylogenetic position based on the infraciliary bands and 18SSU rRNA gene sequence. **European Journal of Protistology**, 46(3), 180–188, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2010.01.005>.

ITO, A.; ECKARDT, W.; STOINSKI, T. S.; GILLESPIE, T. R.; TOKIWA, T. Gorilloflasca africana n. g., n. sp., (Entodiniomorpha) from wild habituated Virunga mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Rwanda. **European Journal Protistology**, 60, 68–75, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.06.002>

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings of Bioinformatics**, 20(4), 1160–1166, 2019. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.

KOCABATMAZ, M.; EKSEN, M.; DURGUN, Z. The effect of phosphorus on rumen and blood metabolites of Angora Goats. **S. Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 8(1), 9–13, 1992.

KOFOID, C. A. Two remarkable ciliate protozoa from the caecum of the Indian elephant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 21, 501–506, 1935. <https://doi.org/10.1073/pnas.21.7.501>

KITTELMANN, S.; JANSSEN, P. H. Characterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer, and cattle, feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. **FEMS Microbiology Ecology**, 75(3), 468–481, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01022.x>

KIMURA, Y.; TSUJINO, R.; TORII, H. Ciliate protozoa from the rumens of Japanese serows (*Capricornis crispus*) captured in the northern part of Shizuoka Prefecture, Japan. **Mammal study**, 42(1), 65–69, 2017. <https://doi.org/10.3106/041.042.0101>

KLEYNHANS, C. J.; HOVEN, W. V. Rumen protozoa of the giraffe with a description of two new species. **African Journal of Ecology**, 14(3), 203–214, 1976. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.1976.tb00164.x>

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary 665 genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology Evolution**, 35(6), 1547–1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

LALUEZA-FOX, C.; CASTRESANA, J.; SAMPIETRO, L.; MARQUÈS-BONET, T.; ALCOVER, J. A.; BERTRANPETIT, J. Molecular dating of caprines using ancient DNA sequences of *Myotragus balearicus*, an extinct endemic Balearic mammal. **BMC Evolutionary Biology**, 5(1), 1–11, 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-70>

LANGDA, S.; ZHANG, C.; ZHANG, K.; GUI, B.; JI, D.; DEJI, C.; CUOJI, A.; WANG, X.; WU, Y. Diversity and Composition of Rumen Bacteria, Fungi, and Protozoa in Goats and Sheep Living in the Same High-Altitude Pasture. **Animals**, 10 (2), 186, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10020186>.

LEE, H. I. Studies on Microorganisms in Rumen of Ruminants-2. Basic Studies on Ciliate Protozoa in Rumen of Korean Native Goats. **Journal of the Korean Veterinary Medical Association**, 15(8), 459–461, 1979.

LEVINE, N. D. Veterinary protozoology. Ames: Iowa State University Press, 334–364pp, 1985.

LEVINE, N.D. Protozoan parasites of domestic animals and of man. **Burgess Publishing Company**, Minneapolis, 412 pp, 1961. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7000>.

LEI, Z.; ZHANG, K.; LI, C.; JIAO, T.; WU, J.; WEI, Y.; TIAN, K.; LI, C.; TANG, D.; DAVIS, D.I.; CASPER, D.P.; JIANG, H.; WANG, X.; WANG, J. Ruminal metagenomic analyses of goat data reveals potential functional microbiota by supplementation with essential oil-cobalt complexes. **BMC Microbiology**, 19, 30, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1400-3>.

LIU, Q.; YAO, S.; CHEN, Y.; GAO, S.; YANG, Y.; DENG, J.; REN, Z.; SHEN, L.; CUI, H.; HU, Y.; MA, X.; YU, S. Use of antimicrobial peptides as a feed additive for juvenile goats. **Scientific Reports**, 7, 12254, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12394-4>.

LOZANO, M.G.; GARCIA, Y.P.; ARELLANO, K.A.; ORTIZ, C.L.; BALAGURUSAMY, N. Livestock methane emission: microbial ecology and mitigation strategies. **Livestock Science**, Intech Open, pp. 55–69pp, 2017.

LYNN, D.H. The ciliated protozoa. Characterization. classification. and guide to the literature. **Springer**, Dordrecht, 605pp, 2008.

LUBINSKY, G. On some parasites of parasitic protozoa I, *Sphaerita hoari* sp. n-achitrip Parasitizing *Eremoplastron bovis*. **Canadian Journal of Zoology**, 1(6), 440–450, 1955. <https://doi.org/10.1139/m55-055>.

LUBINSKY, G. Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha)I. A new species of *Entodinium* with "caudatum," "lobosopinosum," and "dubardi" forms, and some evolutionary trends in the genus *Entodinium*. **Canadian Journal of Zoology**, 35(1), 111–133, 1957. <https://doi.org/10.1139/z57-007>.

MAO, S.Y.; HUO, W. J.; ZHU, W. Y. Microbiome-metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with increasing dietary grain in a goat model. **Environmental Microbiology**, 18(2), 525–541, 2016. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12724>.

MATSUMOTO, M.; TAKENAKA, A.; KOBAYASHI, T.; ITABASHI, H. The effects of *Epidinium caudatum* or *Dasytricha ruminantium* on the rumen fermentation and nitrogen metabolism in goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 2(3), 483–484, 1989. <https://doi.org/10.5713/ajas.1989.483>.

MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. Predação e canibalismo entre protozoários ciliados (Ciliophora: Entodiniomorphida: Ophryoscolecidae) no rúmen de ovinos (*Ovis aries*). **Revista Brasileira de Zoologia**, 25(3), 451–455, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752008000300010>

MERMER, A.; RASTEGELDI, S.; ERGEN, G.; GOÇMEN, B. Occurrence of the Rumen Ciliate, *Elytroplastron bubali* (Dogiel,1928) in Turkish Domestic Goats (*Capra hircus*).**Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 27 (4), 270–272, 2003.

MERMER, A.; GÖÇMEN, B.; ÇİÇEK, K.; ERGEN, G.; SEZGIN, Y.; YILDIZ, M.Z. Morphometric Variations of the Rumen Ciliate, *Ophryoscolex purkynjei* Stein, 1858 (Ciliophora:

Entodiniomorphida) from Cypriot Domestic Goats. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 30 (3), 252–257, 2006.

METZLER-ZEBELI, B. U.; SCHMITZ-ESSER, S.; KLEVENHUSEN, F.; PODSTATZKY-LICHTENSTEIN, L.; WAGNER, M.; ZEBELI, Q. Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. **Anaerobe**, 20, 65–73, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.005>.

MOHAMED, A. R. A. Libya'da bulunan keçilerin (*Capra aegagrus hircus Linnaeus, 1758*) işkembe siliyat (protista: ciliophora) faunası. **Thesis**, Kastamonu University Institute of Science. 36pp, 2017.

MOON-VAN DER STAAY, S. Y.; VAN DER STAAY, G. W.; MICHALOWSKI, T.; JOUANY, J. P.; PRISTAS, P.; JAVORSKÝ, P.; KIŠIDAYOVÁ, S.; VARADYOVA, Z.; MCEWAN, R. N.; NEWBOLD, J.; ALEN, T.; GRAAF, R.; SCHMID, M.; HUYNEN, A. M.; HACKSTEIN, P. H. J.; HACKSTEIN, J. H. The symbiotic intestinal ciliates and the evolution of their hosts. **European Journal of Protistology**, 50(2), 166–173, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2014.01.004>

MISHIMA, T.; KATAMOTO, H.; HORI, Y.; KAKENGI, V. A. M.; ITO, A. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle *Bos taurus indicus* and the infraciliature of *Entodinium palmare* n. sp. and *Enoploplastron stokyi* (Buisson, 1924). **European Journal of Protistology**, 45(2), 77–86, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2008.07.002>.

NETO, E. G. M.; AFONSO, J. A. B.; MENDONÇA, C. L.; ALMEIDA, M. Z. P. R. B. Estudo clínico e características do suco ruminal de caprinos com acidose láctica induzida experimentalmente. **Pesquisa Veterinária**, 25 (2), 73–78, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2005000200002>.

NEWBOLD, C. J.; DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; RAMOS-MORALES, E.; MCEWAN, N. R. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. **Frontiers in Microbiology**, 6, 1312, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>.

OBANDA, V.; GAKUYA, F.; LEKOLOOL, I.; CHEGE, S.; OKITA, B.; MANYIBE, T. Ciliated intestinal protozoa of black (*Diceros bicornis michaeli*) and white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*) in Kenya. **African Journal of Ecology**, 46(2), 144–148, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.2007.00822.x>

OLIVEIRA, M. E. M.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; LUCCI, C. S. Observações sobre o comportamento de populações de protozoários ciliados do rúmen de caprinos (*Capra hircus* L.), criados em Itapetininga, São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 26(1), 15–20, 1989. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v26i1p15-20>.

OGIMOTO, K.; IMAI, S. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies. 231pp, 1981.

PARREIRA, J. R.; HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E.; ARGÜELLO, A.; CAPOTE, J.; CASTRO, N.; DE SOUSA ARAÚJO, S.; DE ALMEIDA, A. M. Understanding seasonal weight loss tolerance in dairy goats: a transcriptomics approach. **BMC genomics**, 21(1), 1–17, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06968-2>.

RASTGELDI, S.; GÖÇMEN, B. Türkiye Evcil Keçilerinde (*Capra hircus* L.) İşkembe Siliyatları, *Diplodinium crista-galli* ve *Diplodinium flabellum* (Entodiniomorphida) Bulunuşu. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 27 (4), 287–293, 2003.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, 61 (3), 539–542, 2012. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.

ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Molecular phylogeny of caprines (Bovidae, Antilopinae): the question of their origin and diversification during the Miocene. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, 43(1), 49–60, 2005a. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2004>.

ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36(1), 154–168, 2005b <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.01.002>

ROSSI, M.F.; DIAS, R.J.P.; SENRA, M.V.X.; MARTINELE, I.; CARLOS A. G. SOARES, C.A.G.; D'AGOSTO, M. Molecular Phylogeny of the Family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Litostomatea) Inferred from 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 62, 584–590, 2015. doi:10.1111/jeu.12211

ROSSI, M. F.; MELLO, B.; SCHRAGO, C. G. Performance of hidden markov models in recovering the standard classification of glycoside hydrolases. **Evolutionary Bioinformatics**, 13, 1–5, 2017. <https://doi.org/10.1177/1176934317703401>

RUFINO, L.M.A.; BARRETO, S.M.P.; DUARTE, E.R.; GERASEEV, L.C.; SANTOS, A.C.R.; JARUCHE, Y.G. Efeitos da inclusão de torta de macaúba sobre a população de protozoários ruminais de caprinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40 (4), 899–903, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000400026>.

SANTRA, A.; KARIM, S. A.; MISHRA, A. S.; CHATURVEDI, O.H.; PRASAD, R. Rumen ciliate protozoa and fibre utilization in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, 30(1), 13–18, 1998. [https://doi.org/10.1016/S09214488\(98\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S09214488(98)00078-9).

SCHOVANCOVÁ, K.; POMAJBÍKOVÁ, K.; PROCHÁZKA, P.; MODRÝ, D.; BOLECHOVÁ, P.; PETRŽELKOVÁ, K. J. Preliminary insights into the impact of dietary starch on the ciliate, *Neobalantidium coli*, in captive chimpanzees. **PLOS ONE**, 8(11), e81374, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081374>

SELIM, H.M.; IMAI, S.; YAMATO, O.; EL KABBANY, A.; KIROLOSS, E.; MAEDA, Y. Comparative study of rumen ciliates in buffalo, cattle and sheep in Egypt. **Journal of Veterinary Medical Science**, 58(8), 799–801, 1996. <https://doi.org/10.1292/jvms.58.799>.

SELIM, H. M.; IMAI, S.; EL SHEIK, A.; OKAMOTO, E.; MIYAGAWA, E.; MAEDE, Y. Rumen ciliate protozoal fauna of native sheep, Friesian cattle and dromedary camel in Libya. **Journal of Veterinary Medical Science**, 61(3), 303–305, 1999. <https://doi.org/10.1292/jvms.61.303>

SHI, P.J.; MENG, K.; ZHOU, Z.G.; WANG, Y.R.; DIAO, Q.Y.; YAO, B. The host species affects the microbial community in the goat rumen. **Letters in Applied Microbiology**, 46, 132–135, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02274.x>.

SHEN, J.; ZHENG, L.; CHEN, X.; HAN, X.; CAO, Y.; YAO, J. Metagenomic Analyses of Microbial and Carbohydrate-Active Enzymes in the Rumen of Dairy Goats Fed Different Rumen Degradable Starch. **Frontiers in Microbiology**, 11,1003, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01003>.

SCHENK, J. J. Consequences of secondary calibrations on divergence time estimates. **PLOS ONE**, 11(1), e0148228, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148228>

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of Large phylogenies. **Bioinformatics**, 30(9), 1312–1313, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.

STEIN, F. Über mehrere neue im pansen der wiederkäuer lebende infusionstiere. **Abhandlungen der k.Böhmischen Gesellschaft der Wissenschaften** .10, 69–70, 1858.

SPRINGER, M. S.; MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E.; O'BRIEN, S. J. Placental mammal diversification and the Cretaceous–Tertiary boundary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100(3), 1056–1061, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0334222100>

SU, N. R.; XIANG HUA, Z. H. A. I.; ZHU, S.; IMAI, S. Rumen ciliated protozoan fauna of the yak (*Bos grunniens*) in China with the description of *Entodinium monuo* n. sp. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 47(2), 178–182, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00029.x>

TALARI, S. A.; ARBABI, M.; TALARI, M.R. Ciliates of the Rumen of Domestic Ruminants in Kashan. **Archives of Razi Institute**, 57, 121–126, 2004.

TAMURA, K.; BATTISTUZZI, F. U.; BILLING-ROSS, P.; MURILLO, O.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(47), 19333–19338, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213199109>

TOWNE, G. E. N. E.; NAGARAJA, T. G.; KEMP, K. K. Ruminant ciliated protozoa in bison. **Applied and environmental microbiology**, 54(11), 2733–2736, 1988. <https://doi.org/10.1128/AEM.54.11.2733-2736>.

USHIDA, K. Symbiotic Methanogens and Rumen Ciliates. In: Hackstein J. (eds) (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea. **Microbiology Monographs**, Springer, Cham, 19, 25–35, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98836-8_3.

VAN HOVEN, W.; ATWELL, V. H.; GROBLER, J. H. Rumen ciliate protozoa of the sable antelope *Hippotragus niger*. **African Zoology**, 14(1), 37–42, 1979. <https://doi.org/10.1080/02541858.1979.11447645>.

VALLO, P.; PETRŽELKOVÁ, K. J.; PROFOUSOVÁ, I.; PETRÁŠOVÁ, J.; POMAJBÍKOVÁ, K.; LEENDERTZ, F.; HASHIMOTO, C.; SIMMONS, N.; MACHANDA, Z.; PIEL, A.; ROBBINS, M. M.; BOESCH, C.; SANZ, C.; MORGAN, D.; SOMMER, V.; FURUICHI, T.; FUJITA, S.; MATSUZAWA, T.; KAUR, T.; HUFFMAN, A. M.; MODRÝ, D. Molecular diversity of entodiniomorphid ciliate *Troglodytella abgrassarti* and its coevolution with chimpanzees. **American journal of physical anthropology**, 148(4), 525–533, 2012. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22067>.

VASILY, D. B.; MITCHELL, J. B. The Identification of Rumen Ciliates from Eastern *Bos taurus*. **Transactions of the American Microscopical Society**, 93(2), 248–253, 1974. <https://doi.org/10.2307/3225294>.

VRBA, E. S. African Bovidae: evolutionary events since the Miocene. **South African Journal of Science**, 81(5), 263–266, 1985.

VĎAČNÝ, P. Estimation of divergence times in litostomatean ciliates (Ciliophora: Intramacronucleata), using Bayesian relaxed clock and 18S rRNA gene. **European journal of protistology**, 51(4), 321–334, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2015.06.008>

VĎAČNÝ, P. Evolutionary Associations of Endosymbiotic Ciliates Shed Light on the Timing of the Marsupial–Placental Split. **Molecular Biology and Evolution**, 35(7), 1757–1769, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy071>.

WANG, Y.; TANG, P.; XIAO, Y.; LIU, J.; CHEN, Y.; YANG, Y. Alterations in Rumen Bacterial Community and Metabolome Characteristics of Cashmere Goats in Response to Dietary Nutrient Density. **Animals**, 10, 1193, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10071193>.

WERTHEIM, P. P. Les infusoires de l'estomac de *Rupicapra rupicapra* L. **Annales de Parasitologie**, 12 (5), 390–393, 1934. <https://doi.org/10.1051/parasite/1934125390>.

WEBB, S. D.; TAYLOR, B. E. (1980) The phylogeny of hornless ruminants and a description of the cranium of *Archaeomeryx*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 167, 117–158, 1980.

WILKINSON, R.C.; VAN HOVEN, W. Rumen ciliate fauna of the springbok (*Antidorcas marsupialis*) in southern Africa. **African Zoology**, 11(1), 1–22, 1976.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. *The Rumen Protozoa*. Springer, New York. 442pp, 1992. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2>.

WLODARSKI, L.; MAEDA, E.M.; FLUCK, A.C.; GILIOLI, D. Microbiota ruminal: diversidade, importância e caracterização. **Revista Eletrônica de Veterinária**, 18(11),1–20, 2017.

WRIGHT, A.D.G.; LYNN, D.H. Monophyly of the trichostome ciliates (Phylum Ciliophora: Class Litostomatea) tested using new 18S rRNA sequences from the Vestibuliferids, *Isotricha intestinalis* and *Dasytricha ruminantium*, and the Haptorian, *Didinium nasutum*. **European Journal of Protistology**, 33(3), 305–315, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(97\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(97)80008-9).

WRIGHT, A. D. G.; ATHOL, V.; KLIEVE, A.V. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? **Animal Feed Science and Technology**, 166, 248–253, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.015>.

WRIGHT, A.D.J. Rumen Protozoa. In A. K. Puniya, R. Singh, & D. N. Kamra, eds. *Rumen Microbiology, From Evolution to Revolution*. Springer, pp. 113–120, 2015

ZHANG, R.Y.; LIU, Y.J.; YIN,Y.Y.; JIN, W.; MAO, S.Y.; LIU, J.H. Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets. **Animal**, 13(9), 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1017/S1751731118003671>.

ZHANG, K.; HE, C.; XU, Y.; ZHANG, C.; LI, C.; JING, X.; WANG, M.; YANG, Y.; SUO, L.; KALDS, P.; SONG, J.;WANG, X.; BRUGGER, D.; WU, Y.; CHEN, Y. Taxonomic and functional adaptation of the gastrointestinal microbiome of goats kept at high altitude (4800 m) under intensive or extensive rearing conditions. **FEMS Microbiology Ecology** ,97,3, fiab009, 2021. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab009>.

ZEINELDIN, M.; BARAKAT, R.; ELOLIMY, A.; SALEM, A. Z. M.; ELGHANDOUR, M. M. Y.; MONROY, J. C. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. **Microbial Pathogenesis**, 124, 106–115, 2018. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.0>.

4 CAPÍTULO 2

CILIADOS EM RUMINANTES DOMÉSTICOS NA ÁFRICA E PRIMEIRA CARACTERIZAÇÃO DE CILIADOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) NO RÚMEN DE CAPRINOS DOMÉSTICOS DA RAÇA LANDIM (*CAPRA HIRCUS* L) EM MOÇAMBIQUE

4.1 RESUMO

O rúmen é um ecossistema extremamente diverso e densamente colonizado por bactérias, arqueias metanogênicas, fungos e protistas. Neste trabalho, a composição genérica e específica de protozoários ciliados do conteúdo ruminal de 28 caprinos domésticos da raça Landim (*Capra hircus* L) de Moçambique foi estudada representando o primeiro registro do país. Além disso, foi realizada uma compilação de registros de protozoários ciliados de ruminantes domésticos reportados em seis países africanos. A caracterização morfológica dos ciliados, bem como a densidade genérica e abundância específica foram estimadas utilizando-se técnicas e preparação semipermanente. Quarenta e sete espécies pertencentes a dez gêneros foram registradas no conteúdo ruminal de caprinos de Moçambique. O número médio de ciliados desse registro foi de $49.39 (\pm 134.7) \times 10^4/\text{ml}$ de conteúdo ruminal. *Entodinium caudatum* foi a espécie mais abundante, com 100% de prevalência. Uma revisão da literatura disponível em bases de dados foi realizada para compilação de gêneros e espécies de ciliados de caprinos, ovinos e bovinos, evidenciando que cento e doze espécies e morfotipos pertencentes a treze gêneros já foram registrados em seis países do continente africano nomeadamente, Egito, Líbia, Tunísia, África do Sul, Quênia e Tanzânia. Evidenciamos que Tanzânia apresentou o maior registro, recuperando quarenta e nove espécies de ciliados descritos. Este trabalho é o primeiro esforço no relato de presença e caracterização morfológica, bem como estimativa da composição de protozoários ciliados no rúmen de caprinos de Moçambique, bem como primeiro compilado desses ciliados em ruminantes domésticos na África.

Palavras-chave: Caprinae. Morfologia. Impregnação pela prata. Ophryoscolecidae. Taxonomia.

4.2 INTRODUÇÃO

Os protozoários ciliados do rúmen são o principal componente eucariótico do ecossistema ruminal e podem contribuir com até 60% da biomassa no rúmen e com um terço do material digerido (ROSSI, 2017; NEWBOLD; RAMOS-MORALES, 2020). Esses ciliados simbióticos pertencem à subclasse Trichostomatia e podem utilizar uma vasta gama de compostos de carboidratos, como açúcar solúvel, amido e lignocelulose (MIZRAHI, 2013; GÜRELLI; MOHAMED, 2021).

No caso dos protozoários ciliados, o processo de instalação no trato digestivo de caprinos e outros mamíferos herbívoros, já foi reportado pelos seguintes autores (BRYANT; SMALL, 1956; CONRAD et al., 1958; EADIE et al., 1959; EADIE, 1962; HUNGATE, 1966; CHURCH, 1974; NOGUEIRA FILHO et al., 1983; MEALE et al., 2017; YEOMAN et al., 2018; CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2019). Vários fatores são necessários para instalação e desenvolvimento desses ciliados, destes, destacam-se fatores genéticos, filogenéticos, distribuição geográfica, dieta consumida e as condições fisiológicas dos hospedeiros (OGIMOTO; IMAI, 1981; LANGDA et al., 2020). As diferentes estratégias alimentares adotadas e distribuídas em linhagens de ruminantes são apontadas, igualmente, como comportamentos que contribuem e aumentam a chance para a instalação, composição e estrutura da comunidade de protozoários ciliados nos diferentes compartimentos do trato digestivo dos animais com ruminância (LANGDA et al., 2020).

Embora seja reconhecida a existência da instabilidade na composição de trichostomatídeos do rúmen, alguns autores (DEHORITY; ORPIN, 1997), reportaram que, o número de espécies de ciliados gastrointestinais em um hospedeiro doméstico específico é geralmente limitado em trinta e cinco espécies ou um pouco abaixo desse número. Nesse sentido, os protozoários ciliados de ambientes gastrointestinais de ruminantes domésticos são considerados de forma geral similares em termos de composição, apesar de ocorrer algumas variações caracterizadas pela localização geográfica dos seus hospedeiros (IMAI et al., 1989; GÖÇMEN et al., 2005). Diante disso, em um ecossistema ruminal os protozoários ciliados podem apresentar uma densidade de $10^5 - 10^6$ indivíduos/ml de conteúdo ruminal (HOBSON; STEWART, 1997; SYLVESTER et al., 2004; KITTELMANN et al., 2015).

Dentre os grupos de mamíferos ruminantes e pseudoruminantes que abrigam ciliados endossimbiontes do trato gástrico, os animais como llamas, guanacos, girafas, camelos são

negligenciados e dentro dos ruminantes, os caprinos são os mais negligenciados, pois as pesquisas baseadas em estudos morfológicos e taxonômicos de ciliados simbiotes de mamíferos herbívoros têm sido conduzidas, na sua maior parte, em hospedeiros como bovinos, ovinos, búfalos (CEDROLA et al., 2020; SILVA et al., 2021). Este fato, faz com que os registros da composição de protozoários ciliados nestes hospedeiros negligenciados nos estudos, não seja suficientemente conhecido.

A subfamília Caprinae (Ruminantia, Bovidae) é tradicionalmente dividida em quatro tribos: Rupicaprini que incluem os gêneros *Rupicapra*, *Oreamnos*, *Capricornis* e *Nemorhaedus*; Ovibovini composta pelos gêneros *Ovibos* e *Budorcas*; Caprini formada por cinco gêneros, *Ovis*, *Capra*, *Pseudois*, *Hemitragus* e *Ammotragus*; e Saigini que consiste em dois gêneros, *Saiga* e *Pantholops* (SIMPSON, 1945; NOWAK, 1991; LALUEZA-FOX et al., 2002). No entanto, esta classificação tem sido alvo de intensas controvérsias em estudos morfológicos e, especialmente, em análises moleculares (LALUEZA-FOX et al., 2002). Segundo os pesquisadores ROPIQUET & HASSANIN (2004) estas tribos excetuando o gênero *Saiga*, encontram-se agrupadas em uma única tribo, Caprini sensu lato (HASSANIN; DOUZERY, 1999a) que inclui os 12 gêneros nomeadamente: (1) *Ammotragus*, (2) *Budorcas*, (3) *Capra*, (4) *Hemitragus*, (5) *Naemorhedus*, (6) *Oreamnos*, (7) *Ovibos*, (8) *Ovis*, (9) *Pantholops*, (10) *Capricornis*, (11) *Pseudois* e (12) *Rupicapra*.

Os caprinos são ruminantes que fazem parte do grupo de mamíferos herbívoros que estabelecem fortes relações simbióticas com protozoários ciliados, auxiliado pela sua característica de ruminação (OGIMOTO; IMAI, 1981; GÖÇMEN et al., 2001a). Este processo de ruminação permite que os caprinos aproveitem melhor a absorção de nutrientes contidos nos vegetais. Por isso, a progressiva modificação funcional do rúmen, a partir do nascimento dos filhotes, está relacionada com transformações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas para ruminação, que mais tarde, permitirá a instalação de numerosas espécies de bactérias, protozoários ciliados e outros microrganismos que participam ativamente no processo de transformação da matéria alimentar ingerida pelos animais (NOGUEIRA FILHO et al., 1983).

Entre as raças de caprinos domésticos, a raça Landim (*Capra hircus* L) de Moçambique é considerada autóctone e presente em quase todo território do país (MACIEL, 2004; GARRINE et al., 2010). São animais que se alimentam de forragens nativas (capim e folhas de arbustos) em especial herbáceas como *Heteropogon contortus* e algumas xerófitas (*Combretum* spp,

Colophospermum mopane, *Adansonia digitata*, *Heteropogon contortus*) oriundas da biodiversidade local (MACIEL, 2004). Os adultos podem pesar aproximadamente 22Kg para fêmeas e 25Kg para machos (MCKINNON; ROCHA, 1985). Para além do peso, a raça é caracterizada por ser prolífica e bem adaptada às condições locais e em climas com alta pressão ambiental (MUIR et al., 1995). Segundo os dados estatísticos oficiais do país, em 2015, a população caprina foi estimada em três milhões e oitocentos e noventa e seis mil e trezentos indivíduos (3.896.300). Este número reflete a importância econômica que a raça possui na população residente, sobretudo, como fonte de segurança alimentar, renda e emprego rural (SAUTIER, 2017).

Embora existam registros de diversidade, morfologia, ecologia e filogenia de protozoários ciliados nas cavidades ruminais de mamíferos herbívoros em distintas regiões geográficas do mundo (ITO et al., 1995; SANTRA et al., 1998; GÖÇMEN et al., 2002; MERMER et al., 2003; GÖÇMEN; KARAOĞLU, 2005; CARVALHO et al., 2011; GÜRELLI et al., 2016; EBRAHIMI et al., 2018, CEDROLA et al., 2020), o conhecimento sobre este grupo de eucariotos e sua distribuição global é ainda bastante limitado (SILVA et al., 2022) sendo que, atualmente a subclasse Trichostomatia é conhecida por abrigar aproximadamente 1,000 espécies, 129 gêneros e 21 famílias e uma boa parte dessas espécies encontram-se distribuídas nas ordens Entodiniomorphida e Vestibuliferida (CEDROLA et al., 2020).

Em termos comparativos, o conhecimento sobre os protozoários ciliados do trato gastrointestinal de hospedeiros domésticos registrados em países da África (FANTHAM, 1920; 1921; 1926; VAN DER WATH; MYBURGH, 1941; IMAI, 1988; SELIM et al., 1996; SELIM et al., 1999; MISHIMA et al., 2009; BOOYSE; DEHORITY, 2011; BARAKA, 2012; MOHAMED, 2017; GÜRELLI; Daw, 2020) é ainda bastante limitado se comparado com os trabalhos dos autores que fizeram estudos em outras regiões do mundo como Ásia, nomeadamente, Turquia (GÖÇMEN; ATATUR, 2002; GÖÇMEN et al., 2002; RASTGELD; GÖÇMEN, 2003; MERMER et al., 2003; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004; GÖÇMEN; KARAOĞLU, 2005; GÖÇMEN et al., 2005; GÖÇMEN; SEZGIN, 2006; MERMER et al., 2006; GÜRELLI, 2014), Paquistão (LUBINSKY, 1955; LUBINSKY, 1957), Japão (IMAI et al., 1978; ITO et al., 1995), Nepal (GURUNG et al., 2002), Coréia do Sul (LEE, 1979), Irão (TALARI et al., 2004), Quirguistão (GÜRELLI et al., 2016); Brasil (DEHORITY, 1986; D'AGOSTO; GUEDES, 2000; 2001; NOGUEIRA FILHO et al., 2000; DE MATOS et al., 2008; MARTINELE et al., 2008;

2010; CEDROLA et al., 2016; 2019; 2020) e Europa com os seguintes países: Espanha (FERNANDEZ-GALIANO; CAMPOS, 1992; DE LA FUENTE et al., 2009), antiga Tchecoslováquia (CRHA et al., 1985), Islândia (DE LA FUENTE et al., 2006) e Itália (CHRISTL, 1958) (SILVA et al., 2022). Isto permite traçar a hipótese segundo a qual um número considerável dos mamíferos ruminantes domésticos e selvagens dos países do continente africano, até presente data, ainda não possuem dados suficientes sobre ocorrência e composição de protozoários ciliados nesse ecossistema (EBRAHIMI et al., 2018).

Diante destas constatações desperta a necessidade de maior ampliação de coleta e de estudos taxonômicos com hospedeiros nessas localidades. A título de exemplo, os registros disponíveis nas diversas bases de dados mostram que até então, não existem informações de registro e da composição de espécies de protozoários ciliados gastrointestinais de ruminantes domésticos ocorrendo em Moçambique. Por isso, os objetivos do presente estudo foram: determinar a composição genérica e específica de protozoários ciliados do rúmen de caprinos da raça Landim do norte de Moçambique; comparar a densidade genérica e específica com registros em outros estudos, e compilar os registros de ciliados reportados em ruminantes domésticos de países africanos.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras do conteúdo ruminal de 28 caprinos domésticos (*Capra hircus* L.), sendo 16 machos e 12 fêmeas adultos da raça Landim, foram obtidas nos matadouros da cidade de Montepuez (latitude 13° 7' 0" S e longitude 39° 0' 0" E), no norte de Moçambique, entre dezembro de 2019 e janeiro de 2020. Os animais tiveram crescimento em pastagem natural e os pesos variavam entre 19 a 32kg em machos e, entre 16 a 35kg em fêmeas. As amostras foram obtidas no período entre as 6h e às 9h da manhã depois do abate dos animais e remoção da bolsa ruminal no animal abatido (CERTIFICADO VETERINÁRIO PARA PRODUTOS BIOLÓGICOS). Em seguida, a parede do rúmen foi eviscerada longitudinalmente para que o conteúdo ruminal fosse coletado. Em cada hospedeiro, 20cm³ de amostra ruminal foi coletada e fixada em formalina 18.5% (v/v) (DEHORITY, 1984), totalizando 28 amostras. Depois do processo de coleta, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz Fora para o processamento e análise. Todos os procedimentos

foram aprovados pelo Ministério de Agricultura e Desenvolvimento Rural de Moçambique (VER ANEXO J)

4.3.2 ANÁLISE DA DENSIDADE GENÉRICA

A densidade genérica de protozoários ciliados do rúmen foi obtida utilizando uma câmara de contagem Sedgewick-Rafter (DEHORITY, 1984) com a modificação proposta pelos autores D'AGOSTO; CARNEIRO (1999). Uma subamostra de 1ml foi pipetada e adicionada três gotas de solução Lugol. Esperou-se por pelo menos 15 minutos antes da contagem e, após este tempo, foi adicionado 9 ml de glicerina 30%. Em seguida, 1ml do conteúdo corado e diluído foi aplicado em uma câmara de contagem Sedgewick-Rafter. Os protozoários presentes em 50 campos foram contados e, posteriormente, rotacionou-se a câmara em 180°, contando os presentes em outros 50 campos. O número total de ciliados por gênero foi calculado multiplicando-se os valores obtidos por 80 e por 20, o que corresponde à superfície total da câmara e à diluição (fixação mais glicerina) (DEHORITY, 1984). Os dados foram inseridos em uma planilha padrão do Excel no formato Microsoft Office 2010 para o cálculo da estatística descritiva no Software R.

4.3.3 ABUNDÂNCIA RELATIVA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

A abundância relativa das espécies foi calculada de acordo com a proposta de MISHIMA et al. (2009) com 300 indivíduos em microscopia óptica em aumento de 400X. A classificação e identificação das espécies foram realizadas com base em atlas de identificação (OGIMOTO; IMAI, 1981), artigos originais de descrições de espécies e listas taxonômicas a partir de artigos de revisão e caracterização morfológica de ciliados do rúmen (DOGIEL, 1927; KOFOID; MACLENNAN, 1930; HSIUNG, 1932; KOFOID; MACLENNAN, 1932; 1933; IMAI, 1981; IMAI, 1984; DEHORITY, 1986a, b; WILLIAMS; COLEMAN, 1992; GÖÇMEN, 1999a, b, c; GRAIN, 1994; GÖÇMEN et al., 2001a, b, c; GÖÇMEN; ATATÜR, 2002; GÖÇMEN et al., 2002; RASTGELDI; GÖÇMEN, 2003; RASTGELDI et al., 2003; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004). A terminologia sobre a posição anatômica dos ciliados seguiu o proposto por DOGIEL (1927), em que a região dorsal do ciliado se refere ao local onde se situa o macronúcleo e a região oposta é designada como ventral.

3.3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

4.3.4.1 TÉCNICA SEMIPERMANENTE COM CORANTE À BASE DE IODO

Para melhor compreender o número e a morfologia de placas esqueléticas, foi utilizada a técnica semipermanente com corante à base de iodo (D'AGOSTO; CARNEIRO, 1999; CEDROLA et al., 2015). A partir das amostras fixadas e homogeneizadas, foi colhida uma alíquota de 1ml da amostra em tubo de ensaio com capacidade de 14ml, sendo adicionadas três gotas de corante à base de iodo – Solução de Lugol. Após 15 minutos, destinados a coloração dos organismos, foram realizadas observações e fotomicrografias em microscópio Olympus BX 51 com contraste interferencial diferencial (DIC).

4.3.4.2 TÉCNICA DE IMPREGNAÇÃO PELO CARBONATO DE PRATA

Com objetivo de visualizar e compreender melhor os aparatos nucleares e o padrão de bandas infraciliares dos protozoários ciliados, foi utilizada a técnica de impregnação pelo carbonato de prata segundo FERNANDEZ-GALIANO (1976), com modificações propostas por ROSSI et al. (2016) para ciliados ruminais. Aproximadamente três gotas de cada amostra de conteúdo ruminal de caprino fixadas em formalina 18,5% v/v (DEHORITY, 1984) foram transferidas para um tubo de ensaio com capacidade de 35ml, contendo aproximadamente 4ml de água destilada. Em seguida foram adicionadas quatro gotas de piridina pura (P.A), seis gotas de proteose peptona bacteriológica 4% e aproximadamente 35 a 40 gotas de Rio-Hortega (solução de carbonato de prata) (FERNANDEZ-GALIANO, 1976). Após a adição dos reagentes, o tubo foi incubado em banho-maria, em temperatura de 40°C por 30 minutos (ROSSI et al., 2016). Posteriormente, alíquotas desse material foram analisadas entre lâmina e lamínula e fotografadas em microscópio Olympus BX 51 com contraste interferencial diferencial (DIC).

4.3.5 COMPILAÇÃO DE REGISTROS DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS REPORTADOS EM PAÍSES DA ÁFRICA

Para obtermos informações sobre registros de espécies de ciliados em ruminantes domésticos de países da África, revisamos a literatura disponível nas seguintes plataformas: Google Scholar, Google Books, PubMed, Scielo, Scopus, MGRast e Web of Science. A busca foi realizada selecionando todas as décadas de publicações disponíveis desde 1843 à 2021 (FANTHAM, 1920; 1921; 1926; VAN DER WATH; MYBURGH, 1941; IMAI, 1988; SELIM et

al., 1996; SELIM et al., 1999; MISHIMA et al., 2009; BOOYSE; DEHORITY, 2011; BARAKA, 2012; MOHAMED, 2017; GÜRELLI; DAW, 2020) nas diferentes bases de dados, bem como a combinação das seguintes palavras-chave: “Ciliates in Goats”, “Ciliates in Cattle”, “Ciliates in Sheep”, “Ciliates ruminants domestic in Africa”, “Country and Protozoa”, “Rumen protozoa in Africa” and “Studies on ciliates in Africa”. O registro foi organizado em formato de tabela, constituída por gênero, espécie, subespécie e os países de registro.

Ainda, foi gerado gráfico de barras tipo com objetivo de compreender quais e quantos gêneros foram registrados em cada país africano analisado. Para isso, os dados foram tabulados no Excel e o gráfico plotado no Software Rstudio através do pacote ggplot2.

Com objetivo de compreender a quantidade específica de protozoários ciliados de caprinos (*Capra hircus*), ovinos (*Ovis aries*) e bovinos (*Bos taurus*) registrados por gênero em países da África, foi esquematizado um diagrama circular por meio do programa online <http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/>. Os dados foram tabulados no Excel indicando os gêneros e a quantidade de espécies de cada gênero.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 ANÁLISE DA DENSIDADE GENÉRICA

Foram analisadas um total de 28 amostras de conteúdo ruminal de caprinos domésticos (*Capra hircus* L). A estimativa de densidade genérica registrou a presença de dez gêneros de protozoários ciliados endossimbiontes pertencentes a duas famílias: Isotrichidae (*Isotricha* e *Dasytricha*) e Ophryoscolecidae (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Polyplastron*, *Elytroplastron*, *Epidinium*, *Metadinium*, *Eudiplodinium* e *Ophryoscolex*). O gênero mais abundante foi *Entodinium* (porcentagem total de contagem 71,6%), com a prevalência de 100% e o gênero menos abundante foi *Eudiplodinium* (0,07%) com a prevalência de 9% (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativa da densidade genérica de protozoários ciliados/ ml de conteúdo ruminal em caprinos da raça Landim (*Capra hircus* L) (n= 28) de Moçambique. n: tamanho amostral; SD: desvio padrão.

Gêneros	Prevalência (%)	Porcentagem total de contagem(%)	Densidade média/mL	SD
<i>Isotricha</i>	86	8.3	50028.5	87005.4
<i>Dasytricha</i>	79	5.2	31600	47282.7
<i>Entodinium</i>	100	71.6	428914.3	108625.5
<i>Elytroplastron</i>	82	3.8	22914.2	28258.4
<i>Epidinium</i>	79	5.0	30514.2	39331.7

<i>Diplodinium</i>	68	4.1	24971.4	37369.7
<i>Polyplastron</i>	50	0.7	4457.1	6737.1
<i>Metadinium</i>	25	0.5	3314.2	7921.7
<i>Eudiplodinium</i>	7	0.07	114.2	419.6
<i>Ophryoscolex</i>	11	0.3	2114.2	9968.7

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.4.2 ABUNDÂNCIA RELATIVA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

O número médio (\pm SD) de ciliados do conteúdo ruminal de 28 caprinos domésticos (*Capra hircus*) foi de $49.39 (\pm 134.7) \times 10^4/\text{ml}$ (limite, $0.30 - 920 \times 10^4/\text{ml}$). Quarenta e sete espécies e duas subespécies pertencentes a dez gêneros foram identificadas. Das espécies de ciliados, *Entodinium caudatum* foi a mais abundante, com prevalência de 100%, enquanto que *Entodinium salmani*, *Entodinium ekendrae*, *Epidinium tricaudatum*, *Ophryoscolex caudatum* e *Ophryoscolex purkynjei* foram observadas apenas em um animal cada (prevalência 3.5%) (Tabela 2). Majoritariamente, os ciliados do conteúdo ruminal de caprinos de Moçambique foram constituídos principalmente por indivíduos do gênero *Entodinium* (mean, 32.8%; limite, 12% – 45%) (Tabela 2).

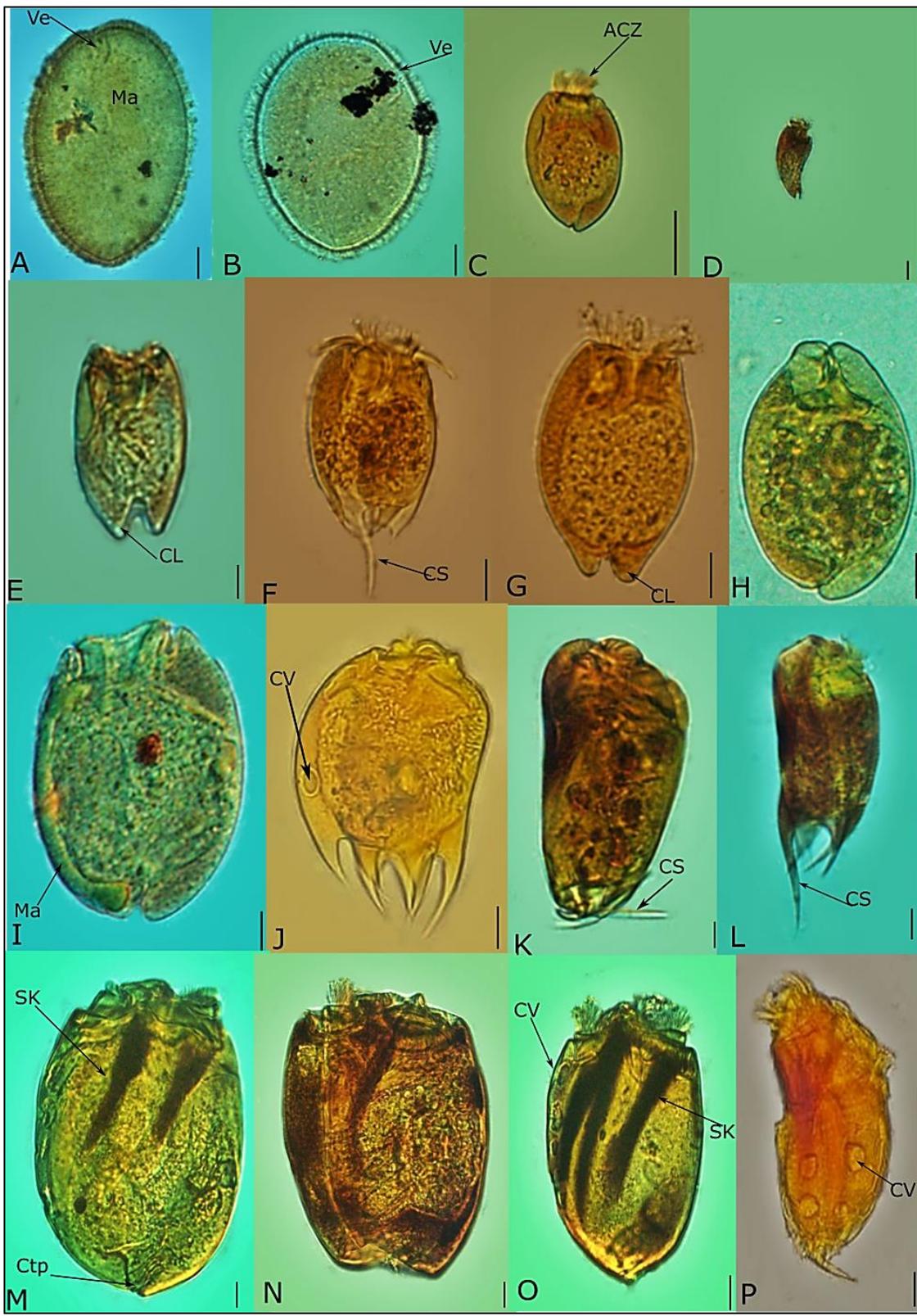
Tabela 2. Abundância relativa de ciliados do conteúdo ruminal de caprinos da raça Landim (*Capra hircus* L) (n= 28) de Moçambique. SD: desvio padrão; Min: mínimo; Max: máximo

Espécie, subespécie	Prevalência (%)	Abundância relativa (%)	
		Mean \pm SD	Range (Min-Max)
ISOTRICHIA Stein, 1858			
<i>Isotricha prostoma</i> Stein, 1858	60.7	1.4 \pm 1.94	0 – 8.0
<i>Isotricha intestinalis</i> Stein, 1858	50	1.1 \pm 1.91	0 – 7.6
DASYTRICHA Schuberg, 1888			
<i>Dasytricha ruminantium</i> Schuberg, 1888	71.4	2.2 \pm 4.40	0 – 21.0
ENTODINIUM Stein, 1858			
<i>Entodinium caudatum</i> Stein, 1858	100	11.7 \pm 7.25	1 – 31.3
<i>Entodinium caudatum caudatum</i> Stein, 1858	7.1	<0.1 \pm 0.25	0 – 1.3
<i>Entodinium caudatum lobosospinosum</i> Stein, 1858	89.2	6.0 \pm 6.90	0 – 26.6
<i>Entodinium bimastus</i> Dogiel, 1927	64.2	4.0 \pm 7.88	0 – 37.6
<i>Entodinium yunense</i> Ito, 1994	67.8	4.0 \pm 3.42	0 – 12.0
<i>Entodinium oktmae</i> Göçmen, 2001	7.1	<0.1 \pm 0.13	0 – 0.6
<i>Entodinium imaii</i> Göçmen, 2001	7.1	<0.1 \pm 0.30	0 – 1.6
<i>Entodinium simplex</i> Dogiel, 1925	82.1	1.3 \pm 1.82	0 – 7.0
<i>Entodinium nanellum</i> Dogiel, 1923	82.1	3.2 \pm 3.31	0 – 13.0
<i>Entodinium bursa</i> Stein, 1858	10.7	<0.1 \pm 0.09	0 – 0.3
<i>Entodinium longinucleatum</i> Dogiel, 1925	85.7	2.6 \pm 2.47	0 – 9.6
<i>Entodinium dubardi</i> Buisson, 1923	7.1	<0.1 \pm 0.19	0 – 1.0

<i>Entodinium exiguum</i> Dogiel, 1925	75	1.3 ± 2.07	0 – 9.3
<i>Entodinium bovis</i> Wertheim, 1935	42.8	0.4 ± 0.86	0 – 4.0
<i>Entodinium ovinum</i> Dogiel, 1927	39.2	0.8 ± 1.24	0 – 4.0
<i>Entodinium salmani</i> Gocmen and Rastgeldi, 2004	3.5	<0.1 ± 0.18	0 – 1.0
<i>Entodinium dilobum</i> Dogiel, 1927	50	0.8 ± 1.49	0 – 6.3
<i>Entodinium minimum</i> Schuberg, 1888	60.7	3.6 ± 8.16	0 – 41.6
<i>Entodinium rectangulatum</i> Kofoid and MacLennan, 1930	53.5	0.9 ± 1.80	0 – 6.6
<i>Entodinium simulans</i> Lubinsky, 1957	39.2	1.0 ± 2.02	0 – 8.6
<i>Entodinium dali</i> Dehority, 1974	7.1	<0.1 ± 0.07	0 – 0.3
<i>Entodinium ekendrae</i> Das-Gupta, 1935	3.5	<0.1 ± 0.05	0 – 0.3
<i>Entodinium rhomboideum</i> Kofoid and MacLennan, 1930	7.1	<0.1 ± 0.43	0 – 2.3
<i>Entodinium parvum</i> Buisson, 1923	28.5	0.8 ± 1.65	0 – 7.0
<i>Entodinium quadricuspis</i> Dogiel, 1925	14.2	0.1 ± 0.61	0 – 3.0
EUDIPLODINIUM Dogiel, 1927			
<i>Eudiplodinium maggii</i> (Fiorentini, 1889)	17.8	0.2 ± 0.76	0 – 3.0
DIPLODINIUM Schuberg, 1888			
<i>Diplodinium anisacanthum</i> Dogiel, 1927	17.8	0.5 ± 0.88	0 – 2.6
<i>Diplodinium dentatum</i> (Stein, 1858)	25	1.2 ± 2.99	0 – 13.3
<i>Diplodinium monocanthum</i> Dogiel, 1927	7.1	0.1 ± 0.75	0 – 4.0
<i>Diplodinium diacanthum</i> Dogiel, 1927	7.1	<0.1 ± 0.15	0 – 0.6
<i>Diplodinium triacanthum</i> Dogiel, 1927	14.2	0.1 ± 0.62	0 – 3.3
<i>Diplodinium tetracanthum</i> Dogiel, 1927	25	0.6 ± 1.60	0 – 7.3
<i>Diplodinium pentacanthum</i> Dogiel, 1927	14.2	0.5 ± 1.79	0 – 8.3
POLYPLASTRON Dogiel and Fedorowa, 1925			
<i>Polyplastron multivesiculatum</i> (Dogiel and Fedorowa, 1925)	50	0.8 ± 1.49	0 – 5.6
ELYTROPLASTRON Kofoid and Mc Lennan, 1932			
<i>Elytroplastron bubali</i> (Dogiel, 1928)	53.5	1.5 ± 2.21	0 – 7.6
METADINIUM Awerinzew and Mutafova, 1914			
<i>Metadinium medium</i> Awerinz and Mutafova, 1914	14.2	0.1 ± 0.27	0 – 1.0
<i>Metadinium ypsilon</i> Dogiel, 1925	10.7	<0.1 ± 0.22	0 – 1.0
EPIDINIUM Crawley, 1923			
<i>Epidinium ecaudatum</i> (Fiorentini, 1889)	35.7	0.3 ± 0.62	0 – 2.3
<i>Epidinium caudatum</i> (Fiorentini, 1889)	35.7	0.3 ± 0.61	0 – 2.3
<i>Epidinium parvicaudatum</i> (Awerinz and Mutafova, 1914)	46.4	0.7 ± 1.31	0 – 5.0
<i>Epidinium cattanei</i> (Sharp, 1914)	39.2	1.2 ± 2.46	0 – 10.6
<i>Epidinium quadricaudatum</i> (Sharp, 1914)	39.2	0.5 ± 0.90	0 – 3.6
<i>Epidinium tricaudatum</i> (Sharp, 1914)	3.5	<0.1 ± 0.11	0 – 0.6
<i>Epidinium eberleini</i> (Da Cunha, 1914)	32.1	0.1 ± 0.29	0 – 1.0
OPHRYOSCOLEX Stein, 1858			
<i>Ophryoscolex caudatum</i> Eberlein, 1895	3.5	0.2 ± 1.32	0 – 7.0
<i>Ophryoscolex purkynjei</i> Stein, 1858	3.5	<0.1 ± 0.49	0 – 2.6
Total de espécies e subespécies: 47 e 2.			

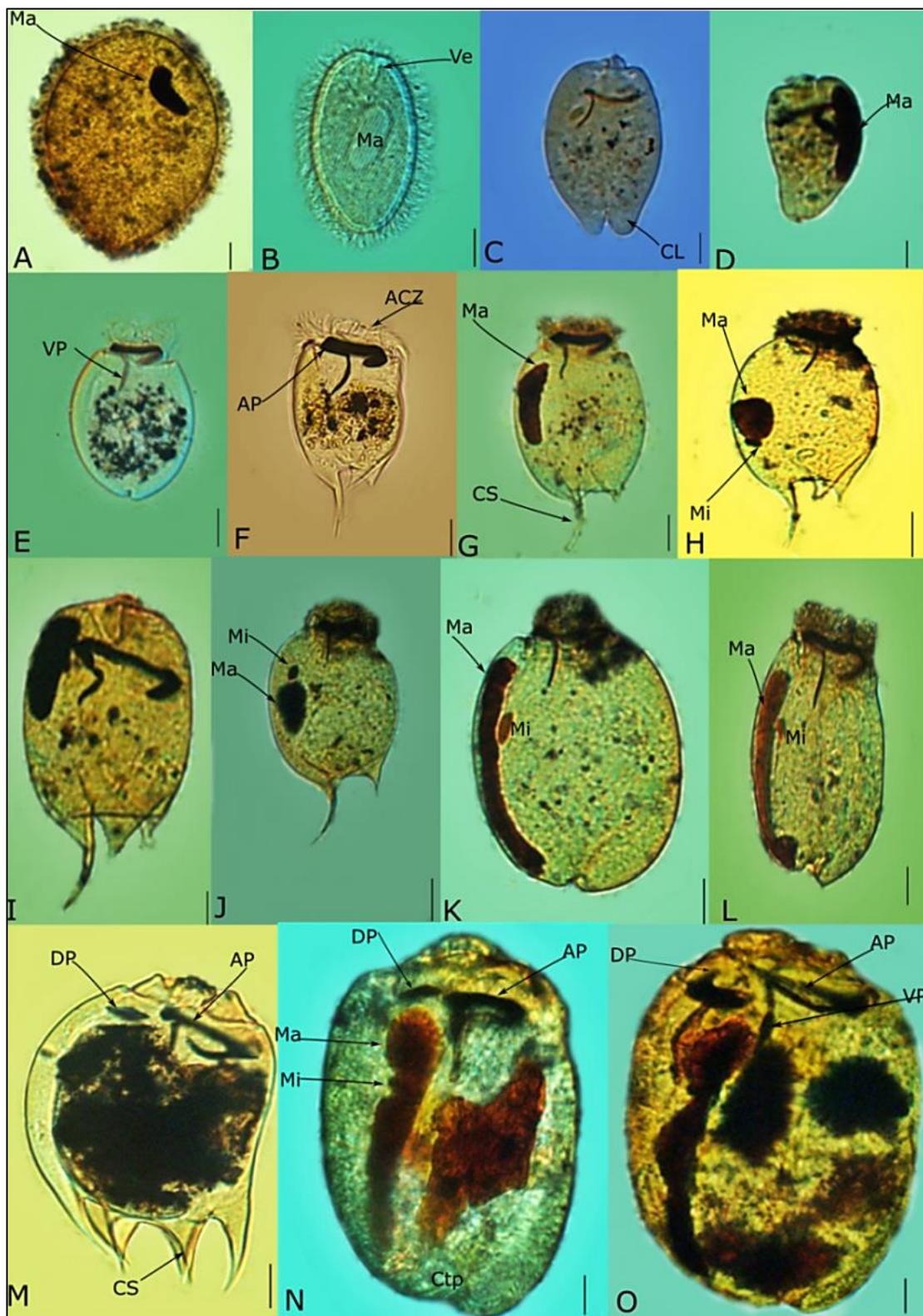
Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

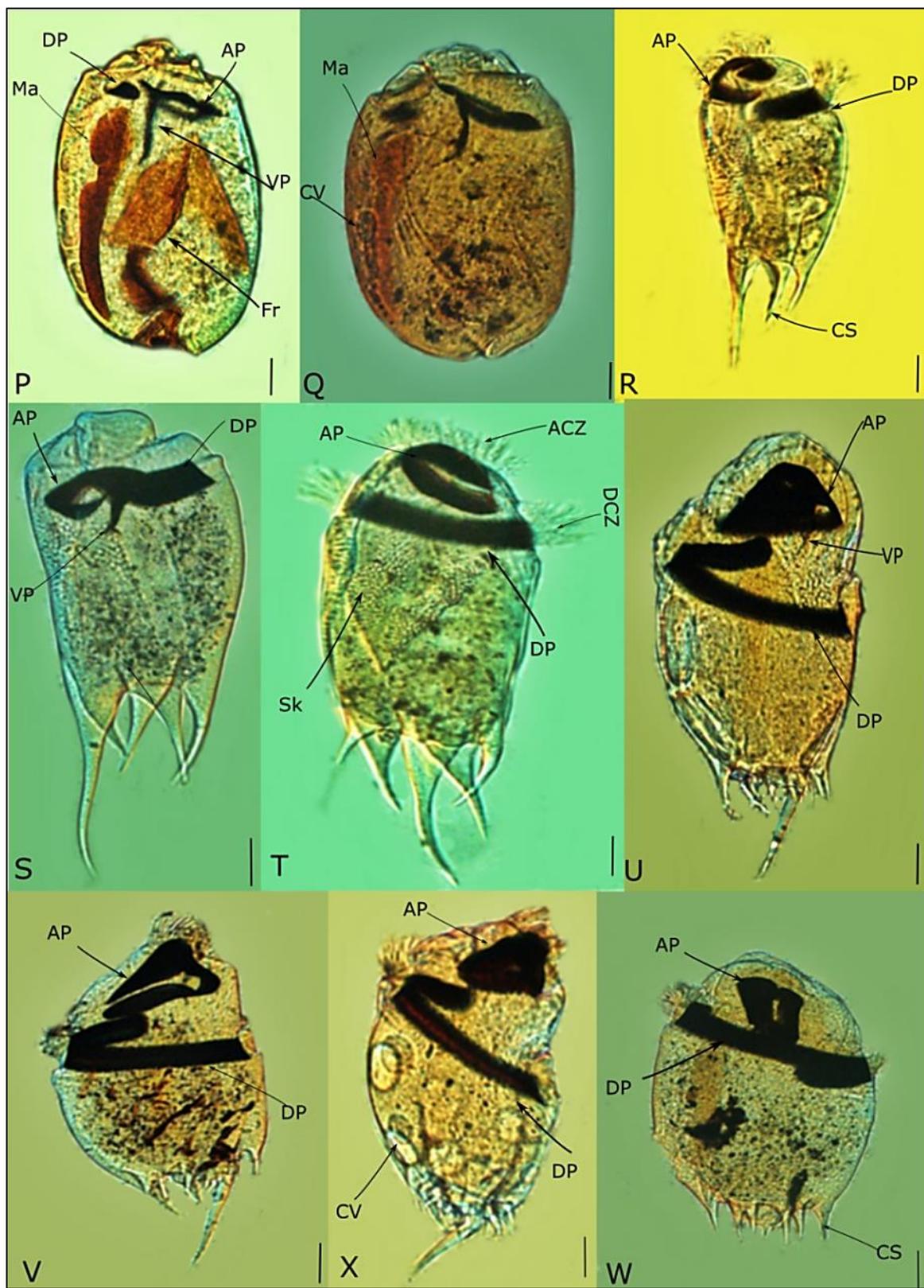
Figura 1. Fotomicrografias de protozoários ciliados do conteúdo ruminal de caprinos da raça Landim (*Capra hircus* L), observados por meio da técnica semipermanente com corante à base de iodo. A- *Isotricha prostoma*; B- *Isotricha intestinalis*; C- *Entodinium* sp.; D- *Entodinium minimum*; E- *Entodinium dilobum*; F- *Entodinium rectangulatum*; G- *Entodinium bimastus*; H- *Entodinium longinucleatum*; I- *Entodinium longinucleatum*; J- *Diplodinium anisacanthum*; K- *Epidinium parvicaudatum*; L- *Epidinium cattanei*; M- *Polyplastron multivesiculatum*; N- *Eudiplodinium maggii*; O- *Elytroplastron bubali*; P- *Ophryoscolex caudatus*. Ma- macronúcleo; ACZ- zona adoral de ciliatura; CL-lobo caudal; Ctp- citoprote; CV- vacúolo contractile; DCZ- zona dorsal de ciliatura dorsal; Mi- micronúcleo; Sk- placa esquelética; Ve- vestibulo; CS- espinha caudal. Aumento de 400x, microscópio Olympus BX51. Barras: 10 µm.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

Figura 2. Fotomicrografias de protozoários ciliados do conteúdo ruminal de caprinos da raça Landim (*Capra hircus* L), observados por meio da técnica de impregnação pelo carbonato de prata. A- *Isotricha intestinalis*; B- *Dasytricha ruminantium* C- *Entodinium bimastus* D- *Entodinium minimum*; E- *Entodinium longinucleatum*; F- *Entodinium rectangulatum* e G- *Entodinium caudatum*; H-*Entodinium ekendrae*; I- *Entodinium caudatum*; J- *Entodinium sp*; K e L- *Entodinium longinucleatum*; M- *Diplodinium anisacanthum*; N- *Polyplastron multivesiculatum*; O-*Metadinium sp*; P- *Polyplastron multivesiculatum*, evidenciando o macronúcleo; Q- *Polyplastron multivesiculatum*; R- *Epidinium tricaudatum*; S- *Epidinium cattanei*; T-*Epidinium cattanei*, evidenciando as placas esqueléticas; U- *Ophryoscolex caudatus* V- *Ophryoscolex caudatus*, evidenciado o formato de dorsal polybrachkinety e adoral polybrachkinety; X- *Ophryoscolex caudatus*, evidenciando contractile vacuole; w- *Ophryoscolex purkynjei*. Ma- macronúcleo; ACZ- adoral ciliary zone; AP- policinécia adoral; CL- lobo caudal; Ctp- citoproto; CV- vacúolo contractile; DCZ- zona dorsal de ciliatura; DP- policinécia dorsal; Mi- micronúcleo; Sk- placa esquelética; Ve- vestíbulo; VP- policinécia vestibular; CS- espinha caudal; CL- lobo caudal; Fr-fragmento. Aumento de 400x microscopio Olympus BX51. Barras: 10 µm.





Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.4.3 COMPILAÇÃO DE REGISTROS DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS REPORTADOS EM PAÍSES DA ÁFRICA

Após a compilação de protozoários ciliados em caprinos, ovinos e bovinos reportados em países africanos, observou-se que um total de 112 espécies e morfotipos pertencentes a 13 gêneros já foram registrados em seis países do continente (Tabela 3; Figura 3), dos quais Egito registrou 38 espécies, Líbia com 33, Tunísia com 25, África do Sul com 28, Quênia com um total de 47 e por último Tanzânia, onde foram registradas 49 espécies e morfotipos de ciliados endossimbiontes de caprinos, ovinos e bovinos domésticos (Tabela 3). *Entodinium yunense*, *Entodinium rectangulatum*, *Entodinium ekendrae*, *Entodinium rhomboideum*, *Entodinium quadricuspis*, *Diplodinium diacanthum*, *Diplodinium triacanthum*, *Diplodinium pentacanthum*, *Epidinium triacaudatum*, *Epidinium quadricaudatum*, *Epidinium parvicaudatum* e *Epidinium eberleini* foram observadas pela primeira vez no continente africano no presente trabalho. Ainda em relação aos registros, onze espécies marcam a sua segunda ocorrência dentro do continente, sendo registradas anteriormente, nomeadamente, *Entodinium ovinum* e *Entodinium bovis* na Líbia (caprinos e ovinos), *Entodinium bimastus* no Quênia (bovinos), *Entodinium dalli*, *Entodinium imaii*, *Entodinium oktmae*, *Diplodinium monocanthum*, *Diplodinium tetracanthum*, *Elytroplastron bubali*, *Epidinium caudatum* e *Epidinium cattanei* no Egito (caprinos, ovinos e bovinos) (Tabela 3).

Tabela 3. Protozoários ciliados registrados em caprinos domésticos (*Capra hircus*), ovinos domésticos (*Ovis aries*) e bovinos domésticos (*Bos taurus*) em países do continente africano. Presente estudo (em caprinos), Egito (em caprinos, ovinos e bovinos), Líbia (em caprinos e ovinos), Tunísia (em bovinos), África do Sul (em ovinos e bovinos), Quênia (bovinos) e Tanzânia (bovinos)

Gênero, Espécie e sub-espécies	Presente estudo	Egito [1]	Líbia [2]	Tunísia [3]	África do Sul [4]	Quênia [5]	Tanzânia [6]
ISOTRICHIA Stein, 1858							
<i>Isotricha prostoma</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Isotricha intestinalis</i>	+	+	+	+	+	+	+
DASYTRICHA Schuberg, 1888							
<i>Dasytricha ruminatum</i>	+	+	+	+	+	+	+
ENTODINIUM Stein, 1858							
<i>Entodinium caudatum</i>	+	-	+	-	+	-	-
<i>Entodinium caudatum f. caudatum</i>	+	+	-	-	+	-	-
<i>Entodinium caudatum f. dubardi</i>	-	+	-	-	+	-	-
<i>Entodinium caudatum f. lobospinosum</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium rectangulatum</i>	+	-	-	-	-	-	-

<i>Entodiniumrectangulatum</i> f.caudatum	-	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium williamsi</i> f. turcicum	-	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium yunense</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Entodinium yunnense</i> f. yunnense	-	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium yunnense</i> f.spinonucleatum	-	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium nanellum</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Entodinium constrictum</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium bursa</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Entodinium elongatum</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Entodinium exiguum</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Entodinium salmani</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium longinucleatum</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>Entodinium minimum</i>	+	-	+	+	+	+	-
<i>Entodinium dilobum</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Entodinium simulans</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Entodinium ellipsoideum</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Entodinium simplex</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>Entodinium dubardi</i>	+	-	+	-	+	+	+
<i>Entodinium parvum</i>	+	-	+	-	+	+	-
<i>Entodinium ovinum</i>	+	-	+	-	-	-	-
<i>Entodinium rostratum</i>	-	-	+	-	-	+	-
<i>Entodinium bovis</i>	+	-	+	-	-	-	-
<i>Entodinium furca</i>	-	-	+	-	+	-	-
<i>Entodinium tricostatum</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Entodinium biconcavum</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Entodinium gibberosum</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Entodinium chatterjee</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Entodinium bimastus</i>	+	-	-	-	-	+	-
<i>Entodinium indicum</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Entodinium tsunodai</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Entodinium dalli</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium imaii</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium oktemae</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Entodinium palmar</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Entodinium convexum</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Entodinium birostratum</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Entodinium ekendrae</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Entodinium rhomboideum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Entodinium quadricuspis</i>	+	-	-	-	-	-	-
DIPLODINIUM Schuberg, 1888							
<i>Diplodinium dentatum</i>	+	+	+	-	+	-	+
<i>Diplodinium anisacanthum</i>	+	+	-	+	-	+	-
<i>Diplodinium. Cameli</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Diplodinium minor</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Diplodinium polygonale</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>Diplodinium bilobosum</i>	-	-	-	-	-	+	-

<i>Diplodinium mahidoli</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Diplodinium nanum</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Diplodinium africanum</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Diplodinium monolobosum</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Diplodinium monocanthum</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Diplodinium diacanthum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Diplodinium triacanthum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Diplodinium tetracanthum</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Diplodinium pentacanthum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Diplodinium lobatum</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Diplodinium bubalidis</i>	-	-	-	-	-	-	+
EUDIPLODINIUM Dogiel, 1927							
<i>Eudiplodinium dilobum</i>	-	-	+	-	-	+	-
<i>Eudiplodinium bubalus</i>	-	-	+	-	-	+	+
<i>Eudiplodinium monolobum</i>	-	-	+	-	-	+	-
<i>Eudiplodinium bovis</i>	-	-	+	-	-	+	+
<i>Eudiplodinium rostratum</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Eudiplodinium maggii</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>Eudiplodinium kenyensis</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Eudiplodinium giganteum</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Eudiplodinium neglectum</i>	-	-	-	-	+	-	-
OSTRACHODINIUM Dogiel, 1927							
<i>Ostracodinium obtusum</i>	-	-	+	-	-	+	+
<i>Ostracodinium clipeolum</i>	-	+	+	-	-	+	+
<i>Ostracodinium gracile</i>	-	-	-	+	-	+	+
<i>Ostracodinium trivisiculatum</i>	-	-	-	+	-	+	+
<i>Ostracodinium nucleolobum</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Ostracodinium tiete</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Ostracodinium dogieli</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Ostracodinium mammosum</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Ostracodinium iwawoi</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Ostracodinium monolobum</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Ostracodinium dilobum</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Ostracodinium crassum</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Ostracodinium quadrivesiculatum</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Ostracodinium rugoloricatum</i>	-	-	-	-	-	-	+
METADINIUM Awerinzew and Mutafova, 1914							
<i>Metadinium banksi</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Metadinium esalqum</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Metadinium affine</i>	-	-	+	+	-	-	-
<i>Metadinium medium</i>	+	+	-	-	-	+	+
<i>Metadinium ypsilon</i>	+	-	-	-	-	+	+
<i>Metadinium magnum</i>	-	-	-	-	-	-	+
ELYTROPLASTRON Kofoid and Mc Lennan, 1932							
<i>Elytroplastron bubali</i>	+	+	-	-	-	-	-
EPIDINIUM Crawley, 1923							

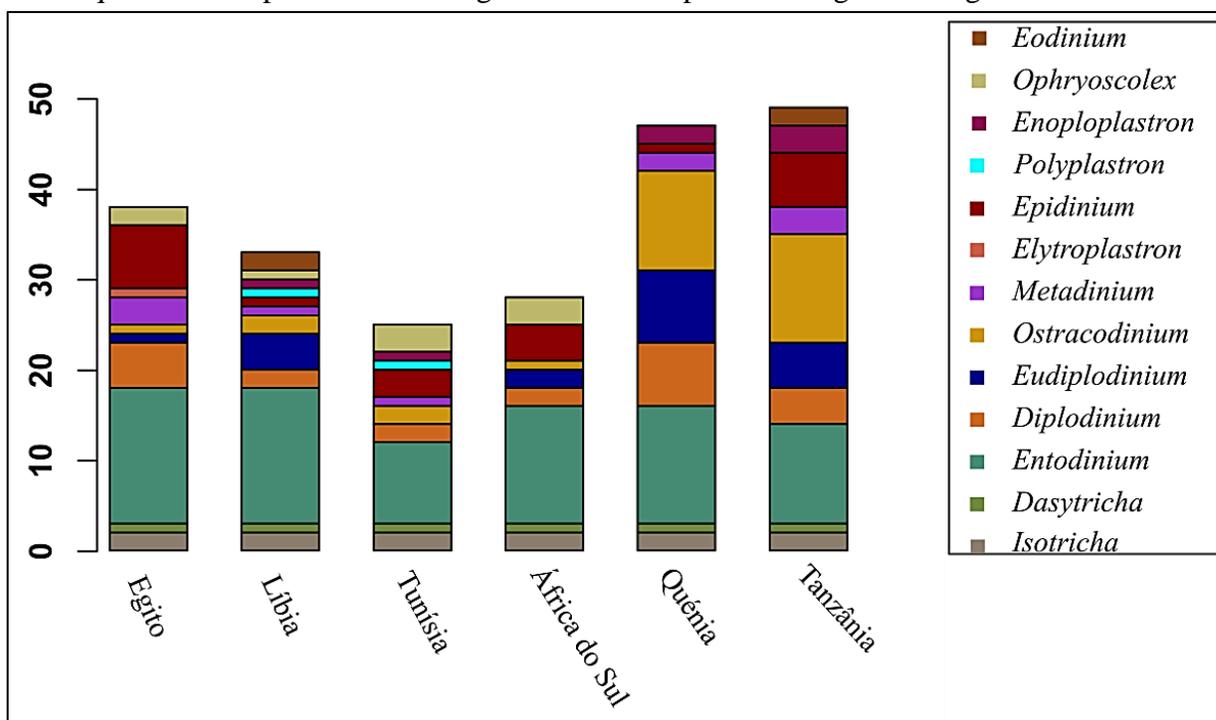
<i>Epidinium caudatum</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Epidinium bicaudatum</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Epidinium graini</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Epidinium ecaudatum</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>Epidinium ecaudatum f. caudatum</i>	-	+	-	+	+	+	+
<i>Epidinium ecaudatum f. ecaudatum</i>	-	+	-	+	+	-	+
<i>Epidinium quadricaudatum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Epidinium ecaudatum f. quadricaudatum</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Epidinium parvicaudatum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Epidinium ecaudatum f. parvicaudatum</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Epidinium ecaudatum f. hamatum</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Epidinium ecaudatum f. bicaudatum</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Epidinium tricaudatum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Epidinium ecaudatum f. tricaudatum</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Epidinium cattanei</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Epidinium eberleini</i>	+	-	-	-	-	-	-
POLYPLASTRON Dogiel and Fedorowa, 1925							
<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	+	-	+	+	-	-	-
ENOPLOPLASTRON Kofoid and MacLennan, 1932							
<i>Enoploplastron triloricatum</i>	-	-	+	+	-	+	-
<i>Enoploplastron stokyi</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>Enoploplastron stokyi stokyi</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Enoploplastron stokyi Buisson</i>	-	-	-	-	-	-	+
OPHRYOSCOLEX Stein, 1858							
<i>Ophryoscolex caudatus</i>	+	+	-	+	+	-	-
<i>Ophryoscolex purkynjei</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ophryoscolex purkynjei f. bicoronatus</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Ophryoscolex purkynjei f. purkynjei</i>	-	-	-	+	+	-	-
<i>Ophryoscolex purkynjei f. bicoronatus</i>	-	-	-	-	+	-	-
EODINIUM Dogiel, 1927							
<i>Eodinium posterovisiculatum</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>Eodinium posterovisiculatum f. bilobosum</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Eodinium lobatum</i>	-	-	+	-	-	-	-
TOTAL DE ESPÉCIES E FORMAS	49	38	33	25	28	47	49

Fonte: [1] SELIM et al., 1996; BARAKA, 2012; [2] SELIM et al., 1999; MOHAMED, 2017; [3] GÜRELLI; DAW, 2020; [4] BOOYSE; DEHORITY, 2011; FANTHAM, 1920; 1921; 1926; VAN DER WATH; MYBURGH, 1941; [5] IMAI, 1988; [6] MISHIMA et al., 2009.

Foi plotado um gráfico de barras contendo seis países nomeadamente Egito, Líbia, Tunísia, África do Sul, Quênia, Tanzânia, e os gêneros registrados em cada um dos países. Dentre os países mencionados, Líbia registrou maior número de gêneros (12), enquanto a África do Sul

registrou o menor registro genérico (08). O gênero *Entodinium* foi o mais abundante em todos registros e o gênero *Elytroplastron*, o menos abundante. Em relação a diversidade específica entre os países, notou-se que a Tanzânia foi o país com maior riqueza de espécies de ciliados, com 49 registros, e a Tunísia foi o país com menor registro, apresentando 25 espécies de ciliados (Tabela 3, Figura 3).

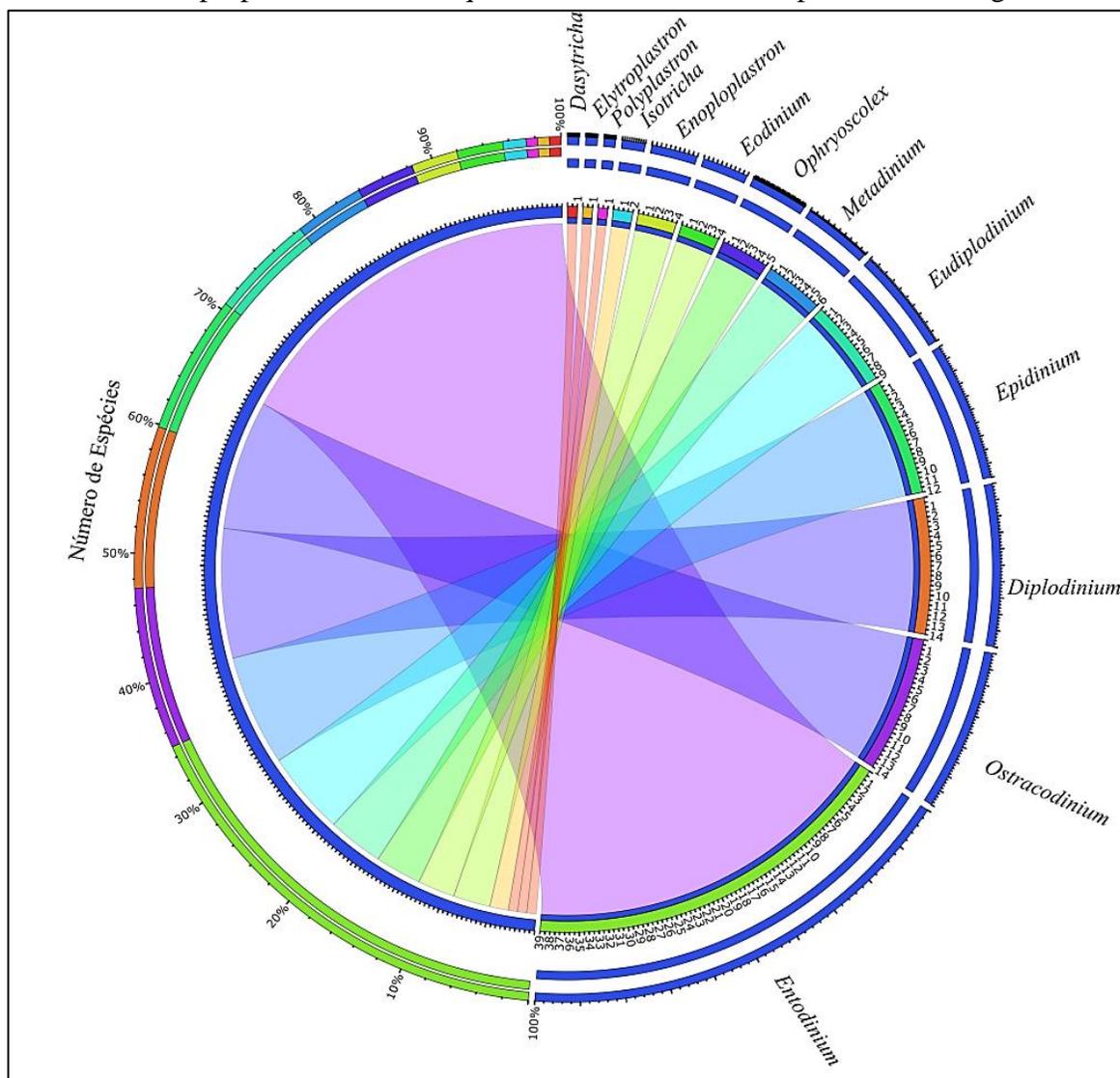
Figura 3. Gêneros de protozoários ciliados registrados em caprinos (*Capra hircus*), ovinos (*Ovis aries*) e bovinos (*Bos taurus*) em seis países da África. O tamanho da barra representa a quantidade específica de cada gênero. A cor representa os gêneros registrados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

O número de espécies por cada gênero foi representado por meio de um diagrama circular e mostrou que o gênero *Entodinium* foi registrado em todos seis países analisados, ou seja, 100% de prevalência, além de apresentar maior número de espécies (39), seguido pelos seguintes gêneros: *Ostracodinium* e *Diplodinium* ambos com 14 espécies, e *Epidinium*, com 12 espécies. Os outros nove gêneros apresentaram um registro com menos de 10 espécies cada (Figura 4).

Figura 4. Diagrama circular de número de espécies de protozoários ciliados de caprinos (*Capra hircus*), ovinos (*Ovis aries*) e bovinos (*Bos taurus*) registrados por gênero em países da África. Os números ao redor do círculo representam a quantidade de espécies por gênero. A ordem das cores de vermelha à verde clara no interior e exterior do círculo representa a sequência ocupada por cada gênero no diagrama. O tamanho das barras e das fitas no círculo são proporcionais com a quantidade numérica das espécies em cada gênero.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.5 DISCUSSÃO

No presente estudo, quarenta e sete espécies e duas subespécies pertencentes a dez gêneros foram registradas em caprinos domésticos da raça Landim (*Capra hircus* L). Este registro é o primeiro relato da presença, caracterização morfológica, estimativa da composição específica de protozoários ciliados no rúmen de caprinos de Moçambique. Não houve registro de

novos táxons, porém, doze espécies, *Entodinium rectangulatum*, *Entodinium yunense*, *Entodinium ekendrae*, *Entodinium rhomboideum*, *Entodinium quadricuspis*, *Diplodinium diacanthum*, *Diplodinium triacanthum*, *Diplodinium pentacanthum*, *Epidinium quadricaudatum*, *Epidinium parvicaudatum*, *Epidinium tricaudatum* e *Epidinium eberleini*, foram pela primeira vez registradas em um país do continente africano. A compilação de protozoários ciliados de caprinos, ovinos e bovinos reportados em países africanos, mostrou que um total de 112 espécies, pertencentes à 13 gêneros já foram registrados em seis países do continente até o momento.

Apesar de, nos últimos anos, a visão dos estudos envolvendo ciliados do rúmen terem o foco maior na utilização das técnicas moleculares, sobretudo a multidisciplinaridade metodológica (D'AGOSTO; CARNEIRO, 1999; CEDROLA et al., 2015; GENTEKAKI et al., 2017; VĎAČNÝ, 2018; VĎAČNÝ et al., 2018; FERNANDES; SCHRAGO, 2019; MAYÉN-ESTRADA et al., 2021), as técnicas morfológicas, principalmente aquelas relacionados à caracterização ultra-estrutural de sua complexa infra-estrutura (impregnação pela prata), continuam sendo um marco importante na melhoria do conhecimento deste grupo de ciliados gastrointestinais de ruminantes (LYNN, 2008; ROSSI et al., 2017; MAYÉN-ESTRADA et al., 2021). Além disso, o estudo morfológico da infraciliatura oral e somática tem sido utilizado na caracterização dos ciliados do rúmen, ampliando desta forma as descrições específicas deste grupo (ITO et al., 2001; MISHIMA et al., 2009; ROSSI et al., 2017). Apesar de ser uma técnica que ao longo do tempo tem sido modificada para sua melhoria, as principais metodologias referentes a impregnação pela prata, são aquelas propostas por FERNANDEZ-GALIANO (1976) e ITO; IMAI (1998; 2006). Neste estudo, não foi descrito um novo padrão de infraciliatura, porém, utilizando a impregnação pela prata, foi possível registrar alguns padrões de infraciliatura oral existentes em ciliados do rúmen, são eles: padrão-*Entodinium*, padrão-*Diplodinium*, padrão-*Epidinium* e padrão-*Ophryoscolex* (ITO; IMAI, 2006) (Figura 2).

Em relação ao comportamento das populações de protozoários ciliados, estes são classificados em quatro grupos (A, B, K e O), sendo o Tipo A aqueles que contêm *Polyplastron multivesiculatum* e por vezes *Diploplastron affine*. As populações do tipo B, são as que contêm *Epidinium* sp., *Eudiplodinium maggii*, ou ambos. Por sua vez, as populações do tipo K são limitadas com *Elytroplastron bubali*. Por último, as populações do Tipo O são constituídas por apenas indivíduos dos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha* e *Entodinium*. Todos os quatro grupos incluem igualmente os gêneros *Isotricha*, *Dasytricha* e *Entodinium* (EADIE, 1962; IMAI et al.,

1978; OGIMOTO; IMAI, 1981; WILLIAMS; COLEMAN, 1992; GÖÇMEN et al., 2005). As populações de gêneros de protozoários ciliados do rúmen de caprinos da raça Landim registradas neste estudo por meio de técnicas morfológicas (semipermanente à base de iodo e impregnação pela prata), foram classificadas em dois grupos, A e B, sendo 17 amostras classificadas como do Tipo A (60.7%) e 11 classificadas como do Tipo B (39.3%). Obtivemos resultado similar com a presença majoritária de populações do tipo A, constatado na Turquia, onde 15 amostras de conteúdo ruminal de caprinos foram analisadas, das quais, 12 registraram populações do Tipo A e o remanescente, três, foram do Tipo O (GÜRELLI, 2014). Isto pode estar relacionado ao fato de que as populações do tipo A, que incluem indivíduos do gênero *Polyplastron*, apresentam alta atividade predatória, podendo eliminar os indivíduos do gênero *Epidinium* e *Eudiplodinium*, assim como outras espécies da família Ophryoscolecidae (GÜRELLI, 2014).

O gênero *Entodinium* foi em todos os casos o mais abundante com 100% de prevalência em todas as 28 amostras analisadas, com as seguintes estimativas (abundância média = 428914.3, SD = 108625.5) por ml. O estabelecimento das populações de protozoários ciliados majoritariamente compostas por indivíduos do gênero *Entodinium*, tem sido atribuído aos vários fatores que incluem a dieta e o baixo valor de pH no rúmen (EADIE, 1962; HUNGATE, 1966; WILKINSON; VAN HOVEN, 1976; NAKAMURA et al., 1988; GÜRELLI et al., 2012). A raça Landim de caprinos utilizados neste estudo, tem um hábito alimentar baseado em pastagem natural constituída maioritariamente por capim e folhas de arbustos de herbáceas como *Heteropogon contortus* e algumas xerófitas (*Combretum spp*, *Colophospermum mopane*, *Adansonia digitata*, *Heteropogon contortus*) oriundas da biodiversidade local da zona de criação (MACIEL, 2004). Essa diversidade de elementos na dieta natural dos hospedeiros pode explicar a predominância do gênero *Entodinium* nas amostras, como explicam DEHORITY; ODENYO (2003) que a fauna de protozoários de várias ovelhas Etíopes, alimentadas com pastagens naturais, parecia ter uma porcentagem muito maior de *Entodinium*.

O número total de dez gêneros registrado neste estudo pode ser considerado superior quando comparado com os resultados de ITO et al. (1995) no Japão, BARAKA (2012) no Egito, GÜRELLI (2014) na Turquia, GURUNG et al. (2002) no Nepal e GÜRELLI et al. (2016) no Quirguistão, que registraram cinco, sete, sete, oito e oito gêneros, respectivamente. Porém, inferior quando comparado com o trabalho de GÖÇMEN et al. (2005), que registraram 12 gêneros no conteúdo ruminal de caprinos domésticos vivendo na Turquia.

A densidade média de ciliados (49.39 ± 134.7) x 10^4 /ml do presente estudo é considerada inferior àquela demonstrada no Alaska por DEHORITY (1975), na Islândia (DE LA FUENTE et al., 2006), na Turquia (GÜRELLI, 2014) e elevada quando comparada aos registros no Japão (ITO et al., 1995), no Nepal (GURUNG et al., 2002), no Irão (TALARI et al., 2004), no Egito (BARAKA, 2012), no Quirquistão (GÜRELLI et al., 2016). E por sua vez, o número de espécies de ciliados registrado neste estudo com conteúdo ruminal de caprinos de Moçambique, é superior ao comparar com os trabalhos de ITO et al. (1995) no Japão, GURUNG et al. (2002) no Nepal, DE LA FUENTE et al. (2006) na Islândia, TALARI et al. (2004) no Irão, BARAKA (2012) no Egito, GÜRELLI (2014) na Turquia e GÜRELLI et al. (2016) no Quirquistão, que registraram onze, vinte e um, vinte e três, dez, dezanove, dezanove e doze espécies, respectivamente. Esta diferença pode ter sido dentre vários fatores, a dieta, raça, localização geográfica, incluindo o número de hospedeiros utilizados em cada um dos estudos.

A compilação de registros de espécies de ciliados nos países da África, mostrou que as espécies *Isotricha prostoma*, *Isotricha intestinalis*, *Dasytricha ruminantium* e *Entodinium nanellum* já foram registradas em outros seis países do continente. Porém, algumas espécies foram registradas apenas em um país, nomeadamente, Egito (*Diplodinium lobatum*, *Entodinium constrictum*, *Metadinium banksi*, *Metadinium esalqum*, *Epidinium bicaudatum*, *Epidinium graini*), África do Sul (*Entodinium elongatum*, *Eudiplodinium neglectum*, *Ostracodinium crassum*), Tanzânia (*Entodinium palmar*, *Entodinium convexum*, *Entodinium birostratum*, *Metadinium magnum*, *Ostracodinium quadrivesiculatum*, *Ostracodinium rugoloricatum*, *Diplodinium bubalidis*), Tunísia (*Entodinium ellipsoideum*), Líbia (*Diplodinium minor*) e Quênia (*Diplodinium monolobosum*) (Tabela 3). Esta variação na quantidade de espécies registradas em cada país pode ter sido influenciada pela quantidade de hospedeiros envolvidos na coleta das amostras, incluindo igualmente, os fatores dieta dos hospedeiros que pode ser variada entre os países, estratégias alimentares de cada grupo de animais (caprinos, ovinos e bovinos) e sua localização geográfica (OGIMOTO; IMAI, 1981; LANGDA et al., 2020).

A composição de ciliados do conteúdo ruminal de caprinos da raça Landim de Moçambique, observada neste estudo, pode ser muito mais diversa em termos de espécies que a composição de ciliados do rúmen de animais domésticos do Egito, Líbia, Tunísia e África do Sul. Porém, é similar com a composição observada no Quênia e Tanzânia (Tabela 3). Isto, pode ser pelo fato de estes três países (Moçambique, Tanzânia e Quênia) serem vizinhos geograficamente

e apresentarem majoritariamente uma forragem natural local similar daquela encontrada em Moçambique, constituída principalmente de xerófitas que servem de base de dieta para estes hospedeiros (MACIEL, 2004).

A utilização neste estudo do líquido ruminal de um grupo de hospedeiro, caprinos, pode ter importante contributo no conhecimento da fauna desse grupo de ruminantes. E, os resultados da compilação apresentados mostraram que até a presente data, já foram registradas 112 espécies e 13 gêneros de ciliados do rúmen no continente africano. Este registro, 112 espécies, pode ser inferior se comparado com resultados de BOOYSE e DEHORITY (2011), que fizeram uma compilação de protozoários ciliados associados com ovinos ao redor do mundo com um registro de 131 espécies em 15 gêneros.

A utilização da técnica de impregnação pelo carbonato de prata neste estudo confirmou o descrito por CEDROLA et al. (2015), técnica rápida e com bom desempenho quando o foco é impregnar e analisar o formato da infraciliatura e o aparato nuclear de ciliados do rúmen (Figura 2). O uso das técnicas ciliatológicas recuperaram ampla diversidade de espécies, todas identificadas em nível específico, algo raro para o grupo. Estudos futuros usando uma abordagem integrativa e ferramentas moleculares poderão revelar espécies crípticas e auxiliar na melhor compreensão de composição de ciliados do rúmen nas diferentes localidades geográficas.

4.6 CONCLUSÕES

A composição de protozoários ciliados do conteúdo ruminal de caprinos domésticos da raça Landim do norte de Moçambique foi constituída por quarenta e sete espécies e duas subespécies pertencentes a dez gêneros, nomeadamente *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium*, *Polyplastron*, *Elytroplastron*, *Epidinium*, *Metadinium*, *Eudiplodinium* e *Ophryoscolex*. Cento e doze espécies e morfotipos pertencentes a treze gêneros de protozoários ciliados do conteúdo ruminal de caprinos (*Capra hircus*), ovinos (*Ovis aries*) e gado bovino (*Bos taurus*), já foram registrados em seis países da África. Destas espécies, *Entodinium rectangulatum*, *Entodinium yunense*, *Entodinium ekendrae*, *Entodinium rhomboideum*, *Entodinium quadricuspis*, *Diplodinium diacanthum*, *Diplodinium triacanthum*, *Diplodinium pentacanthum*, *Epidinium quadricaudatum*, *Epidinium parvicaudatum*, *Epidinium tricaudatum* e *Epidinium eberleini* foram registradas neste trabalho pela primeira vez em Moçambique. Para além de ser o primeiro registro de ciliados do rúmen em Moçambique, utilizou-se o conteúdo

ruminal de hospedeiros negligenciados nos estudos morfológicos de ciliados. Enfatizamos neste trabalho a necessidade de utilização de mais técnicas morfológicas, principalmente aquelas que melhorem as descrições e redescrições detalhadas de padrões de bandas infraciliares o que poderá trazer uma melhora na identificação dos ciliados. Igualmente enfatizamos a necessidade de maior ampliação de coletas e estudos taxonômicos envolvendo hospedeiros ruminantes de localidades africanas.

REFERÊNCIAS

- BARAKA, T.A. Comparative Studies of Rumen pH, Total Protozoa Count, Generic and Species Composition of Ciliates in Camel, Buffalo, Cattle, Sheep and Goat in Egypt. **Journal of American Science**, 8 (2), 655–669, 2012
- BRYANT, M.P.; SMALL, N. The development of rumen microorganism in inoculated vs isolated calves. **Journal of Dairy Science**, 39, 927–929.1956
- BOOYSE, D.; DEHORITY, B.A. Rumen protozoa in South African sheep with a summary of the worldwide distribution of sheep protozoa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 78(1), 1–7, 2011. <https://doi:10.4102/ojvr.v78i1.307>.
- CARVALHO, L.F.P.B.; AMORIM, G. L.; MATOS, D.S.; BATISTA, A.M.V.; MORAES, A.C.A.; CABRAL, A. M.D. Protozoários do rúmen de caprinos submetidos a dieta com casca de soja. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 12 (1), 244–253, 2011
- CEDROLA, F.; ROSSI, M.; DIAS, R.J.P.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M., 2015. Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. **Zoological Science**, 32(1), 8–15, 2015. <https://doi.org/10.2108/zs140125>.
- CEDROLA, F.; MARTINELE, I.; DIAS, R. J. P.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO, M. A. R. T. A. Rumen ciliates in Brazilian sheep (*Ovis aries*), with new records and redescription of *Entodinium contractum* (Entodiniomorphida: Ophryoscolecidae). **Zootaxa**, 4088(2), 292-300, 2016. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4088.2.10>.
- CEDROLA, F.; BORDIM, S.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. J. P. Intestinal ciliates (Alveolata, Ciliophora) in Brazilian domestic horses (*Equus caballus* L.) and a review on the ciliate communities associated with horses around the world. **Zootaxa**, 4585(3), 478-488, 2019. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4585.3.4>.
- CEDROLA, F.; SENRA, M.V.X.; ROSSI, M.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. J. P. Trichostomatid Ciliates (Alveolata, Ciliophora, Trichostomatia) Systematics and Diversity: Past, Present, and Future. **Frontiers Microbiology**, 10, 2967, 2020 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02967>.
- CEDROLA, F.; D'AGOSTO, M.; MARTINELE, I.; DIAS, R. J. P. Redescription of *Polyplastron alaskum* Dehority, 1974 (Ciliophora, Entodiniomorphida), a rare rumen ciliate species from domestic and wild sheep. **Acta Protozoologica**, 59(2), 61–65, 2020 <https://doi.org/10.4467/16890027AP.20.005.12673>.
- CONRAD, H.R.; HIBS, J.W.; FRANK, N. High roughage system for raising calves based on early development of rumen function. IX. Effect of rumen inoculation and Chlortetracycline on rumen function of calves fed high roughage pellets. **Journal of Dairy Science**, 41, 1248–1261, 1958. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(58\)91080-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(58)91080-4).
- CHURCH, D.C. Fisiologia digestiva y nutrición delos rumiantes. Zaragoza, **Acribia**, 1, 636.2108923 C4F5, 1974

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; AMEILBONNE, A.; AUFFRET, P.; BERNARD, M.; MIALON, M.M.; DUNIÈRE, L.; FORANO, E. 2019. Supplementation of live yeast based feed additive in early life promotes rumen microbial colonization and fibrolytic potential in lambs. **Scientific Reports**, 9, 19216, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55825-0>.

CHRISTL, H. *Entodinium alpinum* n. sp. (*caliata*) aus dem pansen eines alpensteinbockes (*Capra ibex ibex*). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, 18,297–307, 1958. <https://doi.org/10.1007/BF00259659>.

CRHA, J.; HRABE, V.; KOUBEK, P. Rumen ciliate fauna in the chamois (*Rupicapra rupicapra* L.). **Acta Veterinaria Brno**, 54, 141–147, 1958. <https://doi.org/10.2754/avb198554030141>.

DE MATOS, D. S., GUIM, A., BATISTA, Â., DOS SANTOS, M. V. F., CORREA, I. M., SANTOS, G. D. A., LOPES, C. D. A. Rumen ciliate protozoa in sheep raising in the caatinga region of Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Saude e Producao Animal**, 9 (2), 270–279, 2008.

DEHORITY, B.A, 1975. Rumen ciliate protozoa of Alaskan reindeer and caribou (*Rangifer tarandus* L.). **Biological Papers of the University of Alaska**, Fairbanks, Alaska, 241–250, 1975.

DEHORITY, B.A; ORPIN, C.G. Development of and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: Hobson, P., Stewart, C. (Eds.), **The Rumen Microbial Ecosystem**, Blackie Academic and Professional, London, 196–245, 1997.

DEHORITY, B, A. Rumen Ciliate Fauna of Some Brazilian Cattle: Occurrence of Several Ciliates New to the Rumen, Including the Cycloposthid *Parentodinium africanum*¹. **The Journal of protozoology**, 33(3), 416–421, 1986. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1986.tb05633.x>.

DEHORITY, B.A. Protozoa of the digestive tract of herbivorous mammals. **International Journal of Tropical Insect Science**, 7, 279–296, 1986a

DEHORITY, B.A, 1986b. Rumen ciliate fauna of some Brazilian cattle: occurrence of several ciliates new to the rumen including the cycloposthid *Parentodinium africanum*. **Journal of Protozoology**, 33, 416–421, 1986b.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied Environmental Microbiology**, 48, 182–185, 1984.

DEHORITY, B. A.; ODENYO, A. A. Influence of diet on the rumen protozoal fauna of indigenous African wild ruminants. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 50(3), 220–223. 2003

DE LA FUENTE, G.; SKIRNISSON, K.; DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of Icelandic cattle, sheep, goats and reindeer. **Zootaxa**, 1377, 47–60, 2006.

DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; ABECIA, L.; DEHORITY, B.A.; FONDEVILA, M. Rumen protozoal diversity in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) as compared with domestic goats (*Capra hircus*). **European Journal of Protistology**, 45(2), 112–120, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2008.07.001>.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16 (3), 725–729, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000300011>.

D'AGOSTO, M.; GUEDES, P. M. D. M. Associative behaviour and antagonism of bovine rumen ciliate (Protista, Ciliophora) from Zona da Mata, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 18, 1123–1126, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752001000400011>.

D'AGOSTO, M.; GUEDES, P. D. M. Characterization of beef cattle rumen ciliate (Protista, Ciliophora) populations in Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoociências**, 2 (1), 81–90, 2000.

DOGIEL, V.A. Monographie der familie Ophryoscolecidae. **Archiv für Protistenkunde**, 59, 1–288, 1927.

EBRAHIMI, S. H.; VALIZADEH, R.; MIRI, V.H. Rumen Microbial Community of Saanen Goats Adapted to a High-Fiber Diet in the Northeast of Iran. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, 8(2), 271–279, 2018.

EADIE, J. M. Inter-relationships between certain rumen ciliate protozoa. **Journal of General and Applied Microbiology**, 29, 578–888, 1962. <https://doi.org/10.1099/00221287-29-4-579>.

EADIE, J. M.; HOBSON, P. N.; MANN, S.O. A relationship between some bacteria, protozoa and diet in early weaned calves. **Nature**, London, 183, 624–625, 1959. <https://doi.org/10.1038/183624a0>.

FANTHAM, H.B. 'Some parasitic protozoa found in South Africa III', **South Africa Journal of Science**, 17, 131–135, 1920.

FANTHAM, H.B. 'Some parasitic protozoa found in South Africa IV'. **South African Journal of Science**, 18, 164–170, 1921.

FANTHAM, H.B., 1926. 'Some parasitic protozoa found in South Africa. IX', **South African Journal of Science**, 23, 560–570, 1926.

FERNANDES, N.M.; SCHRAGO, C.G. A multigene timescale and diversification dynamics of Ciliophora evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 139, 106521, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106521>.

FERNANDEZ-GALIANO, D. Silver Impregnation of Ciliated Protozoa: Procedure Yielding Good Results with the Pyridinated Silver Carbonate Method. **American Microscopical Society**, 95(4), 557–560, 1976. <https://doi.org/10.2307/3225377>.

FERNANDEZ-GALIANO, D., CAMPOS, M. I. *Ophryoscolex monoacanthus* n. sp., an Entodiniomorphid Ciliate in the Rumen of the Chamois *Rupicapra rupicapra*. **American Microscopical Society**, 111(1), 44–49, 1992. <https://doi.org/10.2307/3226725>.

GARRINE, C.M.L.P.; Kotze, A.; ELS, H.C.; GROBLER, J. P. Genetic characterization of the indigenous Landim and Pafuri goat breeds from Mozambique. **African Journal of Agricultural Research**, 5(22), 3130–3137, 2010. <http://hdl.handle.net/2263/16055>.

GENTEKAKI, E.; KOLISKO, M.; GONG, Y.; LYNN, D.H. Phylogenomics solves a long-standing evolutionary puzzle in the ciliate world: the subclass Peritrichia is monophyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 106, 1–5, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.09.016>.

GÖÇMEN, B. *Ophryoscolex* Stein, 1858 (Protozoa: Ciliophora: Entodiniomorphida) cinsi hakkında morfolojik ve taksonomik araştırmalar. Doğa - **Turkish Journal of Zoology**, 23, 397–427, 1999a.

GÖÇMEN, B. *Epidinium Crawley*, 1923 (Protozoa: Ciliophora: Entodiniomorphida) cinsi hakkında morfolojik ve taksonomik araştırmalar. Doğa - **Turkish Journal of Zoology**, 23, 429–463, 1999b

GÖÇMEN, B, 1999c. New rumen ciliates from Turkish domestic cattle (*Bos taurus* L.): II. *Epidinium graini* n.sp. (Ophryoscolecidae, Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, 24, 23–31, 1999c.

GÖÇMEN, B.; FALAKALI MUTAF, B.; TOSUNOĞLU, M. New rumen ciliates from Turkish domestic cattle (*Bos taurus* L.): 3. *Eudiplodinium dehorityi* n. sp. **Acta Parasitologica Turcica**, 25, 305–307, 2001a

GÖÇMEN, B.; TOSUNOĞLU, M.; MUTAF, B.F. New rumen ciliates from Turkish domestic cattle (*Bos taurus* L.): 3. *Entodinium oektamae* n. sp. and *Entodinium imaii* n. sp. (Entodiniidae, Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, 25 (3), 269–274, 2001b

GÖÇMEN, B.; DEHORITY, B.A.; TALU, G.H.; RASTGELDI, S. The Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep (*Ovis ammon aries*) from the Turkish Republic of Northern Cyprus. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 48, 455–459, 2001c.

GÖÇMEN, B.; ATATÜR, M.K. Some rumen ciliates (Isotrichidae, Trichostomatida; Epidiniinae, Ophryoscolecidae) of the domestic goat (*Capra hircus* L.) from Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 26, 15–26, 2002.

GÖÇMEN, B.; DEHORITY, B.A.; RASTGELDI, S. The occurrence of the rumen ciliate *Metadinium banksi* Dehority, 1985 (Ophryoscolecidae, Entodiniomorphida) from domestic goats (*Capra hircus* L.) in southeastern Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 26, 367–370, 2002.

GÖÇMEN, B.; RASTGELDI, S. A new rumen ciliate from Turkish domestic goat (*Capra hircus* L.): *Entodinium salmani* n. sp. (Entodiniidae, Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, 28, 295–299, 2004. <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol28/iss4/3>.

GÖÇMEN, B.; KARAOĞLU, A. Entodiniid Ciliates (Entodiniidae, Entodiniomorphida) Living In The Rumen Of Domesticated Goats (*Capra hircus* L.) in Southeastern Turkey, **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 29 (3), 211–218, 2005.

GÖÇMEN, B.; RASTGELDI, S.; KARAGLU, S.; A'KAN, H.K.N. Rumen ciliated protozoa of the turkish domestic goats (*Capra hircus* L.). **Zootaxa**, 1091(1), 53–64, 2005. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1091.1.4>.

GÖÇMEN, B., SEZGIN, Y. Rumen Ciliate, *Ophryoscolex purkynjei* Stein, 1858 (Sensu Göçmen, 1999) of the Domestic Goats (*Capra hircus*) in Northern Cyprus. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 30 (3), 246–251, 2006.

GURUNG, H.B.; PARAJULI, N.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S.; KOBAYASHI, Y. Rumen ciliate faunae of water Buffalo (*Bubalus bubalis*) and Goat (*Capra hircus*) in Nepal. **Journal of Veterinary Medical Science**, 64(3), 265–267, 2002. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.265>.

GRAIN, J. Infusoires ciliés (ordre des Entodiniomorpha). In: Grasse, P. (Ed.). **Traité de Zoologie**, Paris, pp. 327–364, 1994.

GÜRELLI, G., GÖÇMEN, B., YILDIZ, M.Z. Rumen ciliates from the goitered gazelle (*Gazella subgutturosa*) living in the Şanlıurfa Province of Turkey. **Biharean Biology**, 6, 42–44, 2012. <http://biozoojournals.3x.ro/bihbiol/index.html>.

GÜRELLI, G. Rumen ciliate fauna (Ciliophora, Protista) of Turkish domestic goats living in İzmir, Turkey. **Turkish journal of zoology**, 38, 136–143, 2014. <https://doi.org/10.3906/zoo-1303-21>.

GÜRELLI, G.; CANBULAT, S.; ALDAYAROV, N.; DEHORITY, B.A. Rumen ciliate protozoa of domestic sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra aegagrus hircus*) in Kyrgyzstan. **FEMS Microbiology Letters**, 363, 6, fnw028, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw028>.

GÜRELLI, G.; DAW, A. F. O. E. Endosymbiotic Ciliated Protozoan Biota of Dromedary Camels and Domestic Cattle in Tunisia. **Zootaxa**, 4859(3), 409–418, 2020 <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4859.3.6>.

GÜRELLI, G., MOHAMED, A.R.A. Comparative Study of Rumen Ciliate Fauna of Goat and Sheep in Libya. **Türkiye Parazit Derg**, 45(4), 274–280, 2021. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.39974>.

HASSANIN, A.; DOUZERY, E. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 13, 227–243, 1999a. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0619>.

HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. The rumen microbial ecosystem. Second Edition, **Springer**, New York, USA, 1997. 740 p.

HSIUNG T.S. A general survey of the protozoan fauna of the Chinese cattle. **Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology**, 3, 87–107, 1932.

HUNGATE, R.E. The rumen and its microbes. New York, **Academic Press**, 1966. 533 p.

ITO, A.; IMAI, S.; MANDA, M.; OGIMOTO, K. Rumen ciliates of Tokara Native Goat in Kagoshima, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, 57(2), 355–357, 1995. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.355>.

- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary bands in the rumen ophryoscolecid ciliate *Ostracodinium gracile* (Dogiel, 1925), observed by light microscopy. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 45(6), 628–636, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb04559.x>.
- ITO, A.; MIYAZAKI, Y.; IMAI, S. Light microscopic observations of infraciliature and morphogenesis in six species of rumen *Ostracodinium* ciliates. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 48(4), 440–448, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00177.x>.
- ITO, A.; IMAI, S. Infraciliary band pattern of rumen Ophryoscolecid ciliates. **Endocytobiosis and Cell Research**, 17, 103–110, 2006.
- IMAI, S.; KATSUNO, M.; OGIMOTO, M. Distribution of Rumen Ciliate Protozoa in Cattle, Sheep and Goat and Experimental Transfaunation of Them. **Japan Journal of Zootech Science**, 49(7), 494–505, 1978. <https://doi.org/10.2508/chikusan.49.494>.
- IMAI, S. Four new rumen ciliates, *Entodinium ogimotoi* sp. n., *E. bubalum* sp. n., *E. fujitai* sp. n. and *E.tsunodai* sp. n. and *Oligoisotricha bubali* (Dogiel, 1928) n. comb. **Japanese Journal of Veterinary Science**, 43, 201–209, 1981. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.43.201>.
- IMAI, S. New rumen ciliates, *Polymorphella bovis* sp. n. and *Entodinium longinucleatum* forma *spinolobum* f. n., from the Zebu cattle in Thailand. **Japanese Journal of Veterinary Science**, 46, 391–395, 1984. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.46.391>.
- IMAI, S. Ciliate protozoa in the rumen of Kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with the description of four new species. **Journal of Protozoology**, 35, 130–136, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1988.tb04092.x>.
- IMAI, S.; HAN, S. S.; CHENG, K. J.; KUDO, H. Composition of the rumen ciliate population in experimental herds of cattle and sheep in Lethbridge, Alberta, Western Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, 35(7), 686–690, 1989. <https://doi.org/10.1139/m89-112>.
- KOFOID, C.A.; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos Indicus* Linn. I. the genus *Entodinium* Stein. **University of California (Berkeley) Publications of Zoology**, 33, 471–544, 1930.
- KOFOID, C.A.; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn III. *Epidinium crawley*, *Epiplastron* gen.nov., and *Ophryoscolex* Stein. **University of California Publications in Zoology**, 39, 1–34, 1933.
- KOFOID, C.A.; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn II. The genus *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, 37, 53–152, 1932.
- KITTELMANN, S.; DEVENTE, S. R.; KIRK, M. R.; SEEDORF, H.; DEHORITY, B. A.; JANSSEN, P. H. Phylogeny of intestinal ciliates, including *Charonina ventriculi*, and comparison of microscopy and 18S rRNA gene pyrosequencing for rumen ciliate community structure analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, 81(7), 2433–2444, 2015. <https://doi.org/10.1128/AEM.03697-14>.
- LANGDA, S.; ZHANG, C.; ZHANG, K.; GUI, B.; JI, D.; DEJI, C.; CUOJI, A.; WANG, X.; WU, Y. Diversity and Composition of Rumen Bacteria, Fungi, and Protozoa in Goats and Sheep

Living in the Same High-Altitude Pasture. **Animals**, 10 (2), 186, 2020
<https://doi.org/10.3390/ani10020186>.

LALUEZA-FOX, C.; SHAPIRO, B.; BOVER, P.; ALCOVER, J.A.; BERTRANPETIT, J. Molecular phylogeny and evolution of the extinct bovid *Myotragus balearicus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 25, 501–510, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00290-7](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00290-7).

LEE, H. I, 1979. Studies on Microorganisms in Rumen of Ruminants-2. Basic Studies on Ciliate Protozoa in Rumen of Korean Native Goats. **Journal of the Korean Veterinary Medical Association**, 15(8), 459–461, 1979.

LYNN, D.H, 2008. The Ciliated Protozoa. Characterization, classification, and guide to the literature. Ontario: **Springer**, 2008. 605 p.

LUBINSKY, G. On some parasites of parasitic protozoa I, *Sphaerita hoari* sp. n-achitrip Parasitizing *Eremoplastron bovis*. **Canadian Journal of Zoology**, 1(6), 440–450, 1955
<https://doi.org/10.1139/m55-055>.

LUBINSKY, G. Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha)I. A new species of *Entodinium* with "caudatum," "lobosospinosum," and "dubardi" forms, and some evolutionary trends in the genus *Entodinium*. **Canadian Journal of Zoology**, 35(1), 111–133, 1957. <https://doi.org/10.1139/z57-007>.

MARTINELE, I.; SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V.; D'AGOSTO, M. Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante e com dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 9(1), 748, 2008.

MARTINELE, I.; SANTOS, G. R. A.; MATOS, D. S.; BATISTA, A. M. V.; D'AGOSTO, M. Diet botanical composition and rumen protozoa of sheep in Brazilian Semi-Arid area. **Archivos de zootecnia**, 59 (226), 169-175, 2010.

MCKINNON, D.; ROCHA, A. Reproduction, mortality and growth of indigenous sheep and goats in Mozambique. In: Wilson R.T.& Bourzat D (ed), Small ruminants in African Agriculture. **Proceedings of a Conference held at ILCA**, Addis Abbaba, 154–163, 1985.

MACIEL, S. First Nacional report on the status of farm animal genetic resources in Mozambique. Ministério de Agricultura e desenvolvimento rural, **Instituto de Produção Animal**, 2004.

MAYÉN-ESTRADA, R.; DIAS,R.J.P.; RAMÍREZ-BALLESTEROS, M.; ROSSI, M.; REYES-SANTOS, M.; DURÁN-RAMÍREZ, C.A.; CRUZ-JIMÉNEZ, G. Plankton Communities. Ciliates as Symbionts. Chapter, 2021. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.99341>.

MERMER, A.; RASTEGELDI, S.; ERGEN, G.; GOÇMEN, B. Occurrence of the Rumen Ciliate, *Elytroplastron bubali* (Dogiel,1928) in Turkish Domestic Goats (*Capra hircus*).**Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 27 (4), 270–272, 2003.

MERMER, A.; GÖÇMEN, B.; ÇIÇEK, K.; ERGEN, G.; SEZGIN, Y.; YILDIZ, M.Z. Morphometric Variations of the Rumen Ciliate, *Ophryoscolex purkynjei* Stein, 1858 (Ciliophora:

Entodiniomorphida) from Cypriot Domestic Goats. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 30 (3), 252–257, 2006.

MEALE, S. J.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; BERENDS, H.; GUAN, L. L.; STEELE, M. A. From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, 100, 5984–5995, 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12474>.

MIZRAHI, I. Rumen Symbioses. In: Rosenberg, E., DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds), The Prokaryotes-Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations. Berlin Heidelberg., **Springer-Verlag**, 533–544, 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0_1.

MISHIMA, T.; KATAMOTO, H.; HORII, Y.; KAKENGI, V.A.M.; ITO, A. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle *Bos taurus indicus*, and the infraciliature of *Entodinium palmare* n.sp. and *Enoploplastron stoky* (Buisson, 1924). **European Journal of Protistology**, 45, 77–86, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2008.07.002>.

MUIR, J. P.; JORDÃO, C.; MASSAETE, E. S. Comparative growth characteristics of goats tethered on native pasture and free-ranged on cultivated pasture. **Small Ruminant Research**, 17(2), 111–116, 1995. [https://10.1016/0921-4488\(95\)00653-3](https://10.1016/0921-4488(95)00653-3).

MOHAMED, A.R.A. Libya'da bulunan keçilerin (*Capra aegagrus hircus* Linnaeus, 1758) işkembe siliyat (protista: ciliophora) faunasi. Thesis, **Kastamonu University Institute of Science**, 2017. 36pp. <http://earsiv.kastamonu.edu.tr:8080/xmlui/handle/123456789/591>.

NAKAMURA, I.; OGIMOTO, K.; IMAI, S.; NAKAMURA, N. Production of lactic acid isomers and change of microbial features in the rumen of feedlot cattle. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 61, 139–144, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1989.tb00093.x>.

NEWBOLD, C.J.; RAMOS-MORALES, E. Review: Ruminant microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. **Animal**, 14, s78–s86, 2020. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003252>.

NOWAK, R.M. Walker's Mammals of the World. **John Hopkins University Press**, Baltimore., 1991. 815p.

NOGUEIRA FILHO, O.M.E.M.; VEIGA, J.S.M.; LUCCI, C.S. Observações pertinentes à instalação da fauna de protozoários ciliados no rúmen de bezeros de raça Holandesa (*Bos taurus*, L.), criados em Pindamonhangaba, S.P. Brasil. **Revista Da Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia Da Universidade De São Paulo**, 20 (2), 177 – 182, 1983. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v20i2p177-182>.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; DE OLIVEIRA, M. E. M.; SOUZA ABLAS, D. D. S.; TITTO, E. A. L.; DE TOLEDO, L. R. A.; DE OLIVEIRA, T. S. B. M. Rumen ciliated fauna of zebu and water buffaloes at Pirassununga, southeast of Brazil. **Acta Scientiarum**, 22 (3), 663–668, 2000.

OGIMOTO, K., IMAI, S. Atlas of Rumen Microbiology. **Japan Scientific Societies**, 1981. 231p.

RASTGELDI, S.; GÖÇMEN, B.; ÖZBEL, Y. Türkiye evcil keçilerinde (*Capra hircus* L.) iskembe siliyatları, *Diplodinium crista-galli* ve *Diplodinium flabellum*'un (Entodiniomorpha) bulunusu. **Acta Parasitologica Turcica**, 27, 331–336, 2003.

RASTGELDI S.; GÖÇMEN, B. Türkiye'de dağilis gösteren evcil keçilerin (*Capra hircus* L.) iskembesinde yaşayan *Polyplastron multivesiculatum* (Ciliophora: Protista) hakkında. **Acta Parasitologica Turcica**, 27,71–74, 2003.

ROPIQUET, A.; HASSANIN A. Molecular phylogeny of caprines (Bovidae, Antilopinae): the question of their origin and diversification during the Miocene. **Journal of Zoological Systematics**, 43(1), 49–60, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2004.00290.x>.

ROSSI, M. F.; CEDROLA, F.; DIAS, R. J. P.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. Improved silver carbonate impregnation for rumen ciliate protozoa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 17, 33–40, 2016.

ROSSI, M.F. Evolução da biologia ruminal: diversificação de mamíferos herbívoros ruminantes, protistas ciliados simbioses e arcabouço enzimático. Thesis, **Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Centro de Ciências da Saúde**, 2017. 152pp.

SANTRA, A.; KARIM, S.A.; MISHRA, A.S.; CHATURVEDI, O.H.; PRASAD, R. Rumen ciliate protozoa and fibre utilization in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, 30(1), 13–18, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(98\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(98)00078-9).

SAUTIER, D. Projecto de Apoio ao Registo de uma Indicação Geográfica Piloto em Moçambique, o Cabrito de Tete. **Agricultural Research for Development**, 2017. 34p.

SIMPSON, G.G. The principles of classification and a classification of mammals. **Bulletin of American Museum of Natural History**, 85 (I–XVI), 1–350, 1945. [https://doi.org/10.1016/S09214488\(98\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S09214488(98)00078-9).

SILVA, Z. R. J.; CEDROLA, F.; ROSSI, M. F.; COSTA, F. D. S.; DIAS, R. J. P. Rumen ciliates (Alveolata, Ciliophora) associated with goats: checklist, geographic distribution, host specificity, phylogeny and molecular dating. **Zootaxa**, 5165(2), 191–216, 2022 <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5165.2.3>.

SELIM, H.M.; IMAI, S.; YAMATO, O.; EL KABBANY, A.; KIROLOSS, E.; MAEDA, Y. Comparative study of rumen ciliates in buffalo, cattle and sheep in Egypt. **Journal of Veterinary Medical Science**, 58(8), 799–801, 1996. <https://doi.org/10.1292/jvms.58.799>.

SELIM, H. M.; IMAI, S.; EL SHEIK, A.; OKAMOTO, E.; MIYAGAWA, E.; MAEDE, Y. Rumen ciliate protozoal fauna of native sheep, Friesian cattle and dromedary camel in Libya. **Journal of Veterinary Medical Science**, 61(3), 303–305, 1999. <https://doi.org/10.1292/jvms.61.303> .

SYLVESTER, J.T.; KARNATI, S.K.R.; YU, Z.; MORRISON, M.; FIRKINS, J.L. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. **Journal of Nutrition**, 134, 3378–3384, 2004. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3378>.

TALARI, S. A.; ARBABI, M.; TALARI, M.R. Ciliates of the Rumen of Domestic Ruminants in Kashan. **Archives of Razi Institute**, 57, 121–126, 2004.

VAN DER WATH, J.G.; MYBURGH, S.J. ‘Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. VI. The role of infusoria in ruminal digestion with some remarks on ruminal bacteria’. **Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, 17, 61–85, 1941. <http://hdl.handle.net/2263/59139>.

VĎAČNÝ P. Evolutionary associations of endosymbiotic ciliates shed light on the timing of the marsupial-placental split. **Molecular Biology and Evolution**, 35(7), 1757–1769, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy071>.

VĎAČNÝ, P.; ÉRSEKOVÁ, E.; ŠOLTYS, K.; BUDIŠ, J.; PECINA, L.; RURIK, I. Co-existence of multiple bacterivorous clevelandellid ciliate species in hindgut of woodfeeding cockroaches in light of their prokaryotic consortium. **Scientific Reports**, 8(1), 1–13, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36245-y>.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The Rumen Protozoa. **Springer**, New York, 1992. 442p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2>.

WILKINSON, R.C.; VAN HOVEN, W. Rumen ciliate fauna of the springbok (*Antidorcas marsupialis*) in southern Africa. **African Zoology**, 11, 1–22, 1976.

YEOMAN, C. J.; ISHAQ, S.L.; BICHI, E.; OLIVO, S.K.; LOWE, J.; ALDRIDGE, B.M. Biogeographical Differences in the Influence of Maternal Microbial Sources on the Early Successional Development of the Bovine Neonatal Gastrointestinal Tract. **Scientific Reports**, 8 (1), 1–14, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21440-8>

5 CAPÍTULO 3

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE REPRESENTANTES DE CILIADOS (ALVEOLTA, CILIOPHORA) DO RÚMEN DE MAMÍFEROS HERBÍVOROS UTILIZANDO NOVAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS-rDNA

5.1 RESUMO

A região ITS1-5.8S-ITS2-rDNA têm sido usado como marcador molecular complementar ao 18S-rDNA, tanto para estudos de sistemática molecular, quanto para delimitação de espécies e variabilidade intraespecíficas para ciliados do rúmen. No presente estudo, foram comparados dois marcadores moleculares (ITS e 18S-rDNA) para reconstrução filogenética das mesmas espécies de ciliados endossimbiontes de mamíferos herbívoros, bem como produzidas onze sequências inéditas de ITS-rDNA para algumas espécies. As análises filogenéticas foram estimadas usando três conjuntos de dados genéticos (datasets) diferentes: sequências de ITS, sequências de 18S-rDNA e um conjunto de dados concatenados (ITS e 18S). A Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana foram utilizadas para a inferência filogenética entre as espécies. Não houve diferenças significativas no conjunto de dados analisados entre as topologias recuperadas com dados de ITS em relação aos dados de 18S, sugerindo que a região ITS possa ser um bom marcador para inferências filogenéticas desse grupo de microrganismos. Os valores de suporte recuperados nas análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana para dataset concatenado (ITS e 18S) foram mais elevados que àqueles recuperados nas topologias usando os marcadores separadamente, o que sugere relativa vantagem em se utilizar ambos marcadores concatenados para esses ciliados, ampliando a acurácia das topologias e relações evolutivas.

Palavras-chave: Ciliados do rúmen, 18S-rDNA, ITS1-5.8S-ITS2, filogenia molecular, ruminantes.

5.2 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, a identificação, delimitação de espécies e sistemática dos ciliados endossimbiontes de mamíferos herbívoros tiveram seu alicerce no conhecimento da morfologia desses microrganismos, usando características, como por exemplo, a infraciliatura oral e vestibular, bandas ciliares e os padrões de infraciliatura, número de vacúolos contráteis, número e

morfologia de placas esqueléticas e aparato nuclear (CORLISS, 1979; GAO et al., 2017). Entretanto, nos últimos vinte anos houve amplo uso de ferramentas moleculares com intuito de ampliar a acurácia da delimitação das espécies do grupo, bem como do conhecimento sobre as relações evolutivas (ZHANG et al., 2014; GENTEKAKI et al., 2014; WANG et al., 2015; ROSSI et al., 2015; CHEN et al., 2015; 2016; GAO et al., 2017; CEDROLA et al., 2017, CEDROLA et al., 2022).

Os ciliados do rúmen são divididos em duas ordens dentro da subclasse Trichostomatia Bütschli, 1889, a ordem Vestibuliferida Puytorac et al. 1974 e a ordem Entodiniomorphida Reichenow, in Doflein & Reichenow, 1929 (SMALL; LYNN, 1985; WRIGHT et al., 1997 STRÜDER-KYPKE et al., 2007), cujas espécies são descritas no trato digestivo de vários vertebrados, sendo que a maioria dos membros pertencentes a ordem Entodiniomorphida que habitam no rúmen ou intestino grosso de pequenos e grandes mamíferos herbívoros (IMAI, 1998).

Visto a alta diversidade de espécies para este grupo e pelo proporcionalmente baixo número de sequências e marcadores disponíveis, estudos sobre as relações filogenéticas para ciliados endossimbiontes de mamíferos herbívoros são necessários nos tempos atuais. Este fato pode ser devido às dificuldades técnicas dos processos de obtenção e extração de DNA, e/ou da existência de resultados incongruentes, permitindo que as relações filogenéticas de muitos grupos de ciliados do rúmen permaneçam desconhecidas ou mal resolvidas, incluindo aqueles ciliados que são morfologicamente bem caracterizados (ROSSI et al., 2015; XU et al., 2015; YAN et al., 2015; GAO et al., 2017).

Parte importante dos estudos filogenéticos envolvendo ciliados utiliza sequências com objetivo de analisar a sistemática do grupo (WRIGHT et al., 1997; STRÜDER-KYPKE et al., 2007; VĎAČNÝ et al., 2011 a, b; ROSSI, 2017), propor novas classificações (LI et al., 2022). Os estudos até então realizados com o grupo, utilizando apenas sequências do marcador 18S-rDNA foram úteis em resolver relações filogenéticas importantes em Trichostomatia, devido ao caráter conservado deste marcador (WRIGHT; LYNN, 1997a; WRIGHT, 1998; VĎAČNÝ et al., 2011b; VĎAČNÝ, 2015; KITTELMANN et al., 2015), entretanto, possuem menor acurácia para elucidar relações evolutivas entre táxons filogeneticamente muito próximos. Assim sendo, faz-se necessária a utilização ou o teste de outros marcadores moleculares mais variáveis que possam ser complementares nas reconstruções filogenéticas envolvendo os tricostomatídeos. Estes fatos,

contribuem para que alguns estudos apresentem conclusões não concordantes com os fatos morfológicos (ITO et al., 2010; LI et al., 2022), embora haja trabalhos que corroborem as propostas evolutivas baseadas em dados morfológicos (KARNATI et al., 2003; CAMERON; O'DONOGUE, 2004; VD'ACNY et al., 2011 a, b).

Para além disso, assume-se que a região dos espaçadores internos da pequena subunidade ribossômica ITS1-5.8S-ITS2 é um marcador molecular complementar para inferir a filogenia de Ciliophora (GONG et al., 2010; SUN et al., 2010; YI; SONG, 2011; FERNANDES et al., 2015), embora as filogenias inferidas usando esse marcador sejam diferentes daquelas obtidas com 18S-rDNA (WRIGHT AND LYNN, 1997a,b; WRIGHT et al., 1997 STRÜDER-KYPKE et al., 2007, CAMERON et al., 2001; CAMERON et al., 2003; CAMERON; O'DONOGHUE., 2004). Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram: comparar dois marcadores moleculares (ITS e 18S-rDNA) para reconstrução filogenética das espécies de ciliados endossimbiontes de mamíferos herbívoros e produzir sequências de ITS-rDNA para algumas espécies de ciliados do rúmen.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 AMOSTRAS E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Com intuito de isolar espécies de ciliados do rúmen foram obtidas amostras de conteúdo ruminal de bovinos da F1 Holstein × Gir fistulados e mantidos na empresa EMBRAPA Gado de Leite, Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brazil (para detalhes ver CEDROLA et al., 2017). Para análises moleculares, as amostras do conteúdo ruminal (20 cm³) foram fixadas em etanol 100% (CEDROLA et al., 2015). Para a identificação das espécies, as amostras ruminais foram fixadas em formalina 18.5% (v/v) (DEHORITY, 1984) e a identificação realizada com base em atlas (OGIMOTO; IMAI, 1981), artigos originais de descrições de espécies e listas taxonômicas a partir de artigos de revisão e caracterização morfológica de ciliados do rúmen (DOGIEL, 1927; KOFOID; MACLENNAN, 1930; HSIUNG, 1932; KOFOID; MACLENNAN, 1932; 1933; IMAI, 1981; IMAI, 1984; DEHORITY, 1986a, b; WILLIAMS; COLEMAN, 1992; GÖÇMEN, 1999a, b, c; GRAIN, 1994; GÖÇMEN et al., 2001a, b, c; GÖÇMEN; ATATÜR, 2002; GÖÇMEN et al., 2002; RASTGELDI; GÖÇMEN, 2003; RASTGELDI et al., 2003; GÖÇMEN; RASTGELDI, 2004).

5.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO

As extrações de DNA foram realizadas a partir de um pool de ciliados da mesma espécie fixados em etanol 100% utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen Biotechnology Brazil Ltd., São Paulo, SP, Brasil), seguindo o protocolo para extração de tecidos animais. A amostra de DNA foi amplificada em uma única rodada da reação da PCR, utilizando-se os primers para região ITS-rDNA da subclasse Trichostomatia Bütschli, 1889, B5R (5'- ATA TGC TTA AGT TCA GCG GG- 3'), segundo PONCE-GORDO et al. (2008) e 1412F (5'- CTA CCG ATA CCG GGT GAT CCG - 3') desenhado no presente estudo, segundo metodologia descrita em CEDROLA et al. (2017). O ciclo da PCR consistiu em: 1 etapa a 94 °C por 4 min; 35 ciclos a 94 °C por 1min, 50 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; e 1 etapa a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram purificados usando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Biotec hnology Brazil Ltd., São Paulo, SP, Brasil) e sequenciados, utilizando os primers B5R e 1412F.

5.3.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As análises filogenéticas foram estimadas a partir de três datasets diferentes. O primeiro deles, *datasetITS* foi elaborado unicamente com sequências da região ITS obtidas no presente trabalho (sequências de consenso) (n=11); o segundo, *dataset18S* foi elaborado com sequências do gene 18S-rDNA obtidas do banco de dados GenBank (NCBI) (n=14). O terceiro *datasetconcatenado* foi obtido por meio da concatenação dos dois *datasets* anteriores. Depois da inspeção manual das sequências obtidas no presente trabalho (ITS), as regiões de natureza ambígua e sequências de primers foram removidas do alinhamento que foi posteriormente trimado, produzindo-se um conjunto de dados de dataset com ~ 550 pares de bases.

Como critérios de curadoria do banco de dados GenBank, somente foram selecionadas sequências de 18S aquelas com maiores de 1.430 pb e de organismos identificados a nível específico. Três sequências (*Bantidium coli*, *Neobalantidium coli* e *Buxtonella-like*), foram escolhidas como grupo externo para todos datasets.

As sequências do *datasetITS* foram alinhadas no programa MAFFT v.7.0 (KATO et al., 2019) e inspecionadas visualmente usando o software SeaView v.7.5.8 (GOUY et al., 2009). Os sítios pobremente alinhados foram removidos usando o software online Gblocks v. 0.91b (CASTRESANA, 2000), permitindo a obtenção de uma matriz com 468 pares de bases. Os

métodos foram repetidos para o *dataset18S*, permitindo a obtenção de uma matriz com 1476 pares de bases.

Os dois alinhamentos oriundos dos conjuntos de dados, *datasetITS* e *dataset18S*, foram concatenados no software SeaView v.7.5.8 (GOUY et al., 2009), obtendo-se o terceiro dataset, *datasetconcatenado*, com uma matriz de 1942 pares de bases. Estas três matrizes curadas foram usadas para inferência filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) por meio de software RAxML v.8.2.4 (STAMATAKIS, 2014). O modelo de substituição de nucleotídeos para os três datasets, GTR + G + I foi escolhido como o melhor modelo pelo software JmodelTest v.2.1.4 (DARRIBA et al., 2012) implementado na Plataforma MEGAX v.10.0.5 (KUMAR et al., 2018). O suporte dos ramos foi estimado usando o critério de convergência de bootstrap no software RAxML v.8.2.4 (STAMATAKIS, 2014), com 1000, 700 e 1000 pseudoréplicas para o *datasetITS*, *dataset18S* e *datasetconcatenado*, respectivamente. A análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada usando o programa MrBayes in XSEDE v.3.2.6 (RONQUIST et al., 2012) após um milhão de gerações em duas simulações simultâneas e independentes de Markov *Chain Monte Carlo* com três cadeias quentes e uma fria. Todas as árvores restantes depois do *burn-in* de 25% foram utilizadas para o cálculo das probabilidades posteriores por meio da regra de maior consenso.

5.4 RESULTADOS

Todas topologias filogenéticas resultantes dos três datasets, *datasetITS*, *dataset18S* e *datasetconcatenado*, recuperaram as duas ordens principais dos ciliados do rúmen, Entodiniomorphida Reichenow, in Doflein & Reichenow, 1929 e Vestibuliferida Puytorac et al.1974, com elevados valores de suporte 95/99, 92/99 e 99/100 (ML/IB) (Figura 1).

O grupo irmão formado pelas espécies *Polyplastron multivessiculatum* e *Elytroplastron bubali* foi recuperado nas três topologias inferidas, *datasetITS*, *dataset18S* e *datasetconcatenado*, com valores de suporte de 100ML e 100IB.

A espécie *Troglodytella abrassarti* ficou recuperada como grupo irmão de *Diplodinium polygonale* (85ML/91IB) na topologia com *datasetITS*, e este clado, ficou posicionado como grupo irmão do clado que agrupa todos outros representantes da família Ophryoscolecidae. Porém, nas topologias com *dataset18S* e *datasetconcatenado*, essa relação não foi observada. Nas

topologias concatenado e 18S, a espécie *Troglodytela abrassarti* foi posicionada como grupo irmão de todos os representantes da família Ophryoscolecidae (92ML/99IB) (Figura 1B).

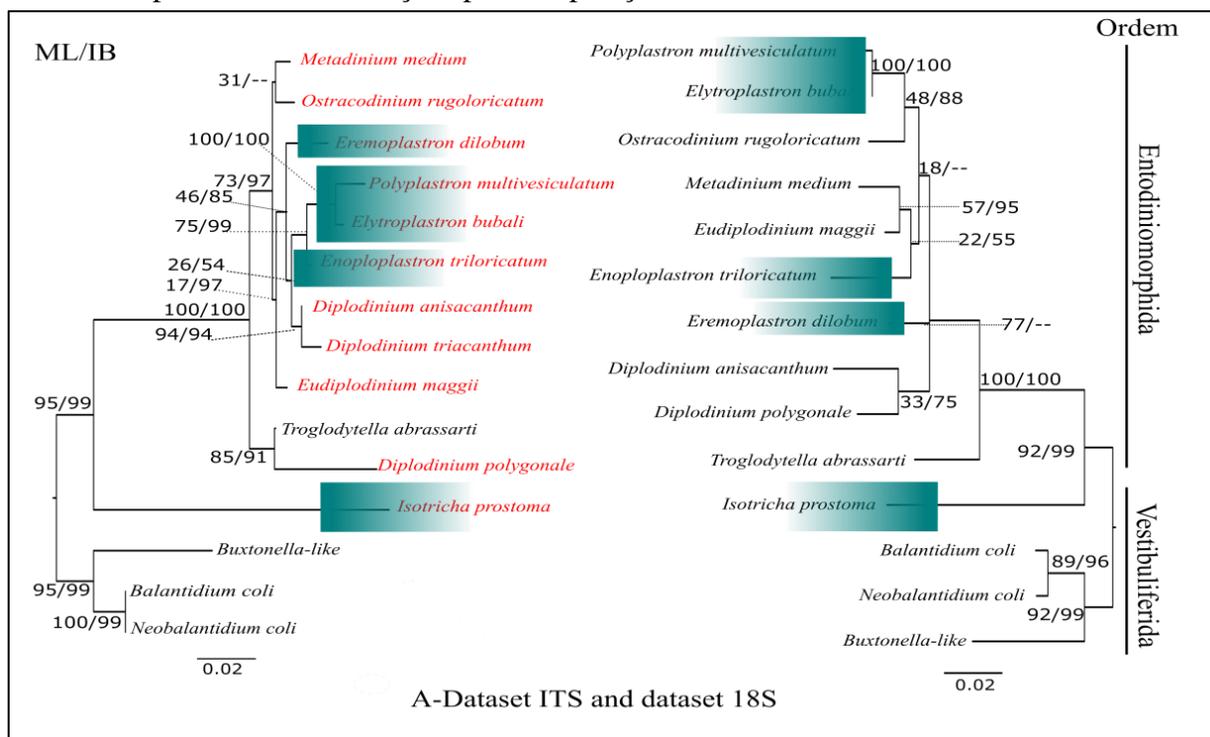
Depois da raiz (árvore com *datasetITS*), ocorre a separação entre as ordens Entodiniomorphida e Vestibuliferida (95/99) (Figura 1A). Dentre os ramos internos da ordem Entodiniomorphida, a espécie *Diplodinium anisacanthum* foi recuperada como grupo irmão da espécie *Diplodinium triacanthum* (94ML/94IB), a espécie *Polyplastron multivesiculatum* grupo irmão de *Elytroplastron bubali* (100ML/100IB). Porém, o ramo constituído pelas espécies *Metadinium medium* e *Ostracodinium rugoloricatum* foi pobremente suportado com 31% de bootstrap para ML (Figura 1A).

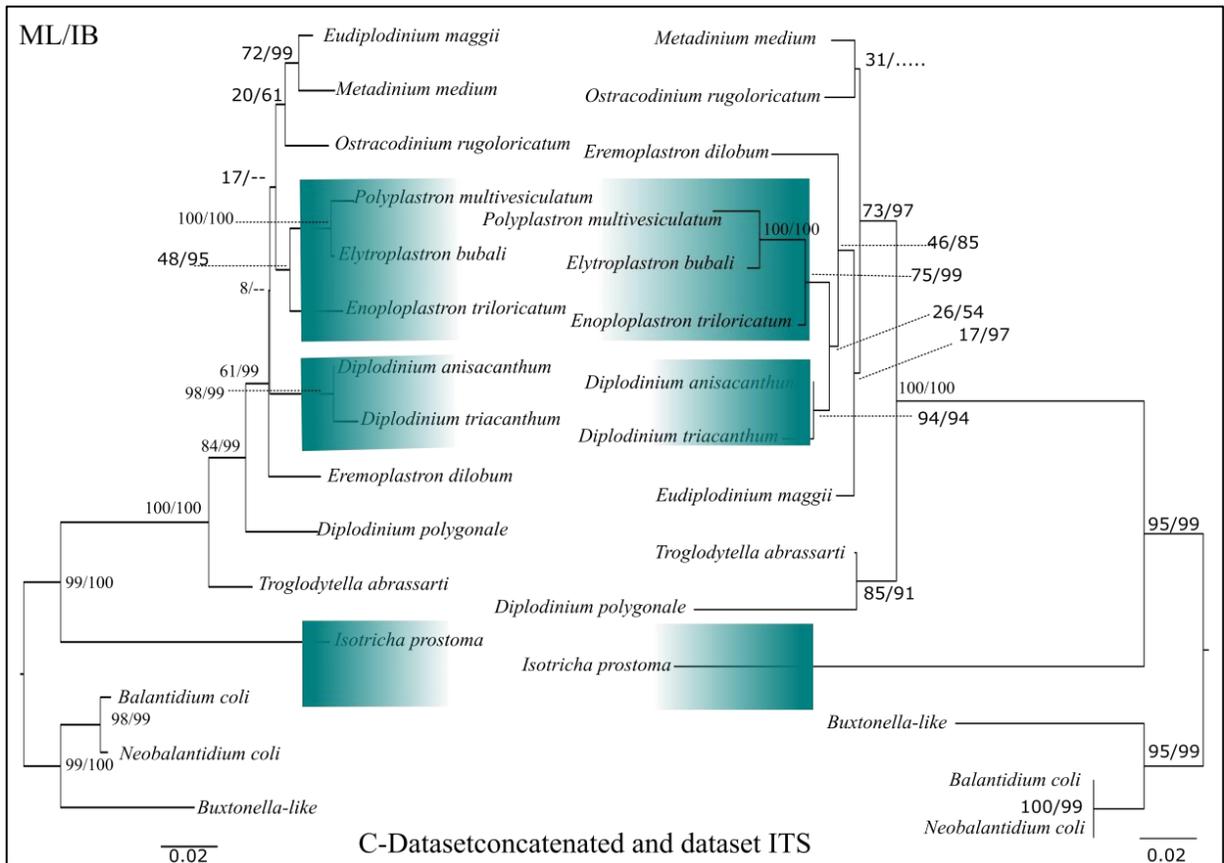
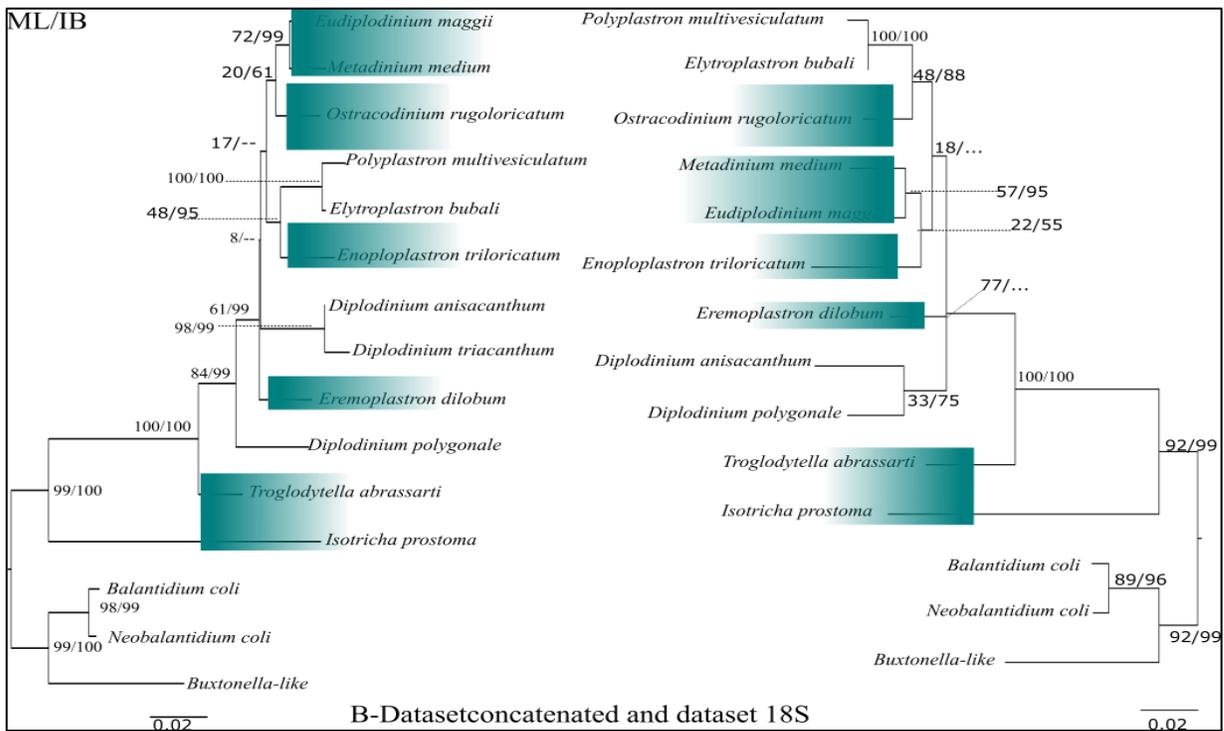
Para topologia recuperada com *dataset18S*, o ramo que separa a espécie *Troglodytela abrassarti* das espécies da família Ophryoscolecidae foi bem suportado com 100% para ML e 100 de probabilidade posterior para IB. A espécie *Metadinium medium* foi recuperada como grupo irmão da espécie *Eudiplodinium maggii* (57ML/95IB) e a espécie *Polyplastron multivesiculatum* recuperada como grupo irmão da espécie *Elytroplastron bubali* (100ML/100IB). O ramo menos suportado nesta topologia, *dataset18S*, foi constituído pelas espécies *Diplodinium anisacanthum* e *Diplodinium polygonale* (33ML/77IB) (Figura 1 A e B).

Das análises feitas com o *datasetconcatenado*, resultou que esta topologia ficou mais parecida da topologia inferida a partir do *dataset18S*, porém, notou-se uma melhora nos valores de suporte da topologia resultante da concatenação das sequências, principalmente os valores de probabilidades posteriores resultantes da inferência bayesiana, variando entre 95 a 100, exceto um clado que forma o ramo com a espécie *Ostracodinium rugoloricatum* (20ML/61IB) (Figura 1 B). Nesta topologia, *datasetconcatenado*, a espécie *Eudiplodinium maggii* ficou recuperada como grupo irmão da espécie *Metadinium medium* (72ML/99IB), a espécie *Diplodinium anisacanthum* grupo irmão de *Diplodinium triacanthum* (98ML/99IB) e a espécie *Polyplastron multivessiculatum* recuperada como grupo irmão da espécie *Elytroplastron bubali* (100ML/100IB) (Figura 1B e C).

Ainda nesta topologia, *datasetconcatenado*, o clado formado pelas espécies *Eudiplodinium maggii* e *Metadinium medium* foi concordante com a topologia *dataset18S*, e o clado formado pelas espécies *Diplodinium anisacanthum* e *Diplodinium triacanthum*, foi concordante com a topologia *datasetITS* (Figura 1B e C).

Figura 1. Árvores filogenéticas obtidas por máxima verossimilhança e inferência bayesiana revelando relações evolutivas de representantes de espécies de ciliados do rúmen, utilizando sequências da região ITS, gene 18S rDNA e concatenadas (A, B e C). *Bantidium coli*, *Neobalantidium coli* e *Buxtonella*-like foram escolhidos como grupo externo. Os números em cada nó das árvores representam: valores de máxima verossimilhança (ML) bootstrap e inferência bayesiana (IB) probabilidade posterior. As espécies em vermelho representam as novas sequências obtidas neste trabalho. A cor azul nas topologias *datasetITS* e *dataset18S*, *datasetconcatenado* e *dataset18S*, *datasetconcatenado* e *datasetITS*, representa os clados concordantes. A barra de escala representa 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos.





Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

5.5 DISCUSSÃO

A região ITS é um dos marcadores mais frequentemente utilizados em análises filogenéticas em nível de gênero e espécie para eucariotos (COLEMAN, 2003). Apesar disso, esta região, ITS, tem sido aplicada em apenas um número comparativamente inferior de estudos para resolução de alguns problemas filogenéticos em nível de gênero e espécie em ciliados, por exemplo para ciliados que vivem no intestino (PONCE-GORDO et al., 2011), que habitam ecossistemas dulcícolas e estuarinos (WEISSE et al., 2008; YI et al., 2008; SUN et al., 2010; SANTOFERRARA et al., 2015 SHAZIB et al., 2016), sendo raros para aquelas que habitam o ecossistema ruminal (VAN HOEK et al., 1998). Apesar disso, a taxa de mudanças evolutivas desta região é mais de 100 vezes maior que a do gene 18S-rRNA, tornando ainda esta região do ITS um dos marcadores mais usados em estudos filogenéticos (GOLDMAN et al., 1983; SCHULTZ; WOLF, 2009; WIEMERS et al., 2009; YOUNG; COLEMAN, 2004), pelas suas vantagens na melhoria da qualidade das reconstruções filogenéticas em nível de espécie (COLEMAN, 2003; KELLER et al., 2010; WOLF, 2015; SHAZIB et al., 2016).

Normalmente, as árvores filogenéticas de ITS1-5.8S-ITS2 não diferem significativamente das árvores inferidas a partir do gene 18S rRNA (SHAZIB et al., 2016) (Figura 1 A), sugerindo que a região ITS pode ser complementar para análises filogenéticas (VĎAČNÝ et al., 2012; BOSCARO et al., 2014; VĎAČNÝ, RAJTER, 2015; RAJTER; VĎAČNÝ, 2016; SHAZIB et al., 2016). No entanto, as filogenias com a região ITS e as filogenias do gene 18S rRNA podem entrar em conflito assim como acontece com as classificações moleculares e morfológicas que podem demonstrar algumas situações conflitantes (SHAZIB et al., 2016).

Aproximadamente 250 espécies de ciliados do rúmen já foram descritas em vários ruminantes (WILLIAMS; COLEMAN, 1992; CEDROLA et al., 2022), e as mesmas, são divididas em duas ordens dentro da subclasse Trichostomatia, Vestibuliferida Puytorac et al. 1974 e Entodiniomorphida Reichenow, in Doflein & Reichenow, 1929 (SMALL; LYNN, 1985, ROSSI et al., 2015, CEDROLA et al., 2020). Considerando os estudos moleculares com gene 18S-rDNA alguns autores (CAMERON et al., 2001;2003; CAMERON; O'DONOGHUE, 2004; STRÜDER-KYPKE et al., 2007; WRIGHT; LYNN, 1997a,b; WRIGHT et al., 1997; ITO et al., 2010; ROSSI et al., 2015; CEDROLA et al., 2018; 2020; 2022; DA SILVA et al., 2022) já estudaram relações de algumas dessas espécies.

No presente estudo, quinze sequências de espécies de ciliados do rúmen incluindo as utilizadas para compor o grupo externo, foram analisadas para inferir a topologia com marcador ITS e quatorze sequências de espécies para topologia com gene 18S-rRNA. A espécie *Diplodinium triacanthum* não foi incorporada no dataset 18S devido a falta de sequências desta espécie nos bancos de dados, o que mostra a necessidade de sequenciar novas espécies do marcador ITS para melhorar as relações evolutivas entre as espécies próximas bem como diminuir a ausência de dados da concatenada. Destas análises, máxima verossimilhança e inferência bayesiana, foram todas congruentes/concordantes ao recuperar as duas subdivisões dos ciliados do rúmen em nível de ordem, Entodiniomorpha Reichenow, in Doflein & Reichenow, 1929 e Vestibuliferida Puytorac et al. 1974 (Figura 1 A, B e C). Para este grupo de ciliados do rúmen, os dados morfológicos e moleculares suportam a existência de três subfamílias monofiléticas (Entodiniinae, Diplodiniinae e Ophryoscolecinae) dentro da família Ophryoscolecidae (ROSSI et al., 2015). A monofilia de Ophryoscolecidae tem sido demonstrado por autores do nosso grupo de pesquisa (ROSSI et al., 2015; CEDROLA et al., 2017, 2021, 2022; DA SILVA et al., 2022), sendo corroborado no presente estudo para os três grupos de datasets, utilizando 18S, ITS e concatenado, embora a filogenia interna incluindo as subfamílias permaneça ainda por compreender.

Nas ordens recuperadas, as espécies dentro delas formam grupos merofiléticos, apesar das raízes das ordens apresentarem valores de suporte bem altos para ITS (95ML/99IB) 18S (92ML/99IB), e para topologia com *dataseconcatenado* (99ML/100IB) (Figura 1 A, B e C), confirmando que as árvores filogenéticas inferidas com marcadores ITS não diferem de forma gigantesca das árvores inferidas a partir do gene 18S rRNA (SHAZIB et al., 2016). A não monofilia verificada dentro das ordens dos ciliados do rúmen, pode não constituir um achado duvidoso porque outros autores como (ITO et al., 2014), já demonstraram a falta de monofilia entre as ordens de ciliados do rúmen independente do marcador molecular.

Ainda na nossa análise, a topologia com *datasetITS*, recuperou a espécie *Troglodytella abrossarti* como grupo irmão de *Diplodinium polygonale*, e este clado, ficou posicionado como grupo irmão do clado que agrupa todos outros representantes da família Ophryoscolecidae, porém, nas topologias com *dataset18S* e *datasetconcatenado*, essa relação variou. Nessas outras topologias, *dataset18S* e *datasetconcatenado*, a espécie *Troglodytella abrossarti* foi posicionada como grupo irmão de todos os representantes da família Ophryoscolecidae. Apesar desta

variação, alguns clados recuperados na topologia com *datasetITS*, foram concordantes com a topologia recuperada utilizando *dataseconcatenado* (Figura 1 C). Este resultado demonstra que a topologia recuperada a partir da região ITS não varia muito em relação a topologia recuperada com gene 18S e quando concatenadas demonstram resultados com clados apresentando valores de suporte altos (Figura 1B e C), confirmando que a região ITS pode ser complementar e aumentar a confiabilidade para análises filogenéticas com representantes de ciliados (GONG et al., 2010; SUN et al., 2010; YI; SONG, 2011; VĚAČNÝ et al., 2012; BOSCARO et al., 2014; VĚAČNÝ, RAJTER, 2015; FERNANDES et al., 2015; RAJTER ; VĚAČNÝ, 2016; SHAZIB et al., 2016).

O gênero *Diplodinium* foi recuperado como parafilético na topologia inferida utilizando a região ITS e na topologia inferida com *datasetconcatenado* (Figura 1A e C). Este resultado, pode sugerir a necessidade de utilização de mais sequências e marcadores para uma avaliação adequada. ROSSI et al. (2015), observaram que a subfamília Diplodiniinae era pouco suportada em análises com o 18S e mais recentemente, CEDROLA et al. (2022), num estudo referente a percepções sobre a sistemática da família Ophryoscolecidae deixam claro de que as relações internas dentro de Diplodiniinae permanecem ainda pobremente compreendidas.

Se comparados os valores de suporte entre as topologias com *datasetITS*, *dataset18S* e *datasetconcatenado*, a topologia inferida com *datasetconcatenado*, recuperou valores de suporte consideravelmente maiores (Figura 1 B e C). E se comparado esta topologia, *datasetconcatenado*, com as topologias recuperadas nos trabalhos anteriores do nosso grupo utilizando o gene 18S (CEDROLA et al., 2017; DA SILVA et al., 2022; CEDROLA et al., 2022), houve uma ligeira melhora nos valores de suporte da topologia com *datasetconcatenado* em alguns clados formados pelas espécies *Polyplastron multivesiculatum* e *Elytroplastron bubali*, *Eudiplodinium maggii* e *Metadinium medium*, incluindo o ramo que forma a família Isotrichidae, por exemplo. Isto sugere que a topologia com *datasetconcatenado* pode ser uma alternativa em uma amostragem suficiente para inferir as relações filogenéticas entre os taxons de ciliados do rúmen. Porém, mais estudos que utilizem um número consideravelmente maior de sequências e marcadores são necessários para que a compreensão dessas relações e contribuições sejam mais fortes e adequadas.

5.6 CONCLUSÕES

De acordo com as análises realizadas neste capítulo, a utilização do marcador ITS para inferir as relações de representantes dos ciliados do rúmen, mostrou não existirem diferenças gigantescas quando comparadas as topologias com *datasetITS* e *dataset18S*, sugerindo que esta região ITS, pode ser complementar para analisar as relações filogenéticas de representantes de ciliados do rúmen. Ainda neste estudo, chegamos a conclusão de que a utilização do *datasetconcatenado* pode maximizar e ser uma alternativa para inferir as relações entre as espécies de ciliados do rúmen em uma amostragem suficientemente maior de sequências, havendo potenciais ganhos na melhoria da acurácia das topologias.

REFERÊNCIAS

- BOSCARO, V.; CARDUCCI, D.; BARBIERI, G.; SENRA, M.V.X.; ANDREOLI, I.; ERRA, F.; PETRONI, G.; VERNI, F.; FOKIN, S.I. Focusing on genera to improve species identification: Revised systematics of the ciliate *Spirostomum*. **Protist**, 165, 527–541. 2014. <https://doi/10.1016/j.protis.2014.05.004>
- COLEMAN, A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics**, 19, 370–375. 2003. [https://doi/10.1016/S0168-9525\(03\)00118-5](https://doi/10.1016/S0168-9525(03)00118-5)
- CASTRESANA, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. **Molecular Biology and Evolution**, 17 (4), 540–552, 2000. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- CAMERON, S.L.; ADLARD, R.D.; O'DONOGHUE, P.J. Evidence for an independent radiation of endosymbiotic litostome ciliates within Australian marsupial herbivores. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 20,302–310, 2001.
- CAMERON, S.L.; WRIGHT, A.G.; O'DONOGHUE, P.J. An expanded phylogeny of the Entodiniomorpha (Ciliophora: Litostomatea). **Acta Protozoologica**, 42, 1–6, 2003.
- CAMERON, S. L.; O'DONOGHUE, P. J. Phylogeny and biogeography of the “Australian” trichostomes (Ciliophora: Litostomata). **Protist**, 155(2), 215–235, 2004.
- CEDROLA, F.; ROSSI, M.; ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS, R.J.P.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. **Zoological Science**, 32: 8–15. 2015.
- CEDROLA, F.; DIAS, R. J. P.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. Description of *Diploplastron dehorityi* sp.nov. (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae), a new rumen ciliate from Brazilian sheep. **Zootaxa**, 4258, 581–585, 2017. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4258.6.8>
- CEDROLA, F.; ROSSI, M. F.; MARTINELE, I.; D'AGOSTO, M. A. R. T. A.; DIAS, R. J. P. Morphology and description of infraciliary bands pattern in four *Metadinium* Awerinzew and Mutafova, 1914 species (Ciliophora, Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) with taxonomic notes on the genus. **Zootaxa**, 4500(4), 574-580. 2018
- CEDROLA, F.; SENRA, M. V. X.; ROSSI, M. F.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. J. P. Trichostomatid ciliates (Alveolata, Ciliophora, Trichostomatia) systematics and diversity: Past, present, and future. **Frontiers in Microbiology**, 10, 2967, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02967>
- CEDROLA, F.; SENRA, M. V. X.; FREGULIA, P.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. J. P. Insights into the systematics of the family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorpha). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, e12915. 2022. <https://doi.org/10.1111/jeu.12915>
- CHEN, X.; MA, H.; AL-RASHEID, K.A.S.; MIAO, M. Molecular data suggests the ciliate *Mesodinium* (Protista:Ciliophora) might represent an undescribed taxon at class level. **Zoological and Systematic**, 40,31–40. 2015.

- CHEN, X.; PAN, H.B.; HUANG, J.; WARREN, A.; AL-FARRAJ, S.A.; GAO, S. New considerations on the phylogeny of cyrtophorian ciliates (Protozoa, Ciliophora): expanded sampling to understand their evolutionary relationships. **Zoologica Scripta**, 45, 334–348. 2016.
- DA SILVA, Z. R. J.; CEDROLA, F.; ROSSI, M. F.; COSTA, F. D. S.; DIAS, R. J. P. Rumen ciliates (Alveolata, Ciliophora) associated with goats: checklist, geographic distribution, host specificity, phylogeny and molecular dating. **Zootaxa**, 5165(2), 191–216. 2022.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModel-test 2: more models, new heuristic and parallel computing. **Nature Methods**, 9:772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- DOGIEL, V.A. Monographie der familie Ophryoscolecidae. **Archiv für Protistenkunde**, 59, 1–288. 1927.
- DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, 48: 182–185, 1984.
- DEHORITY, B.A. Protozoa of the digestive tract of herbivorous mammals. **International Journal of Tropical Insect Science**, 7, 279–296. 1986a
- DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of some Brazilian cattle: occurrence of several ciliates new to the rumen including the cycloposthid *Parentodinium africanum*. **Journal of Protozoology**, 33, 416–421. 1986b.
- FERNANDES, N. M.; DA SILVA PAIVA, T.; DA SILVA-NETO, I. D.; SCHLEGEL, M.; SCHRAGO, C. G. Expanded phylogenetic analyses of the class Heterotrichea (Ciliophora, Postciliodesmatophora) using five molecular markers and morphological data. **Molecular phylogenetics and evolution**, 95, 229–246. 2015.
- GAO, F.; HUANG, J.; ZHAO, Y.; LI, L.; LIU, W.; MIAO, M.; ZHANG, Q.; LI, J.; YI, Z.; EL-SEREHY, H.A.; WARREN, A.; SONG, W. Systematic studies on ciliates (Alveolata, Ciliophora) in China: progress and achievements based on molecular information. **European Journal of Protistology**, 61, 409–423. 2017.
- GENTEKAKI, E.; KOLISKO, M.; BOSCARO, V.; BRIGHT, K. J.; DINI, F.; DIGIUSEPPE, G.; GONG, Y.; MICELI, C.; MODEO, L.; MOLESTINA, R. E.; PETRONI, G.; PUCCIARELLI, S.; ROGER, A. J.; STROM, S. L.; LYNN, D. H. Large-scale phylogenomic analysis reveals the phylogenetic position of the problematic taxon *Protocruzia* and unravels the deep phylogenetic affinities of the ciliate line ages. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 78, 36–42. 2014.
- GONG, Y.; XU, K.; ZHAN, Z.; YU, Y.; LI, X.; VILLALOBO, E.; FENG, W. Alpha-tubulin and small subunit rRNA phylogenies of peritrichs are congruent and do not support the clustering of mobilids and sessilids (Ciliophora, Oligohymenophorea). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 57, 265–272. 2010.
- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. Sea View version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, 27(2), 221–224, 2009. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>

- GOLDMAN, W.E.; GOLDBERG, G.; BOWMAN, L.H.; STEINMETZ, D.; SCHLESSINGER, D. Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. **Molecular and Cellular Biology**, 3, 1488–1500. 1983. <https://doi/10.1128/MCB.3.8.1488>
- GRAIN, J. Infusoires ciliés (ordre des Entodiniomorphida). In: Grasse, P. (Ed.). **Traité de Zoologie**, Paris, pp. 327–364. 1994.
- GÖÇMEN, B.; RASTGELDI, S. A new rumen ciliate from Turkish domestic goat (*Capra hircus* L.): *Entodinium salmani* n. sp. (Entodiniidae, Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, 28, 295–299. 2004. <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol28/iss4/3>.
- GÖÇMEN, B.; ATATÜR, M.K. Some rumen ciliates (Isotrichidae, Trichostomatida; Epidininae, Ophryoscolecidae) of the domestic goat (*Capra hircus* L.) from Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 26, 15–26. 2002.
- GÖÇMEN, B.; DEHORITY, B.A.; RASTGELDI, S. The occurrence of the rumen ciliate *Metadinium banksi* Dehority, 1985 (Ophryoscolecidae, Entodiniomorphida) from domestic goats (*Capra hircus* L.) in southeastern Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 26, 367–370. 2002.
- GÖÇMEN, B.; FALAKALI MUTAF, B.; TOSUNOĞLU, M. New rumen ciliates from Turkish domestic cattle (*Bos taurus* L.): 3. *Eudiplodinium dehorityi* n. sp. **Acta Parasitologica Turcica**, 25, 305–307. 2001a.
- GÖÇMEN, B.; TOSUNOĞLU, M.; MUTAF, B.F. New rumen ciliates from Turkish domestic cattle (*Bos taurus* L.): 3. *Entodinium oektamae* n. sp. and *Entodinium imaii* n. sp. (Entodiniidae, Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, 25 (3), 269–274. 2001b.
- GÖÇMEN, B.; DEHORITY, B.A.; TALU, G.H.; RASTGELDI, S. The Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep (*Ovis ammon aries*) from the Turkish Republic of Northern Cyprus. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 48, 455–459. 2001c.
- GÖÇMEN, B. *Ophryoscolex* Stein, 1858 (Protozoa: Ciliophora: Entodiniomorphida) cinsi hakkında morfolojik ve taksonomik araştırmalar. Doğa - **Turkish Journal of Zoology**, 23, 397–427. 1999a.
- GÖÇMEN, B. *Epidinium* Crawley, 1923 (Protozoa: Ciliophora: Entodiniomorphida) cinsi hakkında morfolojik ve taksonomik araştırmalar. Doğa - **Turkish Journal of Zoology**, 23, 429–463. 1999b.
- GÖÇMEN, B. New rumen ciliates from Turkish domestic cattle (*Bos taurus* L.): II. *Epidinium graini* n.sp. (Ophryoscolecidae, Entodiniomorphida). **Turkish Journal of Zoology**, 24, 23–31. 1999c.
- HSIUNG T.S. A general survey of the protozoan fauna of the Chinese cattle. Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology, 3, 87–107. 1932.
- IMAI, S. Four new rumen ciliates, *Entodinium ogimotoi* sp. n., *E. bubalum* sp. n., *E. fujitai* sp. n. and *E. tsunodai* sp. n. and *Oligoisotricha bubali* (Dogiel, 1928) n. comb. **Japanese Journal of Veterinary Science**, 43, 201–209. 1981. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.43.201>.

IMAI, S. New rumen ciliates, *Polymorphella bovis* sp. n. and *Entodinium longinucleatum* forma *spinolobum* f. n., from the Zebu cattle in Thailand. **Japanese Journal of Veterinary Science**, 46, 391–395. 1984. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.46.391>.

IMAI, S. Phylogenetic taxonomy of rumen ciliate protozoa based on their morphology and distribution. **Journal of Applied Animal Research**, 13(1-2), 17–36. 1998.

ITO, A.; HONMA, H.; GÜRELLI, G.; GÖCMEN, B.; MISHIMA, T.; NAKAI, Y.; IMAI, S. Redescription of phylogenetic position based on the infraciliary bands and 18SSU rRNA gene sequence. **European Journal of Protistology**, 46(3), 180–188, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2010.01.005>.

ITO, A.; ISHIHARA, M.; IMAI, S. *Bozasella gracilis* n. sp. (Ciliophora, Entodiniomorpha) from Asian elephant and phylogenetic analysis of entodiniomorphids and vestibuliferids. **European Journal of Protistology**, 50, 134–152. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2014.01.003>

KATO, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings of Bioinformatics**, 20(4), 1160–1166, 2019. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.

KARNATI, S. K. R., YU, Z., SYLVESTER, J. T., DEHORITY, B. A., MORRISON, M., FIRKINS, J. L. Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. **Journal of animal science**, 81(3), 812–815. 2003.

KELLER, A.; FÖRSTER, F.; MÜLLER, T.; DANDEKAR, T.; SCHULTZ, J.; WOLF, M. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. **Biology Direct**, 5, 1–12. 2010. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-4>

KITTELMANN, S.; DEVENTE, S. R.; KIRK, M. R.; SEEDORF, H.; DEHORITY, B. A.; JANSSEN, P. H. Phylogeny of intestinal ciliates, including *Charonina ventriculi*, and comparison of microscopy and 18S rRNA gene pyrosequencing for rumen ciliate community structure analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, 81(7), 2433–2444. 2015.

KOFOID, C.A.; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn III. *Epidinium* crawley, *Epiplastron* gen.nov., and *Ophryoscolex* Stein. **University of California Publications in Zoology**, 39, 1–34. 1933.

KOFOID, C.A.; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn II. The genus *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, 37, 53–152. 1932.

KOFOID, C.A., MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos Indicus* Linn. I. the genus *Entodinium* Stein. **University of California (Berkeley) Publications of Zoology**, 33, 471–544. 1930

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology Evolution**, 35(6), 1547–1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

LI, Z.; WANG, X.; ZHANG, Y.; YU, Z.; ZHANG, T.; DAI, X.; PAN, X.; JING, R.; YAN, Y.; LIU, Y.; GAO, S.; LI, F.; HUANG, Y.; TIAN, J.; YAO, J.; XING, X.P.; SHI, T.; NING, J.;

- YAO, B.; HUANG, H.; JIANG, Y. Genomic insights into the phylogeny and biomass-degrading enzymes of rumen ciliates. **bioRxiv**, 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.01.05.474053>
- OGIMOTO, K.; IMAI, S. Atlas of Rumen Microbiology. **Japan Scientific Societies**, 231pp, 1981.
- PONCE-GORDO, F.; JIMENEZ-RUIZ, E.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. Tentative identification of the species of *Balantidium* from ostriches (*Struthio camelus*) as *Balantidium coli*-like by analysis of polymorphic DNA. **Veterinary parasitology**, 157(1-2), 41–49. 2008
- PONCE-GORDO, F.; FONSECA-SALAMANCA, F.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.A. Genetic heterogeneity in internal transcribed spacer genes of *Balantidium coli* (Litostomatea, Ciliophora). **Protist**, 162, 774–794. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.06.008>
- RASTGELDI, S.; GÖÇMEN, B.; ÖZBEL, Y. Türkiye evcil keçilerinde (*Capra hircus* L.) iskembe siliyatları, *Diplodinium crista-galli* ve *Diplodinium flabellum'un* (Entodiniomorpha) bulunusu. **Acta Parasitologica Turcica**, 27, 331–336. 2003.
- RASTGELDI S.; GÖÇMEN, B. Türkiye'de dađilis gösteren evcil keçilerin (*Capra hircus* L.) iskembesinde yasayan *Polyplastron multivesiculatum* (Ciliophora: Protista) hakkında. **Acta Parasitologica Turcica**, 27, 71–74. 2003.
- RAJTER, L.; VĎAČNÝ, P. Rapid radiation, gradual extinction and parallel evolution challenge generic classification of spathidiid ciliates (Protista, Ciliophora). **Zoologica Scripta**, 45, 200–223. 2016. <https://doi.org/10.1111/zsc.12143>
- ROSSI, M.F.; DIAS, R.J.P.; SENRA, M.V.X.; MARTINELE, I.; CARLOS A. G. SOARES, C.A.G.; D'AGOSTO, M. Molecular Phylogeny of the Family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Litostomatea) Inferred from 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 62, 584–590, 2015. <https://doi.org/10.1111/jeu.12211>
- ROSSI, M.F. Evolução da biologia ruminal: diversificação de mamíferos herbívoros ruminantes, protistas ciliados simbioses e arcabouço enzimático. Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, **Centro de Ciências da Saúde**, 2017. 152pp.
- SANTOFERRARA, L.F.; TIAN, M.; ALDER, V. A.; MCMANUS, G.B. Discrimination of closely related species in tintinnid ciliates: New insights on crypticity and polymorphism in the genus *Helicostomella*. **Protist**, 166, 78–92. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.11.005>
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of Large phylogenies. **Bioinformatics**, 30 (9), 1312–1313, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- STRÜDER-KYPKE, M. C.; KORNILOVA, O. A.; LYNN, D. H. Phylogeny of trichostome ciliates (Ciliophora, Litostomatea) endosymbiotic in the Yakut horse (*Equus caballus*). **European Journal of Protistology**, 43.4: 319–328. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2007.06.005>
- SMALL, E.B.; LYNN, D. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In Illustrated Guide to the Protozoa. **Society of Protozoologists**, Kansas, 393–575. 1985.

SHAZIB, S. U. A.; VĎAČNÝ, P.; KIM, J. H.; JANG, S. W.; SHIN, M. K. Molecular phylogeny and species delimitation within the ciliate genus *Spirostomum* (Ciliophora, Postciliodesmatophora, Heterotrichea), using the internal transcribed spacer region. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 102, 128–144. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.04>

SUN, P.; CLAMP, J.C.; XU, D. Analysis of the secondary structure of ITS transcripts in peritrich ciliates (Ciliophora, Oligohymenophorea): Implications for structural evolution and phylogenetic reconstruction. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 56, 242–251. 2010.

SCHULTZ, J., WOLF, M. ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 52, 520–523. 2009.

VAN HOEK, A. H.; VAN ALEN, T. A.; SPRAKEL, V. S.; HACKSTEIN, J. H.; VOGELS, G. D. Evolution of anaerobic ciliates from the gastrointestinal tract: phylogenetic analysis of the ribosomal repeat from *Nyctotherus ovalis* and its relatives. **Molecular Biology and Evolution**, 15(9), 1195–1206. 1998. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026027>

VĎAČNÝ, P.; ORSI, W.; BOURLAND, W. A.; SHIMANO, S.; EPSTEIN, S. S.; FOISSNER, W. Morphological and molecular phylogeny of dileptid and tracheliid ciliates: Resolution at the base of the class Litostomatea (Ciliophora, Rhynchostomatia). **European Journal of Protistology**, 47(4), 295–313. 2011a. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2011.04.006>

VĎAČNÝ, P.; BOURLAND, W. A.; ORSI, W.; EPSTEIN, S. S.; FOISSNER, W. Phylogeny and classification of the Litostomatea (Protista, Ciliophora), with emphasis on free-living taxa and the 18S rRNA gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 59(2), 510–522. 2011b. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.02.016>

VĎAČNÝ, P. Estimation of divergence times in litostomatean ciliates (Ciliophora: Intramacronucleata), using Bayesian relaxed clock and 18S rRNA gene. **European Journal of Protistology**, 51(4), 321–334. 2015.

VĎAČNÝ, P.; BOURLAND, W.A.; ORSI, W.; EPSTEIN, S.S.; FOISSNER, W. Genealogical analyses of multiple loci of litostomatean ciliates (Protista, Ciliophora, Litostomatea). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 65, 397–411. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.06.024>

VĎAČNÝ, P.; RAJTER, L. Reconciling morphological and molecular classification of predatory ciliates: Evolutionary taxonomy of dileptids (Ciliophora, Litostomatea, Rhynchostomatia). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 90, 112–128. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.04.023>

WANG, P.; GAO, F.; HUANG, J.; STRÜDER-KYPKE, M.; YI, Z. A case study to estimate the applicability of secondary structures of SSU-rRNA gene in taxonomy and phylogenetic analyses of ciliates. **Zoologica Scripta**, 44, 574–585. 2015.

WEISSE, T.; STRÜDER-KYPKE, M.C.; BERGER, H.; FOISSNER, W. Genetic, morphological, and ecological diversity of spatially separated clones of *Meseres corlissi* Petz & Foissner, 1992 (Ciliophora, Spirotrichea). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 55, 257–270. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00330.x>

WRIGHT, A. D. G.; DEHORITY, B. A.; LYNN, D. H. Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorphida) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 44(1), 61–67. 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05693.x>

WRIGHT, A.-D.G.; LYNN, D.H. Monophyly of the trichostome ciliates (Phylum Ciliophora: class Litostomatea) tested using new 18S rRNA sequences from the vestibuliferids, *Isotricha intestinalis* and *Dasytricha ruminantium*, and the haptorian, *Didinium nasutum*. **European Journal of Protistology**, 33, 305–315. 1997a.

WRIGHT, A.-D.G.; LYNN, D.H. Phylogenetic analysis of the rumen ciliate family Ophryoscolecidae based on 18S ribosomal RNA sequences, with new sequences from *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, and *Ophryoscolex*. **Canadian Journal of Zoology**, 75, 963–970. 1997b.

WRIGHT, A. D. G. Molecular phylogeny of the endosymbiotic ciliates, Litostomatea: Trichostomata, of vertebrate animals inferred from 18s rRNA gene sequences (**Doctoral dissertation**, University of Guelph), 1998.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The Rumen Protozoa. **Springer**, New York. 1992. 442p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2>.

WIEMERS, M.; KELLER, A.; WOLF, M. ITS2 secondary structure improves phylogenetic estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatus). **BMC Evolutionary Biology**, 9, 300. 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-300>

WOLF, M. ITS so much more. **Trends in Genetics**, 31, 175–176. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.02.005>

XU, Y.; PAN, H.; MIAO, M.; HU, X.; AL-RASHEID, K.A.S.; SONG, W.B. Morphology and phylogeny of two species of *Loxodes* (Ciliophora Karyorelictea), with description of a new subspecies, *Loxodes striatus orientalis* subsp.n. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 62, 206–216. 2015.

YAN, Y.; CHEN, X. M.; CHEN, X. R.; GAO, F.; AL-FARRAJ, S. A.; AL-RASHEID, K.A.S. Morphology and molecular phylogeny of three marine *Condylostoma* species from China, including two new ones (Ciliophora, Heterotrichea). **European Journal of Protistology**, 51, 66–78. 2015.

YI, Z.; SONG, W. Evolution of the order Urostylida (Protozoa, Ciliophora): new hypotheses based on multi-gene information and identification of localized incongruence. **PLoS ONE**, 6, e17471. 2011.

YI, Z.; CHEN, Z.; WARREN, A.; ROBERTS, D.; AL-RASHEID, K.A.S.; MIAO, M.; GAO, S.; SHAO, C.; SONG, W. Molecular phylogeny of *Pseudokeronopsis* (Protozoa, Ciliophora, Urostylida), with reconsideration of three closely related species at inter- and intra-specific levels inferred from the small subunit ribosomal RNA gene and the ITS1-5.8S-ITS2 region sequences. **Journal of Zoology**, 275, 268–275. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00438.x>

YOUNG, I.; COLEMAN, A.W. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: A *Drosophila* example. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 30, 236–242. 2004. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00178-7)

ZHANG, Q.; YI, Z.; FAN, X.; WARREN, A.; GONG, J.; SONG, W.B. Further insights into the phylogeny of two ciliate classes Nassophorea and Prostomatea (Protista, Ciliophora). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 70, 162–170. 2014.

6 CAPÍTULO 4

SUCESSÃO ECOLÓGICA DA COMUNIDADE DE CILIADOS (ALVEOLTA, CILIOPHORA) NO RÚMEN DE BEZERROS MANTIDOS EM CONDIÇÕES TROPICAIS COM DIFERENTES NÍVEIS DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR: UMA ABORDAGEM METAGENÉTICA (18S-rRNA)

6.1 RESUMO

O estabelecimento sucessivo da microbiota em especial os protozoários ciliados no rúmen de bezerros, permanece ainda pouco compreendido. Neste estudo, usou-se o sequenciamento de *amplicon* do gene 18S rRNA para caracterizar o estabelecimento sucessivo de protozoários em especial os protozoários ciliados, de dez bezerros da F1 Holandês x Gir alimentados com silagem de milho e concentrado, em quatro estágios de crescimento: 42 dias, 60 dias, 80 dias e 120 dias de vida. Os animais foram agrupados de acordo com sua classificação de consumo de ração residual (CAR), em eficientes e não eficientes, e o líquido ruminal foi coletado usando um tubo estomacal ligado à uma máquina de vácuo. A análise de diversidade alfa não revelou diferenças significativas na ciliatofauna ruminal entre os estágios de crescimento, porém, entre os animais eficientes e não eficientes revelou diferenças na diversidade. PCoA ressalta que a estrutura da comunidade de eucariotos no rúmen de bezerros foi claramente separada entre grupos por idade e em animais eficientes, há uma maior diversidade de ciliados e uma menor abundância ($R=0.12356$ e $P=0.028$). Reportamos a presença dos gêneros, *Entodinium*, *Polyplastron* e *Isotricha* de ciliados do rúmen em todos estágios de crescimento. Porém, os gêneros *Dasytricha*, *Metadinium* e *Eremoplastron*, foram registrados nos estágios 60 dias e 120 dias de vida dos animais.

Palavras-chaves: Bezerros. Sucessão ecológica. Metagenoma. Ruminantes. Sequenciamento de nova geração. V3-V4 18S-rDNA.

6.2 INTRODUÇÃO

Nos primeiros dias de vida dos ruminantes, os compartimentos gastrointestinais em especial o rúmen é rapidamente colonizado por uma microbiota diversa composta por bactérias, protozoários, archeas metanogênicas, fungos e vírus (O'HARA et al., 2020), e este processo de

colonização, cria alterações anatômicas e mudanças resultantes da fisiologia e funções metabólicas do animal (LI et al., 2011; 2012). Por exemplo, os ácidos graxos voláteis produzidos, são responsáveis pelo tamanho e forma das papilas ruminais, enquanto as paredes do rúmen, por sua vez, fornecem nicho para a colonização da microbiota (LI et al., 2012). E como consequência disso, o desenvolvimento do rúmen vai ser o resultado de uma interação entre esses microrganismos, seus produtos metabólicos, a dieta fornecida, incluindo a influência do hospedeiro (LI et al., 2012).

A dinâmica de estabelecimento da comunidade microbiana no trato gastrointestinal de ruminantes pode ocorrer em três etapas sucessivas: (1) a colonização inicial entre 0-2 dias após o nascimento, resultado de uma combinação de fontes como microbiota vaginal da mãe, da pele, colostro e os microrganismos do ambiente (REY et al., 2014; YEOMAN et al., 2018); (2) estágio de transição entre 3-15 dias durante a transição da alimentação do colostro para o leite e (3) estágio de maturação onde a ingestão de alimentos sólidos aumenta progressivamente (HUWS et al., 2018).

A colonização do rúmen de ruminantes recém nascidos foi estudada pela primeira vez para visualizar bactérias no final da década de 1940 (POUNDEN; HIBBS, 1948; 1949). Mas o conhecimento dos padrões do desenvolvimento microbiano no rúmen foi limitado até a década de 1980 (O'HARA, 2019). Nessa época, Gerard Fonty começou a investigar o estabelecimento da comunidade microbiana do rúmen e foi o primeiro a relatar o aparecimento sequencial da população ruminal ao longo do tempo de vida dos hospedeiros (FONTY et al., 1987; FONTY et al., 1988).

Desde então, houve relatos conflitantes sobre a época de vida dos hospedeiros em que, os protozoários apareciam ou se instalavam no rúmen pela primeira vez, apesar de não existirem dúvidas de que esse processo de instalação ocorria após o nascimento dos animais (CRHA; HOLUB, 1978). No entanto, apesar desses conflitos, relatos do estabelecimento de ciliados no rúmen têm sido publicados (LENGEMANN; ALLEN, 1959; NOGUEIRA FILHO et al., 1983; 1984; QUIGLEY et al., 1985; LI et al., 2012; CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2019), reportando o aparecimento a partir da terceira semana de vida (LATTEUR, 1953), na oitava semana de vida ou mesmo na décima sexta semana de vida dos animais (CONRAD et al., 1958). Porém, outros registraram a presença de ciliados no rúmen com mais tempo de vida dos hospedeiros, aproximadamente 2 à 3 meses (GUO et al., 2020).

Em termos de diversidade de ciliados no rúmen nos primeiros dias de vida dos hospedeiros, algumas espécies já foram encontradas nas primeiras seis semanas, principalmente as do gênero *Entodinium*, sendo que, a colonização dessas espécies varia dependendo da dieta disponibilizada (NOGUEIRA FILHO et al., 1983;1984; ARCURI et al., 2006). Em bezerros por exemplo, é comum a observação do estabelecimento inicial das espécies do gênero *Entodinium*, depois *Diplodinium* e mais tarde, vestibuliferídeos (BRYANT et al., 1958). Em relação a predominância em nível de gênero, *Entodinium* e *Dasytricha* têm sido registrados como gêneros abundantes nas primeiras semanas de vida dos ruminantes (SHIN et al., 2004; LENG et al., 2011; GUO et al., 2020).

Além dos ciliados, algumas observações microscópicas, confirmaram que depois de dois dias de vida dos animais ruminantes, outros microrganismos já colonizam as paredes do rúmen, especialmente as bactérias celulolíticas, bactérias redutoras de sulfato, incluindo algumas arqueias metanogênicas que utilizam hidrogênio no seu metabolismo (ANDERSON et al., 1987; MORVAN et al., 1996; LI et al., 2012). Entre essas bactérias, se destacam as anaeróbicas facultativas, *Streptococcus* e *Enterococcus*, colonizadores precoces do trato gastrointestinal (TGI) de ruminantes e servem para converter o TGI em um ambiente totalmente anaeróbio (ADLERBERTH, WOLD, 2009; JAMI et al., 2013).

O processo de colonização do rúmen foi também investigado com objetivos de verificar as alterações da microbiota ao longo da idade (ANDERSON et al., 1987) e em diferentes dietas oferecidas aos bezerros leiteiros (POUNDEN; HIBBS, 1949; ANDERSON et al., 1987). Porém, até onde sabemos, poucos estudos examinaram a sucessão da microbiota em bezerros leiteiros utilizando ferramentas metagenômicas (LI et al., 2012). Este trabalho de Li e colaboradores, por exemplo, representa a primeira tentativa de documentar a sequência temporal do estabelecimento microbiano no rúmen com ferramentas metagenômicas modernas, o que pode significar de um lado, a necessidade de mais estudos utilizando essas ferramentas para examinar a microbiota, em especial os ciliados. Por outro lado, este tipo de estudo é de importante papel ecológico e fisiológico, na saúde dos animais incluindo na eficiência dos mesmos enquanto adultos. Apesar disso, as pesquisas relacionadas com este assunto, ainda continuam escassas (LATTEUR, 1953; CONRAD et al., 1958; LENGEMANN; ALLEN, 1959; QUIGLEY et al., 1985; LI et al., 2012; CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2019; GUO et al., 2020). Para além disso, muitos desses trabalhos têm por objetivo principal analisar o estabelecimento de procaritos ruminais

(BELANCHE et al., 2010; REY et al., 2014; MALMUTHUGE et al., 2015; DILL-MCFARLAND et al., 2017; WANG et al., 2019; KORINGA et al., 2019), deixado enorme vazio de conhecimento sobre o estabelecimento sucessivo de eucariotos ciliados.

A eficiência alimentar é interpretada como a capacidade de conversão do alimento ingerido em produtos comercializáveis e pode descrever por exemplo, unidades de saída do leite ou carne, por unidade de entrada de alimentos (ALMEIDA et al., 2004). Por proporcionar melhor utilização de alimentos, a seleção de animais mais eficientes reflete em menor produção de esterco, menor emissão de gases de efeito estufa, como o metano e o óxido nitroso, e menor demanda por terras para a implantação de pastagens e lavouras. Portanto, com foco ambiental, o aumento da eficiência alimentar é uma das maneiras de diminuir o impacto causado pela pecuária. Pelo menor uso de recursos, espera-se que animais mais eficientes também sejam mais lucrativos, colaborando com a eficiência produtiva na atividade (GOMES et al., 2012).

Acredita-se que a microbiota do rúmen afeta a eficiência alimentar do hospedeiro, e esse efeito tem sido observado, quando o consumo de ração residual (CAR) é usado como medida da eficiência alimentar (GUAN et al., 2008; VANDEHAAR et al., 2016; AUFFRET et al., 2020, FREGULIA et al., 2022). No entanto, são poucos relatos sobre associação entre a população microbiana ruminal específica e a eficiência alimentar (FREGULIA et al., 2022). E além disso, pouco se sabe sobre aspectos comparativos dessa microbiota em especial protozoários ciliados do rúmen em animais eficientes e não eficientes.

Compreender a composição e sucessão da microbiota do rúmen de animais em desenvolvimento pode representar um passo importante na criação de esforços e medidas para aumentar a eficiência alimentar dos animais enquanto adultos e ainda, descrever a colonização sequencial de ciliados no rúmen pode ajudar a desenhar as estratégias eficientes de intervenção para manipular o processo de colonização dos ciliados no rúmen desde o início de vida dos animais. Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar o estabelecimento sucessivo da comunidade de ciliados no rúmen de bezerros F1 Holandês x Gir, usando o sequenciamento de amplicon das regiões V3 e V4 do marcador 18S-rRNA em quatro estágios ontogenéticos dos bovinos leiteiros, 42 dias, 60 dias, 80 dias e 120 dias; e, caracterizar a comunidade de ciliados em bezerros agrupados em eficientes e não eficientes.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E COLETA DAS AMOSTRAS

Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais deste estudo tiveram aprovação pelo Comitê de Ética da Embrapa Gado de Leite (número: 05/2015) (VER ANEXO K). Os procedimentos experimentais foram conduzidos na fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite - Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil.

O estudo foi realizado como parte de um grande projeto que visava examinar os parâmetros biológicos de bovinos da F1 Holandês x Gir, relacionados à eficiência alimentar. Uma descrição detalhada da composição da dieta, dados de desempenho, cálculo de índices de eficiência alimentar são fornecidos em CABRAL et al. (2020).

Foram utilizados dez animais divididos em dois grupos: cinco animais eficientes ($RFI = 0.2600 \pm 0.05$) outros cinco animais não eficientes ($RFI = 0,3229 \pm 0,17$). Os bezerros foram alojados em baias individuais (2,5 x 1,2 m) com cama feita de tapete de borracha (WingFlex, Kraiburg TPE GmbH & Co., Waldkraiburg, Alemanha). A temperatura média e precipitação durante o período do experimento foram de 22° C e 0,019 mm/dia (Instituto Nacional de Meteorologia [INMET], 2015). A dieta experimental foi formulada para atender as exigências nutricionais dos bezerros seguindo as orientações do NRC Dairy Cattle (National Research Council [NRC], 2001). As concentrações de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) da dieta foram de 437 g/kg e 178 g/kg, respectivamente. A dieta incluiu (base MS) 75% silagem de milho e 25% concentrado (96% farelo de soja e 4% pré-mistura mineral). A quantidade diária ofertada de ração total misturada foi ajustada para permitir 10% de sobras na alimentação, de acordo com o consumo observado no dia anterior.

Em seguida, aproximadamente 20 cm³ do conteúdo ruminal foi coletado usando um tubo estomacal ligado à uma máquina de vácuo. No processo de coleta, o tubo estomacal foi inserido na profundidade adequada (120-250 cm) para atingir a região do rúmen e reduzir a contaminação da saliva. Além disso, descartou-se os primeiros 30 ml de conteúdo ruminal presentes no tubo após a coleta da amostra e lavou-se bem a sonda antes de usá-la para coletar amostras entre o animal anterior e o seguinte. Dos dez animais, cinco eficientes e cinco não eficientes, foram coletadas 40 amostras em quatro períodos de crescimento (42, 60, 80 e 120 dias), quatro amostras deu erro no processamento, uma em eficientes e três em animais não eficientes. As amostras foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80° C para análises posteriores.

6.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA, PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECA E SEQUENCIAMENTO

O DNA total foi extraído de 800 µl de cada amostra de fluido ruminal usando *bead-beating* para lise celular associado ao protocolo de fenol:clorofórmio (adaptado de OLIVEIRA et al., 2007). Em resumo, 800 µl de conteúdo ruminal coletado, foi transferido para um novo tubo e foi lavado com 1mL de tampão de lise (500 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 4% SDS). Subsequentemente, 2 µl RNase foram adicionados às amostras e os tubos foram incubados a 37° C por 15 minutos. Depois, 20µl de proteinase K foram adicionados aos tubos e as células foram lisadas usando um BioSpec Mini Bead-Beater (BioSpec, Bartlesville, OK, USA) a 4.800 rpm por 4 minutos. Os tubos foram incubados a 70°C por 15 minutos. O sobrenadante obtido por cada amostra foi transferido para um novo tubo para a extração subsequente de fenol:clorofórmio. O DNA extraído foi precipitado com acetato de amônio 10M e isopropanol 100% gelado. Após 30 minutos no “freezer”, os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi removido. Álcool 70% gelado foi adicionado às amostras e os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e o conteúdo foi ressuspensionado em 200µl de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA). Todas as amostras foram analisadas usando o NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) e Qubit (Invitrogen Ltd., Paisley,UK), para avaliar com precisão a quantidade e a qualidade do DNA extraído.

O preparo das bibliotecas foi realizado iniciando pela etapa de amplificação, por PCR, da região V3-V4 do gene 18S rRNA de protozoários ciliados, utilizando os primers 316F (5'-Adaptor/GCTTTCGWTGGTAGTGTATT) e 539R (5'-Adaptor/CTTGCCCTCYAATCGTWCT) (SYLVESTER et al., 2004). O sequenciamento foi realizado de forma paired-end na plataforma Illumina HiSeq2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

6.3.3 ANÁLISES DA BIOINFORMÁTICA

Toda análise da bioinformática foi realizada usando o método do DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2) (CALLAHAN et al., 2016). As sequências resultantes do sequenciamento passaram por várias etapas, “demultiplexing”, filtragem de qualidade das sequências, “denoise”, “merge” e remoção de quimeras usando o plug-in DADA2 implementado no R (CALLAHAN et al., 2016). Depois de uma inspeção da qualidade dos gráficos interativos, observamos que o Q-score das bases caiu em torno da posição 180 e, portanto, nossas sequências

foram truncadas em 180 pares de bases. Para isso, o DADA2 foi usado com os parâmetros de comprimento de truncamento de $-p-trunc-len-f$ 180 e $-p-trunc-len-r$ 180. Posteriormente uma tabela com sequências das ASVs foi gerada (CALLAHAN et al., 2016). Para taxonomia, o classificador foi pré-treinado no banco de dados Silva 18S rRNA (versão 138) para protozoários (QUAST et al., 2012), usando o método *fit-classifier-naive-bayes*. Diversidade, análises filogenéticas e produção de figuras foram realizadas com o auxílio de vários pacotes do R (R CORE TEAM, 2019), incluindo phyloseq (MCMURDIE; HOLMEM, 2013), vegan (OKSANEN et al., 2019), DECIPHER (WRIGHT, 2016), phangorn (SCHLIEP, 2011) e ggplot2 (WICKHAM, 2016).

6.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as diferenças de diversidade alfa entre os grupos em relação a riqueza e diversidade, foram calculadas métricas de Chao1 e sobre esses dados realizados ANOVA e teste de Tukey. Para investigar diferenças na estrutura da comunidade, foi realizada a PCoA (distância UNIFRAC ponderado) e PERMANOVA (Adonis test).

6.4 RESULTADOS

6.4.1 DADOS DO SEQUENCIAMENTO

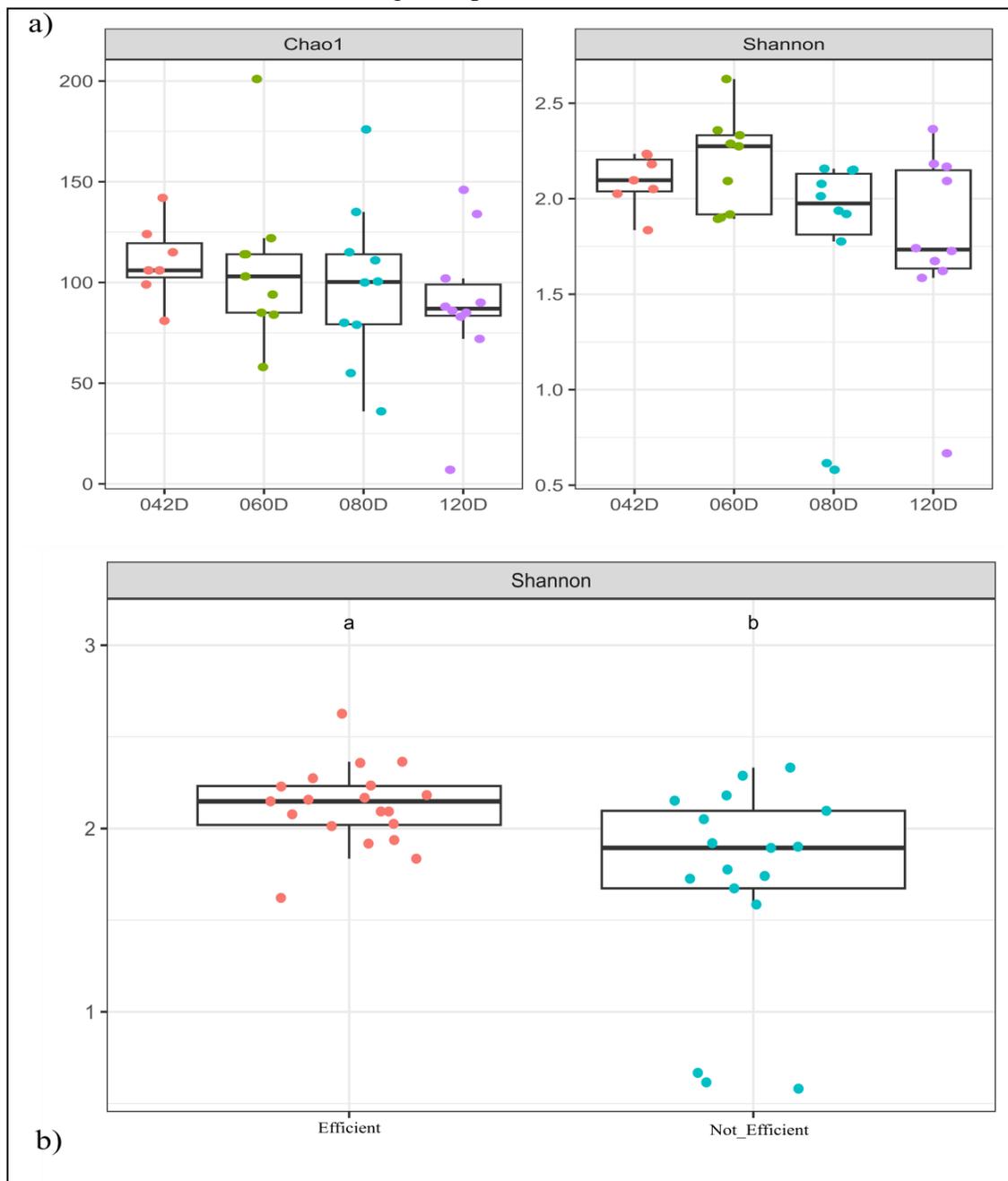
Com intuito de caracterizar a sucessão da comunidade de ciliados do rúmen nos bezerros usando *amplicon* das regiões V3-V4 do marcador 18S-rRNA em quatro estágios de desenvolvimento (42, 60, 90 e 120 dias), obtivemos um total de 6.717.092 milhões de *reads* nas 36 amostras do conteúdo ruminal. Depois do controle de qualidade, 5.934.135 milhões de *reads* prosseguiram nas análises. As coberturas foram superiores a 90%, sugerindo que a profundidade de sequenciamento foi suficiente para caracterizar os ciliados. Um total de 1960 ASVs foram geradas no total de 36 amostras analisadas.

6.4.2 ESTRUTURA DA COMUNIDADE

A estrutura da comunidade foi analisada usando os parâmetros de riqueza (Chao1) e de diversidade (Shannon). Quando comparados os quatro estágios de crescimento dos animais (42, 60, 80 e 120 dias), não houve diferença significativa em nenhuma das métricas (Chao1 e

Shannon) (Figura 1a). Entretanto, em relação aos grupos dos animais eficientes e não eficientes, houve diferença significativa, usando o índice de diversidade de Shannon (Figura 1b).

Figura 1. Métricas de diversidade alfa analisada em quatro estágios de desenvolvimento (42, 60, 80 e 120 dias) dos animais para a comunidade microbiana. a) Riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) nos quatro estágios de crescimento e b) diversidade (Shannon) referentes aos animais divergentes para RFI, eficientes e não eficientes.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

6.4.3 PERFIL TAXONÔMICO

O perfil taxonômico revelou a presença de 11 filos, Apicomplexa, Ascomycota, Basidiomycota, Bicosoecida, Cercozoa, Ciliophora, Desulfobacterota, Dinoflagellata, Gracillipodida, Phragmoplastophyta e Vertebrata, sendo que dentre eles, o filo Ciliophora foi o mais abundante, correspondendo a mais de 90% em todas as amostras (Anexo D).

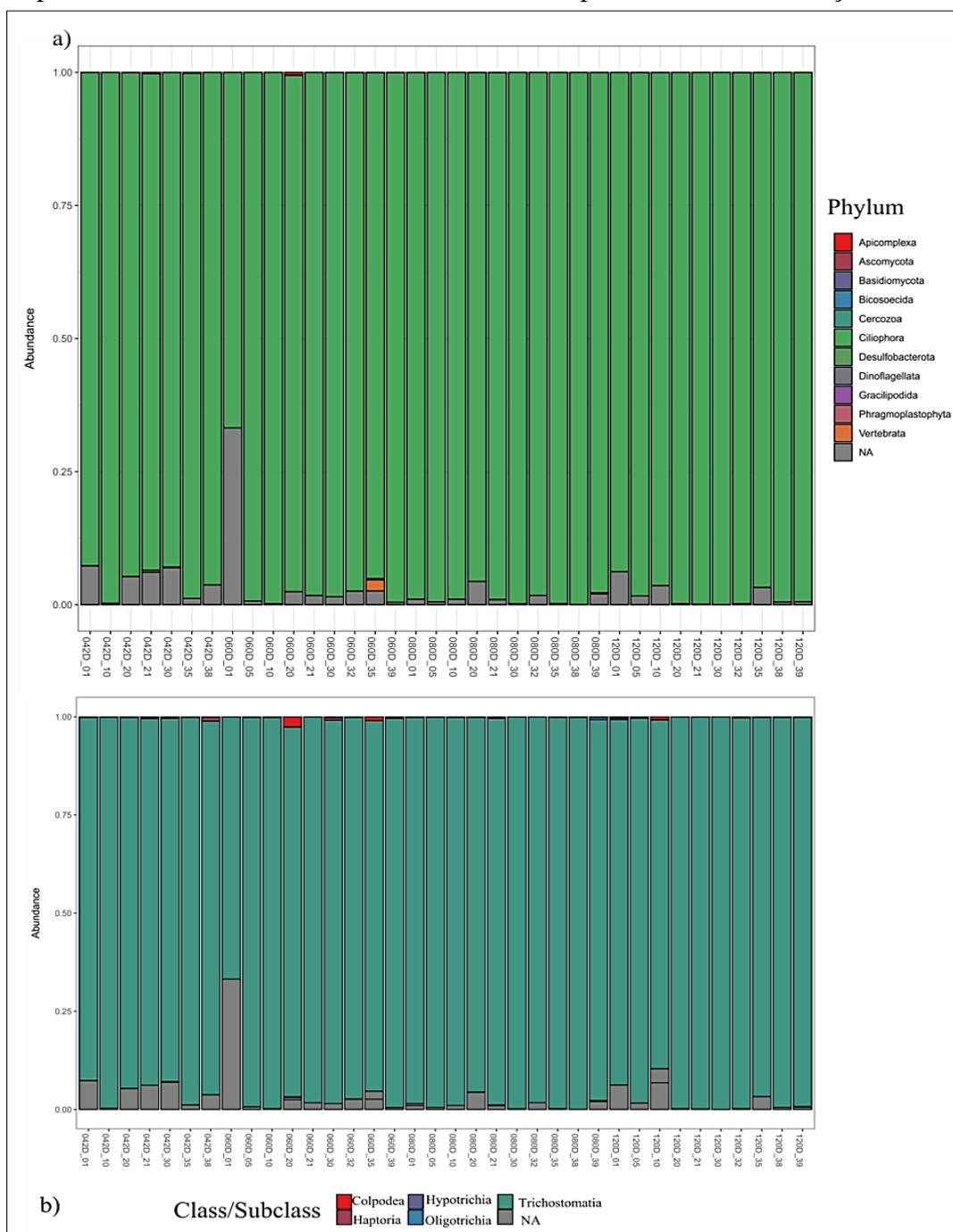
Entre as amostras, constatamos que apenas em uma (no estágio 60 dias), mostrou abundância para o filo Ciliophora fora deste padrão, menos de 90% (Figura 2 a). Para representar melhor o perfil taxonômico, todos os táxons detectados e táxons não classificados (NA), foram incluídos na análise. Para os níveis taxonômicos de classe e subclasse, registrou-se três subclasses, Trichostomatia (Litostomatea), Hypotrichia (Spirotrichea) e Oligotrichia (Spirotrichea), e duas classes, Colpodea e Haptoria. Outros grupos classificados como classes, incluem: Mammalia, Conoidasida, Desulfuromonadia, Eurotiomycetes, Embryophyta, Dothideomycetes, Saccharomyces, Sordariomycetes, Dinophyceae, Choanoflagellida, Malasseziomycetes e Agaricomycetes. O taxon predominante foi a subclasse Trichostomatia, com 96% da abundância (Figura 2 b).

Em nível do gênero, foram registrados 25 gêneros, *Arcuospathidium* (Ciliophora), *Cryptosporidium* (Ciliophora), *Platyophrya* (Ciliophora), *Strombidium* (Ciliophora), *Epiphyllum* (Ciliophora), *Thermomyces* (Fungo), *Bicosoeca* (Bicosoecida), *Amphileptus* (Ciliophora), *Didinium* (Ciliophora), *Coleps* (Ciliophora), *Pelagostrobilidium* (Ciliophora), *Cyrtolophosis* (Ciliophora), *Salpingoeca* (Salpingoecidae), *Protoperidinium* (Ciliophora), *Malassezia* (Fungo), *Telaepolella* (Gracilipodida), *Pelagostrobilidium* (Ciliophora), *Tulasnella* (Fungo), *Cyclospothium* (Ciliophora), *Entodinium* (Ciliophora), *Eremoplastron* (Ciliophora), *Metadinium* (Ciliophora), *Isotricha* (Ciliophora), *Dasytricha* (Ciliophora) e *Polyplastron* (Ciliophora). Dentre os gêneros de ciliados do rúmen, *Entodinium*, *Isotricha* e *Polyplastron* foram registrados em todos estágios de crescimento dos animais com predominância do gênero *Entodinium* (58%), seguido pelo gênero *Polyplastron* (7%) (Figura 3 a, b; Anexos E e F).

Em relação ao registro dos ciliados do rúmen por cada estágio, constatou-se que, no primeiro estágio, 42 dias, foram registrados os gêneros *Entodinium*, *Polyplastron* e *Isotricha*; no estágio 60 dias, *Entodinium*, *Polyplastron*, *Isotricha*, *Metadinium*, *Dasytricha* e *Eremoplastron*; no estágio 80 dias foram registrados os seguintes gêneros: *Entodinium*, *Polyplastron* e *Isotricha*;

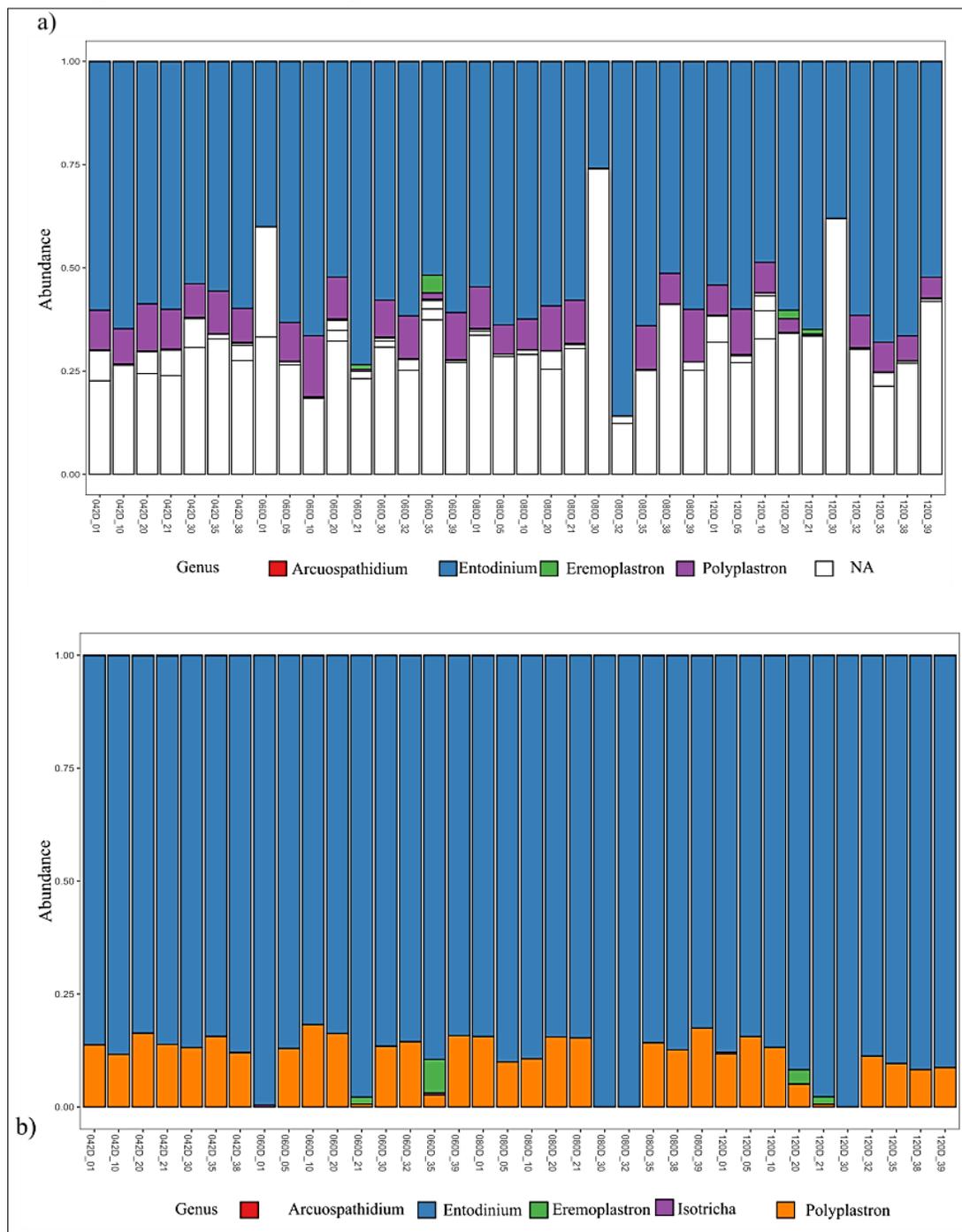
e para o estágio 120 dias, foram registrados os gêneros *Entodinium*, *Polyplastron*, *Isotricha*, *Metadinium*, *Dasytricha* e *Eremoplastron*.

Figura 2. Gráfico de barras da composição e abundância dos filos e Subclasse/Classe da comunidade microbiana do rúmen de bezerros durante quatro estágios de crescimento. a)- Composição de filos; b)-Composição de Subclasses/Classes. Os valores no eixo Y representam a abundância de filos e no eixo X os períodos e a identificação do animal.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

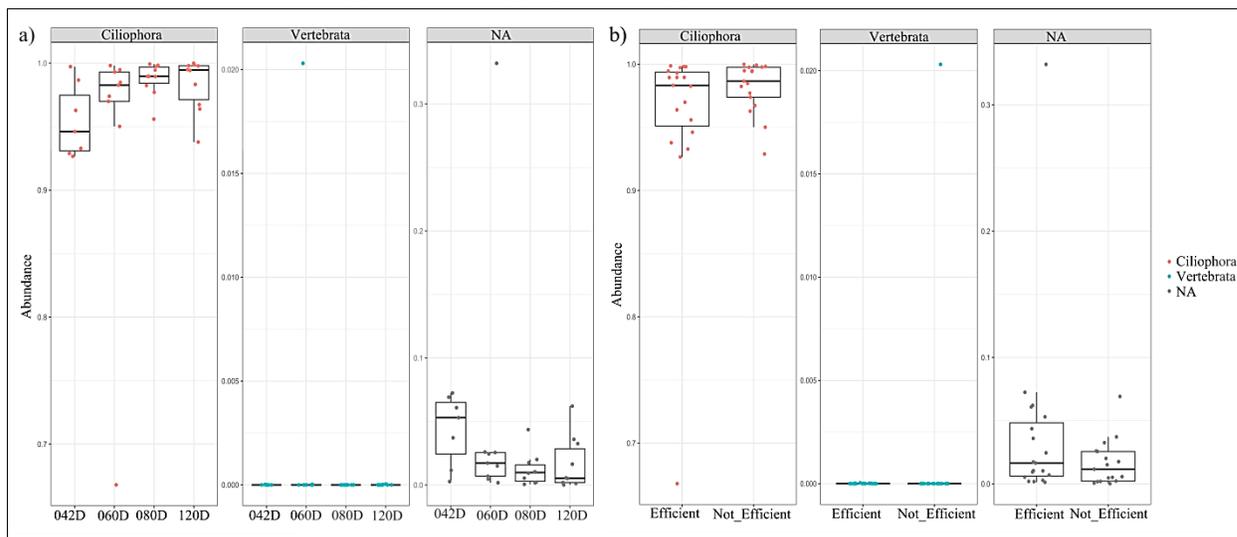
Figura 3. Gráfico de barras contendo composição e abundância dos gêneros da comunidade de ciliados no rúmen de bezerras durante quatro estágios de desenvolvimento. a) Composição de gêneros com NA (taxons não identificados no banco de dados); b) Composição de gêneros sem NA. Os valores no eixo Y representam a abundância de cada gênero e no eixo X os períodos e o número do animal.

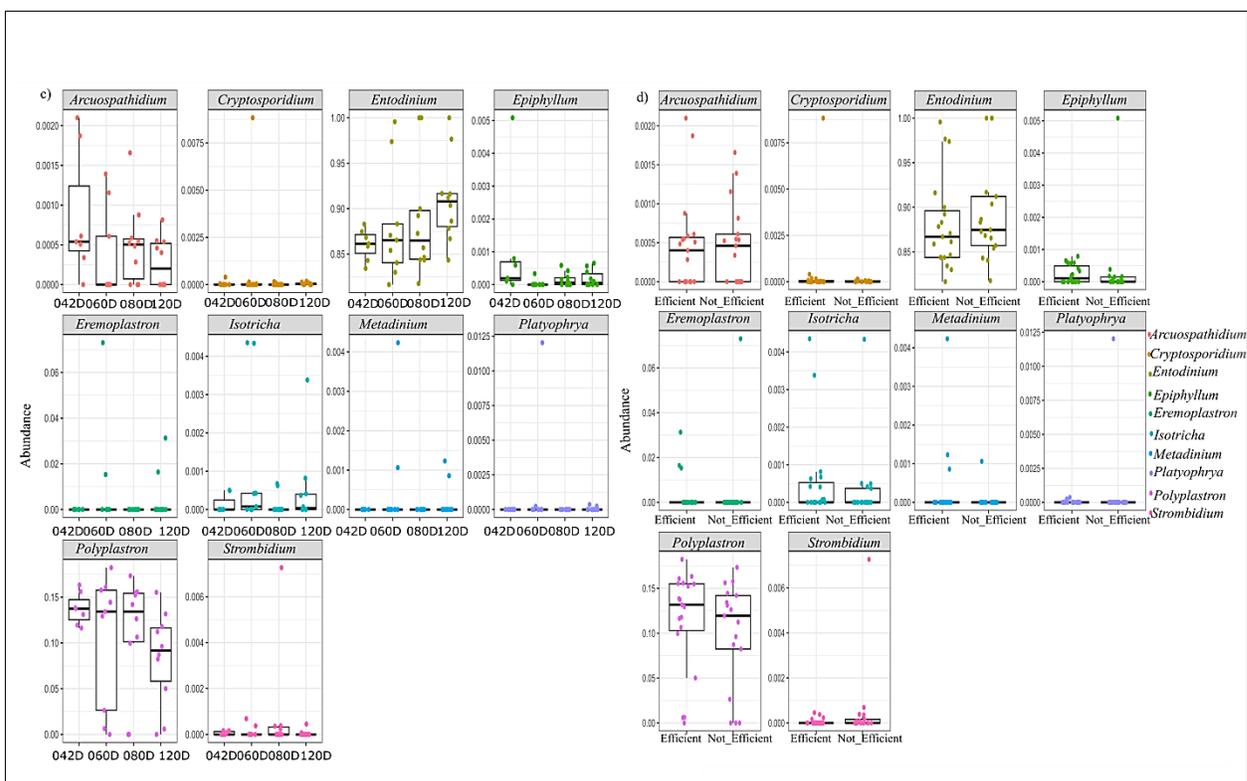


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao analisar o registro e abundância entre os estágios/períodos de estabelecimento dos protozoários no rúmen para os níveis de filo e gênero, verificou-se que o filo Ciliophora foi observado em todos os períodos de crescimento dos animais. No período 42 dias, o filo Ciliophora apresentou uma abundância de 95%, no período 60 dias foi de 94%, no período 80 dias 98% e para o período de 120 dias a abundância foi também de 98% (Anexo D). Comparando animais eficientes e não eficientes, não se registrou uma diferença significativa na abundância em nível do filo Ciliophora entre os dois grupos de animais (Figura 4 b). Em nível do gênero de ciliados do rúmen, três estavam presentes em todos períodos, *Entodinium*, *Isotricha* e *Polyplastron*. Os dois gêneros mais abundantes do rúmen tiveram as seguintes porcentagens: período 42 dias, o gênero *Entodinium* apresentou 58.2%, no período 60 dias 57.8%, no período 80 dias 58.3% e no período de 120 dias, 57.3% (Anexo F). O gênero *Polyplastron* apresentou as seguintes porcentagens: 42 dias (6.5%), 60 dias (6.6%), 80 dias (7.6%) e 120 dias (5.5%) (Anexo E).

Figura 4. Boxplots da abundância do filo Ciliophora e dez gêneros registrados no rúmen. a) Abundância do filo Ciliophora nos quatro estágios. b) Abundância do filo Ciliophora entre os grupos dos animais c) Abundância dos gêneros nos quatro estágios. d) Abundância dos gêneros nos grupos divergentes para eficiência alimentar.

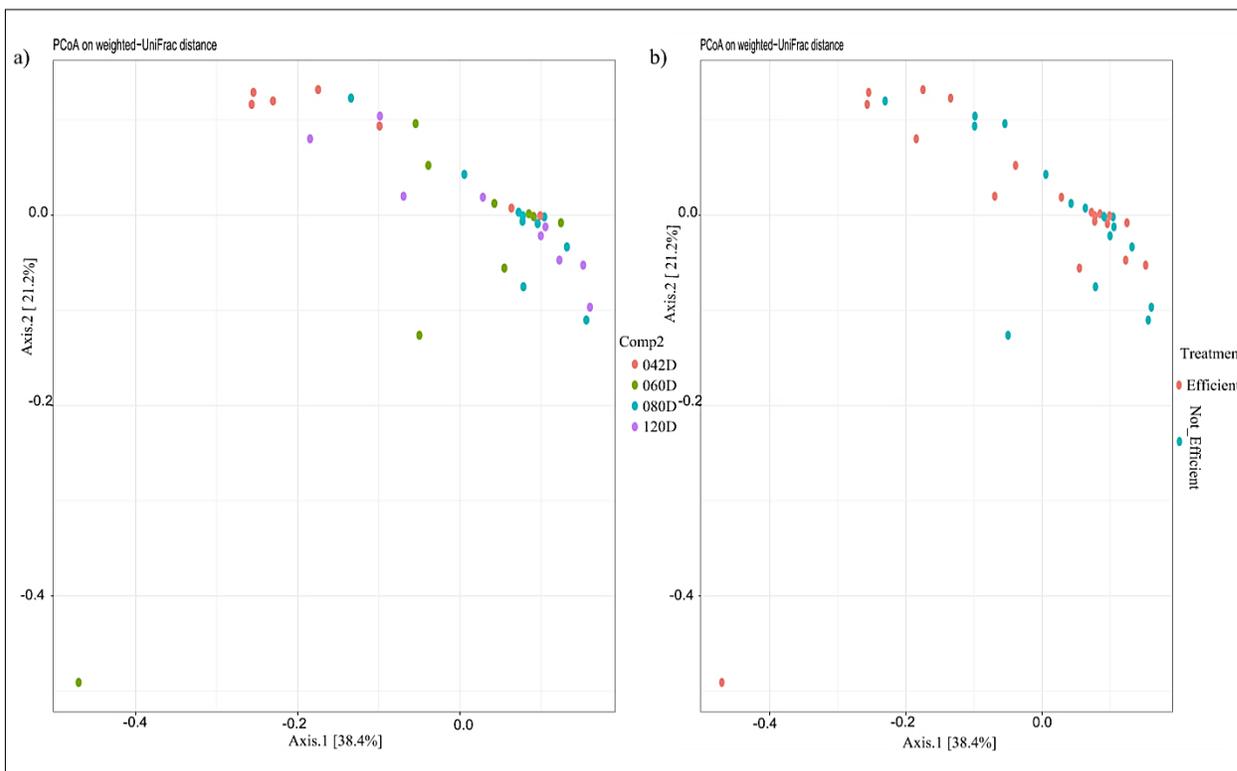




Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Para estimar a diversidade beta entre as amostras, a análise de coordenadas principais foi realizada e todos períodos e tratamentos são mostrados na figura 5. Tanto para os estágios de crescimento quanto para os grupos dos animais, os dois primeiros componentes principais representaram 38.4% e 21.2% de variação. Juntos explicam aproximadamente 60% da variação na estrutura da comunidade. Ao observar a análise de coordenadas principais, a microbiota do período 42 dias de vida dos animais, parece ter uma tendência em formar um grupo distinto dos outros períodos. O mesmo resultado pode ser observado em relação ao tratamento dos animais. Porém, ao analisar os centroides por meio de Adonis test para os dois casos, resultou a separação dos grupos, com um valor estatístico significativo ($R= 0.12356$ e $P=0.028$), o que pode indicar a existência de uma diferença significativa na estrutura da comunidade de ciliados entre os grupos (Figura 5; Anexo C).

Figura 5. Análise de coordenadas principais (PCoA) para composição da comunidade de ciliados do rúmen de bezerros em diferentes fases de idade. Axis 1 e Axis 2 juntos explicam 59,6% da variação na composição. a) Composição da estrutura da comunidade entre os estágios de crescimento. b) Composição da estrutura da comunidade entre os grupos dos animais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

6.5 DISCUSSÃO

A manipulação da microbiota ruminal de bezerros durante os primeiros dias de vida e fases subsequentes surge como uma estratégia promissora para melhorar a eficiência de produção dos hospedeiros ao longo do tempo. Complementarmente, entender a dinâmica do estabelecimento microbiano no desenvolvimento do rúmen e os fatores que o influenciam serão fundamentais no desenho de novas e eficazes estratégias dietéticas e de manejo para modificar a composição microbiana do rúmen e desempenho do hospedeiro. Para além disso, pode ajudar a desenhar as estratégias eficientes de intervenção para manipular o processo de colonização no rúmen desde o início de vida dos animais. O estabelecimento da microbiota ruminal nos primeiros dias de vida dos hospedeiros é ainda mais importante porque constitui uma base de

transição dos animais recém nascidos para o estado de ruminante, um estado importante para adaptação digestiva (LI et al., 2012).

Sequências de 11 filos da comunidade microbiana foram identificadas no conteúdo ruminal de bezerros F1 Holandes x Gir utilizando o gene 18S rRNA. Entre estes filos, Ciliophora foi o mais abundante com aproximadamente 96%. No presente estudo, o filo Ciliophora foi detectado a partir do estágio 42 dias de vida dos animais. Este resultado, pode não constituir novidade, visto que estudos anteriores já detectaram ciliados em períodos similares (GUO et al., 2020), porém, outros estudos mostraram a presença de ciliados em hospedeiros ainda mais novos, com até 21 dias de vida (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2019). Isto pode indicar de que, este grupo de eucariotos (ciliados) é presente no rúmen ainda muito cedo do que registrado no presente trabalho, e que isso pode ter sido influenciado pela dieta recebida pelos animais.

Em nível de gênero para ciliados do rúmen (Trichostomatia), os gêneros *Entodinium*, *Polyplastron* e *Isotricha* foram registrados em todos estágios de crescimento dos bezerros. Nos estágios 60 dias e 120 dias dos bezerros, foram os estágios com mais gêneros de ciliados do rúmen registrados, seis (*Entodinium*, *Polyplastron*, *Isotricha*, *Metadinium*, *Dasytricha* e *Eremoplastron*). Entre esses gêneros, *Entodinium* e *Polyplastron* foram os mais abundantes com 58% e 7%, respectivamente. Estudos anteriores já registraram de forma consistente a predominância no rúmen dos bovinos, os gêneros *Entodinium* e *Dasytricha* (SHIN et al., 2004; LENG et al., 2011; GUO et al., 2020). Apesar da diferença com o gênero *Polyplastron* como segundo gênero mais predominante no nosso estudo (o que pode ter sido influenciado pela dieta fornecida, silagem de milho e concentrado, farelo de soja), houve a consistência/concordância para com um dos gêneros mais predominante nos estudos, o gênero *Entodinium*. No nosso estudo, o gênero *Dasytricha* teve a porcentagem menor de 1%.

Embora não abundante no nosso estudo, o gênero *Isotricha* foi detectado em todos períodos de crescimento dos bezerros, um registro também observado em outros trabalhos anteriores, porém, a partir de três meses de vida dos hospedeiros (GUO et al., 2020). As espécies pertencentes aos gêneros *Isotricha* e *Dasytricha* desempenham papéis muito importantes na utilização de açúcares solúveis e no controle da taxa de fermentação de carboidratos (WRIGHT, 2015), o que pode significar, de que, a seleção desses protozoários no rúmen de bezerros pode ter sido impulsionada pelo conteúdo de fibra alimentar fornecida aos animais no nosso estudo (silagem de milho). Além disso, as espécies do gênero *Entodinium* e os Isotriquiideos (*Isotricha* e

Dasytricha), têm sido apontados dentre os protozoários ciliados do rúmen, como os que iniciam a colonizar este ecossistema (FONTY, et al., 1983) e, a abundância destes gêneros, *Entodinium*, *Isotricha*, *Dasytricha* e *Polyplastron*, no rúmen, pode indicar a sua relação com o tipo de dieta oferecida aos animais nessas fases de crescimento (GUO et al., 2020).

A presença de gêneros de ciliados como *Arcuospithidium* (Haptoria), *Epiphyllum* (Haptoria), *Amphileptus* (Haptoria) e *Didinium* (Haptoria) no rúmen de bezerros em crescimento pode ser explicado com a possibilidade de estarem presentes nos alimentos e água ingeridos pelos animais, visto que, a subclasse Haptoria é um largo e diverso grupo de ciliados caracterizados por serem de vida livre e de ambientes terrestres (solo) e aquáticos (VĎAČNÝ et al., 2014; HUANG et al., 2018).

Para além de gêneros de protozoários, gêneros de fungos foram detectados, *Thermomyces* (Ascomycota), *Malassezia* (Basidiomycota), *Tulasnella* (Basidiomycota), porém, com uma porcentagem inferior de menos de 1%. Os fungos anaeróbios estritos do rúmen podem representar 8% da biomassa microbiana nos animais que recebem dieta rica em fibras (AKIN, 1987). Dentro do rúmen, as células vegetais mais velhas são recobertas por lignina, cutina, taninos e sílica, o que dificulta a adesão e consequente ação dos microrganismos ruminais à parede celular. Por isso, a degradação dessas células é feita preferencialmente de dentro para fora e os fungos são os únicos microrganismos do rúmen capazes dessa ação, permitindo que outros microrganismos possam continuar a digestão das proteínas e carboidratos vegetais (DE ALMEIDA, 2009). A detecção de fungos em bezerros (DIAS et al., 2017) e cordeiros (JIAO et al., 2015), já foi registrado com tempo de vida menor, 7 dias, e com um tempo de vida superior de um mês em hospedeiros como iaque (GUO et al., 2020). Os fungos são eucariotos e componentes importantes da microbiota ruminal (O'HARA et al., 2020) podendo apresentar uma densidade de 10^3 a 10^5 indivíduos/ml (AGARWAL et al., 2015; ROSSI et al., 2017), essa densidade, pode representar a importância dos fungos no desenvolvimento do rúmen durante os primeiros estágios de vida e crescimento dos ruminantes. Porém, é importante destacar aqui que o marcador molecular 18S não é o mais adequado para a identificação de fungos. E que apesar de alguns táxons terem sido detectados utilizando esse marcador, para uma classificação mais precisa dos fungos presentes no ambiente ruminal é necessário utilizar o marcador molecular ITS.

Neste trabalho, registramos que houve diferença significativa em relação aos grupos dos animais eficientes e não eficientes. De acordo com índice de diversidade de Shannon, em animais

eficientes, há maior diversidade de ciliados apesar de menor abundância. Este resultado de maior diversidade, pode indicar a influência de protozoários do rúmen sobre a eficiência alimentar dos bezerros, uma vez acreditar-se que a microbiota do rúmen afeta a eficiência alimentar do hospedeiro (GUAN et al., 2008; VANDEHAAR et al., 2016; AUFFRET et al., 2020, FREGULIA et al., 2022). Pode-se ainda traduzir com este resultado, uma maior produção sobre os bezerros com mesma quantidade ou menos alimento, menor necessidade de mão-de-obra, menor necessidade de áreas de pastagem e menor consumo de alimento (GOMES et al., 2012). No entanto, estudos são necessários para melhor compreensão de grupos específicos de protozoários ciliados relacionados na eficiência.

Baseando-se em análises de coordenadas principais (PCoA), a estrutura da comunidade de eucariotos no rúmen de bezerros foi claramente separada entre grupos de idade (42 dias, 60 dias, 80 dias e 120 dias) e grupos de animais, $P = 0.028$ (Anexo C). Isto pode sugerir que os estágios de crescimento dos bezerros e os grupos de animais (eficiente e não eficiente), podem contribuir para o estabelecimento sucessivo da microbiota ruminal, em especial protozoários ciliados. Um estudo feito por GUO et al. (2020) sobre o levantamento da microbiota ruminal em iaques domésticos durante diferentes estágios de crescimento, não foi clara a separação dos protozoários e fungos ao longo das diferentes fases de crescimento dos animais. Essa diferença pode ser devido a influência dos fatores do hospedeiro e dieta fornecida, porque a mudança da microbiota ao longo da vida dos animais é bastante sensível a vários fatores incluindo dieta e o tipo de hospedeiro. Para além disso, já foi demonstrado que a comunidade de protozoários no rúmen muda ao longo do tempo dos hospedeiros, apesar de ser de forma ligeira (HUWS et al., 2018), sugerindo que as comunidades de protozoários e fungos podem ser pouco sensíveis a mudanças de tempo.

Caracterizar a microbiota que coloniza o rúmen em especial ciliados, pode ser importante para saber quando essa microbiota se estabelece. Isso fornece informações para potenciais manipulações (estratégias de inoculação), pois é mais difícil alterar a microbiota totalmente estabelecida já na fase adulta dos animais (ZHOU et al., 2018). Portanto, estudos futuros são necessários para identificar até que ponto os táxons registrados por idade são indicativos do desenvolvimento normal da microbiota ruminal.

6.6 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou aquilo que pode ser a estrutura da comunidade microbiana (protozoários ciliados) do rúmen de bezerros em quatro fases durante a colonização microbiana do rúmen dos animais alimentados essencialmente de silagem de milho e concentrado. Os resultados revelaram a predominância do filo Ciliophora nos quatro estágios. Os gêneros *Entodinium*, *Polyplastron* e *Isotricha* foram detectados nos quatro estágios de crescimento dos bezerros. Os estágios 60 dias e 120 dias, registraram mais gêneros (seis) de ciliados do rúmen, *Entodinium*, *Polyplastron*, *Isotricha*, *Metadinium*, *Dasytricha* e *Eremoplastron*. A estrutura da ciliatofauna no rúmen de bezerros foi claramente separada pelos diferentes grupos de eficiência alimentar. As informações obtidas neste estudo podem ser vitais para o desenvolvimento futuro de estratégias para manipular (transferir) os ciliados no rúmen de bezerros.

REFERÊNCIAS

- ADLERBERTH, I.; WOLD, A.E. Establishment of the gut microbiota in Western infants. **Acta Pædiatrica**, 98, 229–238. 2009. Doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x
- ALMEIDA, R.; LANNA, D. P. D.; LEME, P. R. Consumo alimentar residual: um novo parâmetro para avaliar a eficiência alimentar de bovinos de corte. In: reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 41., 2004. Campo Grande. Anais, Campo Grande: **Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2004.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58, 440–446. 2006.
- ANDERSON, K. L.; NAGARAJA, T. G.; MORRILL, J. L.; AVERY, T. B.; GALITZER, S. J.; BOYER, J. E. Ruminant microbial development in conventionally or early-weaned calves. **Journal of Animal Science**, 64(4), 1215–1226. 1987.
- AKIN, D. E. Association of rumen fungi with various forage grasses. **Animal Feeding Science Technology**, 273–285, 1987.
- AGARWAL, N.; KAMRA, D. N.; CHAUDHARY, L. C. Rumen microbial ecosystem of domesticated ruminants. In Rumen microbiology: from evolution to revolution. **Springer**, New Delhi, 17–30. 2015.
- AUFFRET, M. D.; STEWART, R. D.; DEWHURST, R. J.; DUTHIE, C. A.; WATSON, M.; ROEHE, R. Identification of microbial genetic capacities and potential mechanisms within the rumen microbiome explaining differences in beef cattle feed efficiency. **Frontiers in Microbiology**, 11:1229. 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01229
- BELANCHE, A.; BALCELLS, J.; DE LA FUENTE, G.; YAÑEZ-RUÍZ, D. R.; FONDEVILA, M.; CALLEJA, L. Description of development of rumen ecosystem by PCR assay in milk-fed, weaned and finished lambs in an intensive fattening system. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 94(5), 648–658. 2010.
- BRYANT, M. P.; SMALL, N.; BOUMA, C.; ROBINSON, I. Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. **Journal of Dairy Science**, 41, 1747–1767. 1958.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A.; HOLMES, S. P. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, 13, 7, 581–583. 2016.
- CABRAL, D.; RIBEIRO PEREIRA, L.; MELLO LIMA, J.; MACHADO, F.; FERREIRA, A.; TOMICH, T.; COELHO, S.; MAURÍCIO, R.; CAMPOS, M.M. Grouping crossbred Holstein x Gyr heifers according to different feed efficiency indexes and its effects on energy and nitrogen

partitioning, blood metabolic variables and gas exchanges. **PloS ONE**,15, 9. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0238419.

CONRAD, H. R.; HIBBS, J. W.; FRANK, N. High Roughage System for Raising Calves Base on Early Development of Rumen Function. **Journal of Dairy Science**, 41. 1248–1261.1958.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; AMEILBONNE, A.; AUFFRET, P.; BERNARD, M.; MIALON, M.M.; DUNIÈRE, L.; FORANO, E. Supplementation of live yeast based feed additive in early life promotes rumen microbial colonization and fibrolytic potential in lambs. **Scientific Reports**,16:1–6. 2019.

CRHA, J.; HOLUB, A. Ruminial Fauna in Calves Raised in Isolation from the Dams. **Acta Veterinaria Brno**, 47(3-4), 127–135. 1978.

DE ALMEIDA, P.N.M. População microbiana ruminal e atividade celulolítica de fungos provenientes de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens. **Dissertação de Mestrado**, UFMG. 2009.

DILL-MCFARLAND, K.A.; BREAKER, J.D.; SUEN, G. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. **Scientific Reports**, 7:1–12. 2017.

DIAS, J.; MARCONDES, M.I.; NORONHA, M.F.; RESENDE, R.T.; MACHADO, F.S.; MANTOVANI, H.C.; DILL-McFARLAND, K.A.; SUEN, G. Effect of pre-weaning diet on the ruminal archaeal, bacterial, and fungal communities of dairy calves. **Frontiers Microbiology**, 8:1553. 2017.

FONTY, G.; GOUET, P.; JOUANY, J. P.; SENAUD, J. Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumens of meroxenic lambs. **Journal of General Microbiology**, 129, 213–223. 1983.

FONTY, G.; SENAUD, J.; JOUANY, J. P.; GOUET, P. Establishment of ciliate protozoa in the Rumen of conventional and conventionalized lambs: influence of diet and management conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, 34:235–41. 1988. Doi:10.1139/m88-044.

FONTY, G.; GOUET, P.; JOUNAY, J. P.; SENAUD, J. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. **Microbiology**, 133:1835–43. 1987. Doi: 10.1099/00221287-133-7-1835.

FREGULIA, P.; CAMPOS, M.M.; DIAS, R.J.P.; LIU, J.; GUO, W.; PEREIRA, L.G.R.; MACHADO, M.A.; FAZA, D.RD.L.R.; GUAN, L.L.; GARNSWORTHY, P.; NEVES, ALA. Taxonomic and predicted functional signatures reveal linkages between the rumen microbiota and feed efficiency in dairy cattle raised in tropical areas. **Frontiers in Microbiology**, 13:1025173. 2022. Doi: 10.3389/fmicb.2022.1025173.

GOMES, R. C.; SANTANA, M. H. A.; FERRAZ, J. B. S.; LEME, P. R.; SILVA, S. L. Ingestão de alimentos e eficiência alimentar de bovinos e ovinos de corte. **Funpec-Editora**, Ribeirão Preto, p 77, 2012.

GUAN, L. L.; NKUMAH, J. D.; BASARAB, J. A.; MOORE, S. S. Linkage of microbial ecology to phenotype: Correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. **FEMS Microbiology Letters**. 288, 85–91. 2008. Doi: 10.1111/j.1574 6968.2008.01343.x

GUO, W.; ZHOU, M.; MA, T.; BI, S.; WANG, W.; ZHANG, Y.; HUANG, X.; GUAN, L.L.; LONG, R. Survey of rumen microbiota of domestic grazing yak during different growth stages revealed novel maturation patterns of four key microbial groups and their dynamic interactions. **Animal Microbiome**, 2(1), 1–20. 2020.

HUANG, J. B.; ZHANG, T.; ZHANG, Q.; LI, Y.; WARREN, A.; PAN, H.; YAN, Y. Further insights into the highly derived haptorids (Ciliophora, Litostomatea): phylogeny based on multigene data. **Zoologica Scripta**, 47(2), 231–242. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA [INMET]. Instituto Nacional de Meteorologia [INMET]. Available online at: <https://portal.inmet.gov.br/dados-historicos> . 2015.

JIAO, J.; LI, X.; BEAUCHEMIN, K.A.; TAN, Z.; TANG, S.; ZHOU, C. Rumen development process in goats as affected by supplemental feeding v. grazing: age-related anatomic development, functional achievement and microbial 174characteriza. **British Journal Nutrition**, 113:888–900. 2015.

JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A.; MIZRAHI, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **ISME Journal**, 201(7), 1069–79. 2013.

KORINGA, P. G.; THAKKAR, J. R.; PANDIT, R. J.; HINSU, A. T.; PAREKH, M. J.; SHAH, R. K., JAKHESARA, S.J.; JOSHI, C. G. (2019). Metagenomic 174characterization of ruminal bacterial diversity in buffaloes from birth to adulthood using 16S rRNA gene amplicon sequencing. **Functional and integrative genomics**, 19(2), 237–247.

LATTEUR, (cit.: JANCA1tfK, A. PROKSOvA, M. REICHL, J. Biologic vjZivy sajicich mIadat, Praha, **CSAZV**, 1957). 1953.

LENGEMANN, F. W.; ALLEN, N. N. Development of rumen function in the dairy calf. II. Effect of diet upon characteristics of the rumen flora and fauna of young calves. **Journal of Dairy Science**, 42, 1171–1181. 1959.

LENG, J.; ZHONG, X.; ZHU, R.J.; YANG, S.L.; GOU, X.; MAO, H.M. Assessment of protozoa in Yunnan yellow cattle rumen based on the 18S rRNA sequences. **Molecilar and Biological Reports**, 38:577–85. 2011.

LI, R. W.; CONNOR, E. E.; LI, C.; BALDWIN, VI, R. L.; SPARKS, M. E. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. **Environmental Microbiology**, 14(1), 129–139. 2012.

LI, R.W.; SPARKS, M.E.; CONNOR ERIN, E. Dynamics of the rumen microbiota. In *Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Li, R.W. (ed.). New York, USA: **Nova Science Publishers**, 135–164. 2011.

MORVAN, B.; BONNEMOY, F.; FONTY, G.; GOUET, P. Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. **Current Microbiology**, 32:129–133. 1996.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. **Frontiers in veterinary science**, 2, 36. 2015.

McMURDIE, P. J.; HOLMES, S.; WATSON, M. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, 8(4), e61217. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.g001>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.g002>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.g003>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.g004>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.t001>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.s001>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.s002>. 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL [NRC]. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th revised Edn. Washington, DC: **The National Academies Press**, 2001.

NOGUEIRA FILHO, O.M.E.M.; VEIGA, J.S.M.; LUCCI, CS. Observações pertinentes a Instalação da fauna de protozoários ciliados no rúmen de bezerros de raça Holandesa (*Bos taurus*, L.), criados em Pindamonhangaba, S.P. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 20(2): 177-82, 1983.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M.; VEIGA, J.S.M.; LUCCI, C.S. Cronologia do aparecimento de protozoários ciliados no rúmen de bezerros do tipo “Mantiqueira” (*Bos taurus* L.) na região do Vale do Rio Paraíba, SP. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Univ.S-Paulo, 21 (2):119-24, 1984.

O’HARA, E. Investigating early life microbial and host transcriptomic dynamics in the bovine gastrointestinal tract (**Doctoral dissertation**, Department of Agriculture, Food, and Nutritional Science-University of Alberta). 2019.

O’HARA, E.; NEVES, A. L.; SONG, Y.; GUAN, L. L. The role of the gut microbiome in cattle production and health: driver or passenger. **Annual Review of Animal Biosciences**, 8, 199 – 220. 2020

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; WAGNER, H. Vegan: Community Ecology Package. R Package Version, 2. 5– 6. 2019.

OLIVEIRA, M.C.S.; REGITANO, L. C. de A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; BELICUAS, S. N. J. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2007.

POUNDEN, W.D.; HIBBS, J.W. The influence of ration and rumen inoculation on the establishment of certain microorganisms in the rumens of young calves. **Journal of Dairy Science**, **31**:1041–50. 1948. Doi:10.3168/jds.S0022-0302(48)92296-6 16.

POUNDEN, W.D.; HIBBS, J.W. The influence of pasture and rumen inoculation on the establishment of certain microorganisms in the rumen of young dairy calves. **Journal of Dairy Science**, **32**:1025–32. 1949. Doi:10.3168/jds.S0022-0302(49)92157-8.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, **41**, 590–596. 2012. Doi: 10.1093/nar/gks 1219.

QUIGLEY, J.D.III.; SCHWAB, C.G.; HYLTON, W.E. Development of rumen function in calves: nature of protein reaching the abomasum. **Journal of Dairy Science**, **68**: 694–702.1985.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. 2019.

REY, M.; ENJALBERT, F.; COMBES, S.; CAUQUIL, L.; BOUCHEZ, O.; MONTEILS, V. (2014) Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. **Journal Applied of Microbiology**, **116**:245–257. 2014.

ROSSI, M. F.; MELLO, B.; SCHRAGO, C. G. Performance of hidden markov models in recovering the standard classification of glycoside hydrolases. **Evolutionary Bioinformatics**, **13**, 1–5, 2017. <https://doi.org/10.1177/1176934317703401>

SCHLIEP, K. P. phangorn: Phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, **27**(4), 592–593. 2011.

SYLVESTER, J. T.; KARNATI, S. K. R.; YU, Z.; MORRISON, M.; FIRKINS, J. L. Development of an Assay to Quantify Rumen Ciliate Protozoal Biomass in Cows Using Real-Time PCR. **The Journal of Nutrition**, **134**, **12**, 3378–3384, 2004. DOI: 10.1093/jn/134.12.3378.

SHIN, E. C. K. M.; CHO, W. J.; LIM, S. Y.; HONG, C. L.; AN, E. J.; KIM, Y. K.; KIM, B. R.; CHOI, J. M.; AN, J. M.; KANG, H. K.; YUN, H. D. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. **Journal Applied of Microbiology**, **97**:378–383. 2004.

VANDEHAAR, M. J.; ARMENTANO, L. E.; WEIGEL, K.; SPURLOCK, D. M.; TEMPELMAN, R. J.; VEERKAMP, R. Harnessing the physiology of the modern dairy cow to continue improvements in feed efficiency. **Journal of Dairy Science**, **99**:4941–4954, 2016.

VĎAČNÝ, P.; BREINER, H. W.; YASHCHENKO, V.; DUNTHORN, M.; STOECK, T.; FOISSNER, W. (2014). The chaos prevails: molecular phylogeny of the Haptoria (Ciliophora, Litostomatea). **Protist**, 165(1), 93–111. 2014.

HUWS, S.A.; CREEVEY, C.J.; OYAMA, L.B.; MIZRAHI, I.; DENMAN, S.E.; POPOVA, M.; MUÑOZ-TAMAYO, R.; FORANO, F.; WATERS, S.M.; HESS, M.; TAPIO, I.; SMIDT, H.; KRIZSAN, S.J.; YÁÑES-RUIZ, D.R.; BELANCHE, A.; GUAN, L.; GRUNINGER, R.J.; McALLISTER, T.M.; NEWBOLD, C.J.; ROEHE, R.; DEWHURST, R.J.; SNELLING, T.J.; WATSON, M.; SUEN, G.; HART, E.H.; KINGSTON-SMITH, A.H.; SCOLLAN, N.D.; PRADO, R.M.; PILAU, E.J.; MANTOVANI, H.C.; ATTWOOD, G.T.; EDWARDS, J.E.; McEWAN, N.R.; MORRISSON, S.; MAYORGA, O.L.; ELLIOT, C.; MORGAVI, D.; Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. **Frontiers in Microbiology**, 9:1–33. 2018. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02161

WRIGHT, A.D.G. Rumen protozoa. In: Rumen microbiology: from evolution to revolution; 2015.

WICKHAM, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2016.

WRIGHT, E. S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. **The R Journal**, 8, 352–359. 2016.

WANG, L.; ZHANG, K.; ZHANG, C.; FENG, Y.; ZHANG, X.; WANG, X.; WU, G. Dynamics and stabilization of the rumen microbiome in yearling Tibetan sheep. **Scientific Reports**, 9(1), 1–9. 2019.

YEOMAN, C. J.; ISHAQ, S. L.; BICHI, E.; OLIVO, S. K.; LOWE, J.; ALDRIDGE, B. M. Biogeographical differences in the influence of maternal microbial sources on the early successional development of the bovine neonatal gastrointestinal tract. **Scientific Reports**, 8:3197. 2018. Doi: 10.1038/s41598-018-21440-8

ZHOU, M.; PENG, Y.J.; CHEN, Y.; KLINGER, C.M.; OBA, M.; LIU, J.X.; GUAN, L.L. Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation: implications on improving feed efficiency in beef cattle. **Microbiome**, 6:62. 2018.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesta tese, podemos tirar as seguintes considerações finais:

1) As espécies de ciliados do rúmen associadas a caprinos formam um grupo merofilético e a idade máxima e mínima de 8.2Ma e 2.4Ma, foi proposta para estas espécies. Com esta informação, permite ainda dizer que, nos períodos Neogene e Quaternário já era possível a diversificação dos ciliados de caprinos, visto que nessa época o nicho para sua colonização já era disponível. Com esta tese, mostramos a ocorrência de 72 espécies de ciliados do rúmen em caprinos registradas em 13 países.

2) O conhecimento sobre protozoários ciliados do trato gastrointestinal de hospedeiros ruminantes em países da África ainda é bastante limitado. Apesar disso, nesta tese trazemos mais informações para o continente ao fazermos o primeiro registro de ciliados do rúmen de caprinos de Moçambique. Registramos 47 espécies de protozoários ciliados ocorrendo em caprinos de Moçambique. Mostramos que ampliando o processo de coleta nas localidades africanas e algumas zonas de difícil acesso, essas regiões, podem apresentar ainda mais surpresas na diversidade e abundância de ciliados do rúmen ainda desconhecidos.

3) A utilização do dataset concatenado sugeriu ser uma alternativa para inferir as relações filogenéticas entre os táxons de ciliados do rúmen pelo fato de termos recuperado valores de suporte elevados na topologia concatenada entre dataset ITS e dataset 18S. Porém, há necessidades de mais estudos que utilizem um número consideravelmente maior de sequências. Além disso, esta tese contribui ao incluir onze sequências novas com ITS nos bancos de dados.

4) A PCoA ressalta que a estrutura da comunidade de eucariotos no rúmen de bezerros foi claramente separada entre grupos por idade e em animais eficientes, há uma maior diversidade de ciliados e uma menor abundância. Estudar o estabelecimento sucessivo de ciliados no ambiente ruminal é um tipo de pesquisa que precisa ocupar um espaço maior em aspectos sobre a microbiota do rúmen, pois é importante para se saber quando os protozoários ciliados se estabelecem no rúmen, para que possamos ter informações relevantes das fases e momentos exatos da vida dos animais, para potenciais manipulações. Neste trabalho, registramos os gêneros *Entodinium*, *Polyplastron* e *Isotricha* no estágio 42 dias; *Entodinium*, *Polyplastron*, *Isotricha*, *Metadinium*, *Dasytricha* e *Eremoplastron* no estágio 60 dias; *Entodinium*, *Polyplastron* e *Isotricha* no estágio 80 dias e os gêneros *Entodinium*, *Polyplastron*, *Isotricha*, *Metadinium*, *Dasytricha* e *Eremoplastron* no estágio 120 dias de vida dos bezerros.

5) As informações obtidas nesta tese podem contribuir para o conhecimento da ciliatofauna em mamíferos herbívoros ruminantes, porém, estudos relacionados são necessários para uma melhor compreensão da taxonomia, filogenia e aspectos moleculares de ciliados do rúmen utilizando outras técnicas disponíveis, como por exemplo o protargol e o uso de MEV para ciliados do rúmen. Igualmente, são necessários estudos para identificar até que ponto os táxons registrados por idade são indicativos do desenvolvimento normal da microbiota ruminal.

ANEXOS

ANEXO A. Número de acesso no Genbank das espécies de protistas ciliados usadas para as inferências filogenéticas. (Capítulo 1)

Espécies	Número de acesso no Genbank	Número de pares de base (pb)	Referências
<i>Diplodinium_dentatum</i>	U57764.1	1638 pb	Wright & Lynn, 1997
<i>Epidinium_caudatum</i>	U57763.1	1638 pb	Wright et al., 1997
<i>Ophryoscolex_purkynjei</i>	U57768.1	1636 pb	Wright & Lynn, 1997
<i>Macropodinium_yalabense</i>	AF042486.1	1639 pb	Wright, 1998
<i>Amylovorax_dehorityi</i>	AF298817.1	1642 pb	Cameron et al., 2001
<i>Bitricha_tasmaniensis</i>	AF298821.1	1640 pb	Cameron et al., 2001
<i>Amylovorax_dogieli</i>	AF298825.1	1639 pb	Cameron et al., 2001
<i>Polycosta_turniae</i>	AF298818.1	1642 pb	Cameron et al., 2000
<i>Polycosta_roundi</i>	AF298819.1	1641 pb	Cameron et al., 2000
<i>Macropodinium_ennuensis</i>	AF298820.1	1639 pb	Cameron et al., 2000
<i>Bandia_smalesae</i>	AF298822.1	1640 pb	Cameron et al., 2000
<i>Bandia_tammar</i>	AF298823.1	1642 pb	Cameron et al., 2000
<i>Bandia_cribbi</i>	AF298824.1	1643 pb	Cameron et al., 2000
<i>Bandia_deveneyi</i>	AY380823.1	1641 pb	Cameron & O'Donoghue, 2004
<i>Paraisotricha_colpoidea</i>	EF632075.1	1559 pb	Struder-Kypke et al., 2007
<i>Cycloposthium_ishikawai</i>	EF632076.1	1558 pb	Struder-Kypke et al., 2007
<i>Cycloposthium_edentatum</i>	EF632077.1	1558 pb	Struder-Kypke et al., 2007
<i>Cochliatoxum_periachtum</i>	EF632078.1	1557 pb	Struder-Kypke et al., 2007
<i>Troglodytella_abrassarti</i>	EU680308.1	1316 pb	Modry et al., 2009
<i>Anoplodinium_denticulatum</i>	AM158440.1	1641 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Entodinium_dubardi</i>	AM158443.1	1638 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Entodinium_caudatum</i>	AM158444.1	1642 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Entodinium_bursa</i>	AM158448.1	1638 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Entodinium_nanellum</i>	AM158449.1	1642 pb	Moon-van der Staay et al., 2005

<i>Isotricha_intestinalis</i>	AM158453.1	1639 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Isotricha_prostoma</i>	AM158454.1	1640 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Polyplastron_multivesiculatum</i>	AM158458.1	1639 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Ostracodinium_dentatum</i>	AM158460.1	1637 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Enoploplastron_triloricatum</i>	AM158461.1	1637 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Enoploplastron_triloricatum</i>	AM158462.1	1639 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Dasytricha_ruminantium</i>	AM158463.1	1635 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Entodinium_simplex</i>	AM158466.1	1647 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Ophryoscolex_caudatus</i>	AM158467.1	1635 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Eremoplastron_rostratum</i>	AM158469.1	1635 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Anoplodinium_denticulatum</i>	AM158470.1	1637 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Entodinium_furca</i>	AM158471.1	1638 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Eremoplastron_dilobum</i>	AM158472.1	1636 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Eremoplastron_neglectum</i>	AM158473.1	1637 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Epidinium_ecaudatum</i>	AM158474.1	1637 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Entodinium_longinucleatum</i>	AB481099.1	1594 pb	Ito et al., 2010
<i>Cycloposthium_bipalmatum</i>	AB530165.1	1640 pb	Imai et al., 2009
<i>Triplumaria_selenica</i>	AB533538.1	1639 pb	Ito et al., 2010
<i>Raabena_bella</i>	AB534183.1	1640 pb	Ito et al., 2010
<i>Blepharocorys_curvigula</i>	AB534184.1	1643 pb	Ito et al., 2010
<i>Ostracodinium_trivesiculatum</i>	AB536718.1	1594 pb	Ito et al., 2009
<i>Eudiplodinium_rostratum</i>	AB536716.1	1591 pb	Ito et al., 2010
<i>Balantidium_coli</i>	GQ903678.1	1542 pb	Nilles & Rivera, 2010
<i>Bundleia_postciliata</i>	AB555709.1	1560 pb	Imai et al., 2010
<i>Polydiniella_mysorea</i>	AB555710.1	1557 pb	Imai et al., 2010
<i>Bundleia_benbrooki</i>	AB555711.1	1555 pb	Imai et al., 2010
<i>Bundleia_nana</i>	AB555712.1	1560 pb	Imai et al., 2010
<i>Diplodinium_dentatum</i>	JN116196.1	1363 pb	Tymensen et al., 2012
<i>Eudiplodinium_maggii</i>	JN116201.1	1317 pb	Tymensen et al., 2012
<i>Metadinium_medium</i>	JN116208.1	1362 pb	Tymensen et al., 2012
<i>Metadinium_minorum</i>	JN116224.1	1364 pb	Tymensen et al., 2012

<i>Diploplastron_affine</i>	JN116225.1	1363 pb	Tymensen et al., 2012
<i>Bozasella_gracilis</i>	AB793744.1	1556 pb	Ito et al., 2014
<i>Triplumaria_solea</i>	AB793745.1	1557 pb	Ito et al., 2014
<i>Triplumaria_sukuna</i>	AB793777.1	1556 pb	Ito et al., 2014
<i>Triplumaria_dvoinosi</i>	AB793778.1	1556 pb	Ito et al., 2014
<i>Triplumaria_fulgora</i>	AB793781.1	1556 pb	Ito et al., 2014
<i>Triplumaria_harpagonis</i>	AB793782.1	1556 pb	Ito et al., 2014
<i>Gassovskiella_galea</i>	AB793783.1	1561 pb	Ito et al., 2014
<i>Spirodinium_equi</i>	AB794092.1	1559 pb	Ito et al., 2014
<i>Triadinium_caudatum</i>	AB794968.1	1558 pb	Ito et al., 2014
<i>Tetratoxum_parvum</i>	AB794969.1	1556 pb	Ito et al., 2014
<i>Tetratoxum_excavatum</i>	AB794971.1	1556 pb	Ito et al., 2014
<i>Pseudoentodinium_elephantis</i>	AB794972.1	1559 pb	Ito et al., 2014
<i>Ochoterenaiia_appendiculata</i>	AB794973.1	1560 pb	Ito et al., 2014
<i>Circodinium_minimum</i>	AB794974.1	1560 pb	Ito et al., 2014
<i>Blepharocorys_angusta</i>	AB794976.1	1560 pb	Ito et al., 2014
<i>Blepharocorys_jubata</i>	AB794977.1	1561 pb	Ito et al., 2014
<i>Buxtonella_sulcata</i>	AB794979.1	1559 pb	Ito et al., 2014
<i>Helicozoster_indicus</i>	AB794981.1	1563 pb	Ito et al., 2014
<i>Latteuria_polyfaria</i>	AB794982.1	1559 pb	Ito et al., 2014
<i>Latteuria_media</i>	AB794983.1	1562 pb	Ito et al., 2014
<i>Paraisotricha_minuta</i>	AB794984.1	1559 pb	Ito et al., 2014
<i>Sulcoarcus_pellucidulus</i>	AB795024.1	1564 pb	Ito et al., 2014
<i>Didesmis_ovalis</i>	AB795025.1	1558 pb	Ito et al., 2014
<i>Alloiozona_trizona</i>	AB795026.1	1562 pb	Ito et al., 2014
<i>Ostracodinium_rugoloricatum</i>	KF981799.1	1475 pb	Rossi et al., 2013
<i>Ostracodinium_clipeolum</i>	KF981800.1	1503 pb	Rossi et al., 2013
<i>Ostracodinium_gracile</i>	KF981801.1	1530 pb	Rossi et al., 2013
<i>Balantidium_duodeni</i>	KM057846.1	1641 pb	Chistyakova et al., 2014
<i>Balantidium_polyvacuolum</i>	KJ124724.1	1636 pb	Li, 2014
<i>Charonina_ventriculi</i>	KJ870174.1	1537 pb	Kittelman et al., 2015

<i>Eodinium_posterovesiculatum</i>	KX219655.1	1457 pb	Cedrola et al., 2016
<i>Diplodinium_anisacanthum</i>	KX219656.1	1780 pb	Cedrola et al., 2016
<i>Balantidium_grimi</i>	MG837094.1	1640 pb	Zhao et al., 2018
<i>Spathidium_papilliferum</i>	KY556649.1	1593 pb	Jang et al., 2017

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

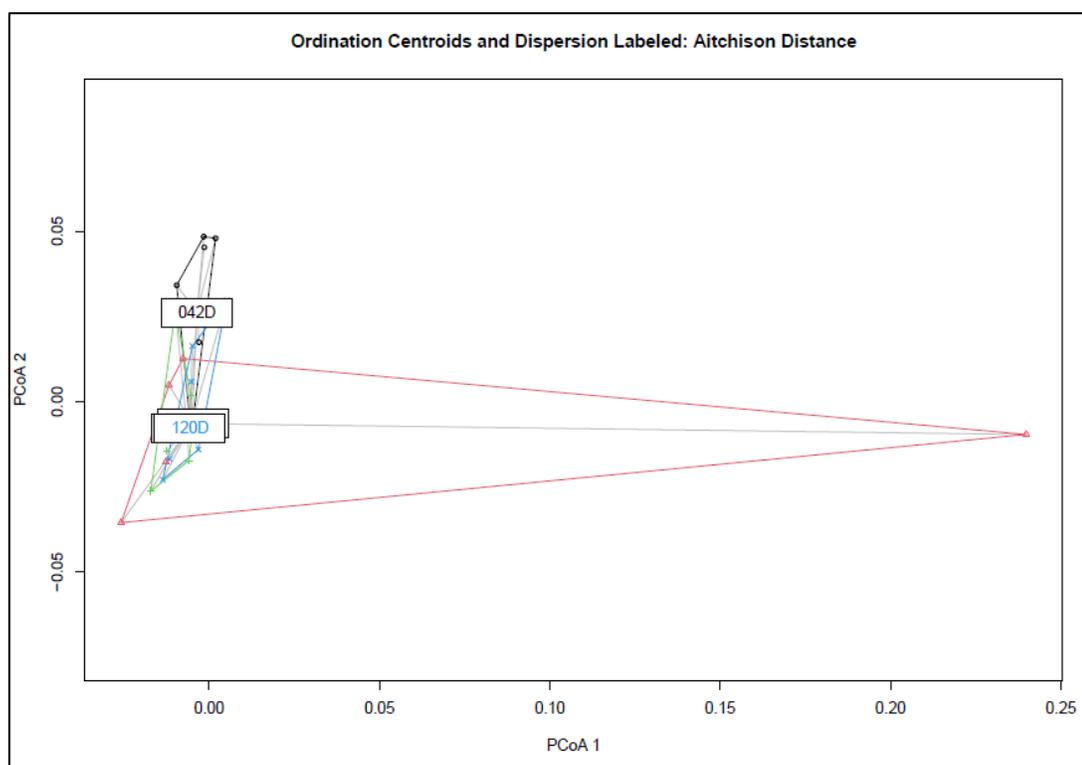
ANEXO B. Número de acesso no Genbank das espécies de protistas ciliados usadas para as inferências filogenéticas com marcadores ITS e 18S (Capítulo 3).

Espécies/Família	Número de acesso no Genbank (ITS)	Número de pares de base (pb)	Número de acesso no Genbank (18S)	Número de pares de base (pb)	Referências
<i>Isotricha prostoma</i> (Isotrichidae Stein, 1889)	Present study	659 pb	AM158454.1	1640 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Diplodinium_polygonale</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	547 pb	ON228651.1	1431 pb	Cedrola et al., 2022
<i>Diplodinium_anisacanthum</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	474 pb	KX219656.1	1780 pb	Cedrola et al., 2022
<i>Diplodinium_triakanthum</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	438 pb	Not available		Not available
<i>Enoploplastron_triloricatum</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	504 pb	AM158462.1	1639 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Eudiplodinium_maggii</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	505 pb	AM158452.1	1636 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Ostracodinium_rugoloricatum</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	505 pb	KF981799.1	1475 pb	Rossi et al., 2013
<i>Metadinium_medium</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	503 pb	AB535215.1	1593 pb	Ito et al., 2010
<i>Elytroplastron_bubali</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	406 pb	ON228654.1	1457 pb	Cedrola et al., 2022
<i>Polyplastron_multivesiculatum</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	553 pb	AM158459.1	1639 pb	Moon-van der Staay et al., 2005
<i>Eremoplastron_dilobum</i> (Ophryoscolecidae Stein, 1858)	Present study	506 pb	AM158472.1	1636 pb	Moon-van der Staay et al., 2005

<i>Troglodytella_abrassarti</i> (Troglodytelliidae Coliss, 1979)	EU680312.1	418 pb	AB437346.1	1616 pb	Modry et al., 2009; Irbis et al., 2008
<i>Neobalantidium_coli</i> (Balantidiidae Reichenow, 1929)	JQ073356.1	531 pb	KJ170368.1	1636 pb	Pomajbikova et al., 2013; Ponce-Gordo, 2014
<i>Balantidium_coli</i> (Balantidiidae Reichenow, 1929)	AM982726.1	401 pb	AM982723.1	1634 pb	Ponce-Gordo et al., 2008
<i>Buxtonella_like</i> (Pycnotrichidae Poche, 1913)	JQ073375.1	535 pb	JQ073328.1	949 pb	Pomajbikova et al., 2013

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

ANEXO C . Análises de Centróides de ordenação e dispersão. 042; 060; 080 e 120, são estágios de vida dos bezerros (Capítulo 4)



Fonte:Elaborado pelo autor (2022).

ANEXO F. Abundância do gênero *Entodinium* em cada amostra e período (Capítulo 4)

genus	01_042D	01_060D	01_080D	01_120D	05_060D	05_080D	05_120D	01_042D	01_060D	01_080D	01_120D	20_042D	20_060D	20_080D	20_120D	21_042D	21_060D	21_080D	21_120D	30_042D	30_060D	30_080D	30_120D	32_060D	32_080D	32_120D	35_042D	35_060D	35_080D	35_120D	38_042D	38_080D	38_120D	39_060D	39_080D	39_120D		
Entodinium	0.37722	0.3439	0.29848	0.35827	0.40504	0.35892	0.31874	0.39365	0.27754	0.37197	0.27129	0.34503	0.31217	0.33806	0.34725	0.35201	0.28813	0.35757	0.47473	0.33952	0.349	0.25506	0.38066	0.387	0.85366	0.44138	0.35883	0.33575	0.35025	0.51379	0.39681	0.21568	0.38469	0.35804	0.30835	0.38845		
Entodinium	0.03413	0.00446	0.02599	0.02165	0.01837	0.02552	0.04329	0.03253	0.06733	0.03058	0.02214	0.04045	0.01806	0.03582	0.104	0.03654	0.16344	0.02588	0.08454	0.02044	0.02828	0.00042	0	0.03712	0.00039	0.02559	0.0322	0.08721	0.04759	0.02665	0.02281	0.03018	0.0225	0.03665	0.04663	0.0167		
Entodinium	0.05566	0.02841	0.08415	0.04181	0.07242	0.08522	0.07168	0.08159	0.09289	0.07127	0.05945	0.05863	0.04855	0.07993	0.02947	0.06656	0.07106	0.06797	0.02512	0.06452	0.04541	0.00167	0.00014	0.05677	0.00292	0.03981	0.04	0.02155	0.07816	0.04021	0.05476	0.14218	0.15659	0.07119	0.07626	0.03688		
Entodinium	0.04472	0.00924	0.03906	0.04267	0.03319	0.03707	0.05559	0.04746	0.08974	0.0409	0.05106	0.05205	0.03954	0.04881	0.01885	0.04341	0.07358	0.04334	0.01789	0.03608	0.04028	0.00203	0	0.04819	0.0014	0.03626	0.0368	0.01321	0.05866	0.03465	0.04071	0.04039	0.03507	0.05015	0.05636	0.02584		
Entodinium	0	0.00867	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08441	0	0.06833	0	0.03168	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01912	0	0	0	0	0	0	0	0		
Entodinium	0.03755	0.00268	0.03128	0.02311	0.04852	0.05398	0.04386	0.0387	0.0609	0.02463	0.02968	0.03748	0.03301	0.03801	0.00184	0.0402	0.01086	0.03453	0.00051	0.03004	0.02915	0	0	0.03481	0	0.03223	0.03251	0.01697	0.04515	0.02806	0.02789	0.04237	0.03294	0.04127	0.04722	0.02188		
Entodinium	0.02383	0	0.01922	0.01077	0.01269	0.01808	0.03044	0.02516	0.04904	0.015	0.01651	0.02977	0.01502	0.0267	0	0.02659	0	0.01781	0	0.0148	0.01812	0	0	0.02832	0	0.01898	0.0207	0	0.03416	0.01758	0.01326	0.02135	0.0165	0.02626	0.03273	0.01275		
Entodinium	0.01296	0.00268	0.01188	0.00726	0.00788	0.0137	0.01342	0.01406	0.01734	0.00734	0.0126	0.01664	0.01302	0.01694	0.00889	0.01377	0.04309	0.01138	0.00867	0.01003	0.00716	0	0	0.01535	0.00073	0.00999	0.0089	0.00605	0.01465	0.0099	0.00999	0.01133	0.01027	0.01435	0.01431	0.0074		
Entodinium	0.00129	0	0	0.00655	0.0013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00121	0	0	0	0	0.00132	0	0	0.00132	0	0.00119	0	0.00105	0	0.00132	0	0		
Entodinium	0.00153	0	0	0.00629	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00163	0	0	0.00163	0	0	0	0	0	0	0		
Entodinium	0	0	0	0.00576	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0	0.00467	0	0.00174	0.00199	0	0.00554	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00282	0	0.0024	0.00245	0	0	0	0	0	0	0.00134	0.00135	0	0.00283	0	0	0	0	0		
Entodinium	0	0	0	0.00554	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00103	0	0	0	0	0		
Entodinium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Entodinium	0.00089	0	0.00159	0	0	0	0	0.00097	0	0.00502	0	0.00168	0	0	0.00088	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00089	0	0.00079	0	0.00164	
Entodinium	0	0	0.00095	0	0	0	0	0	0.00426	0	0	0	0	0	0	0	0.00108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00051	0.00109	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00416	0	0	0	0	0	0.00116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0.00111	0	0	0	0.00086	0	0.00366	0	0	0	0	0	0	0.00116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00067	0	0	0.0008	0.00057	0.00108	0	0	0	0.0005		
Entodinium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00197	0.00341	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0.00086	0	0	0	0	0	0	0.00341	0	0.00083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00081	
Entodinium	0	0	0	0	0	0.00129	0	0.00338	0	0	0	0	0	0	0.00042	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00132	0	0	0.00132	0	0.00071	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0	0.00048	0.00334	0.00059	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00068	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00049	0	0	0	
Entodinium	0	0	0.00079	0	0	0	0	0	0	0.00327	0	0.0007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0008		
Entodinium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00324	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0.00321	0	0	0	0	0	0.00209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00102	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0.00085	0	0	0.00069	0	0.00306	0	0	0	0	0	0	0.00094	0	0	0	0	0	0	0	0.00066	0	0	0	0	0.00038	0.00037	0.0008	0	0	0	0	0.00027			
Entodinium	0	0	0	0.00279	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Entodinium	0	0	0.001	0	0	0	0	0.00278	0	0	0	0	0	0	0.00088	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00085	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0.00092	0.00276	0.00099	0	0	0.00055	0	0	0.00055	0	0	0.00074	0.00081	0	0	0	0	0.00074	0.00081	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00078	0.00085	0.00086	0	0	0	
Entodinium	0.00061	0	0.00044	0.00072	0	0.00061	0	0	0	0	0.00042	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00053	0.00274	0	0	0	0	0.0006	0.0006	0	0.00058	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0.00064	0	0	0	0	0	0	0.00079	0	0.00274	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00071	
Entodinium	0.00087	0	0.00075	0.00069	0	0.00132	0.00074	0	0.00066	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00082	0.00261	0	0	0	0	0.0012	0.00076	0	0.00069	0.0008	0	0.00051	0	0	0.00059	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0	0.00261	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00247	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0	0	0	0	0	0	0	0.00245	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Entodinium	0.00048	0	0.00092</																																			

ANEXO G. Artigo publicado na Revista Zootaxa (Capítulo 1).



Zootaxa 5165 (2): 191–216

<https://www.mapress.com/zt/>

Copyright © 2022 Magnolia Press

Article

ISSN 1175-5326 (print edition)

ZOOTAXA

ISSN 1175-5334 (online edition)

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.5165.2.3><http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:A57E698E-7678-4FBB-8B1C-4838A538DADA>**Rumen ciliates (Alveolata, Ciliophora) associated with goats: checklist, geographic distribution, host specificity, phylogeny and molecular dating**ZACARIAS ROSALINA JOÃO DA SILVA^{1,*}, FRANCIANE CEDROLA^{1,2}, MARIANA FONSECA ROSSI^{1,3},
FABIOLA DA SILVA COSTA^{1,4} & ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS^{1,5}¹*Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.*²✉ francedrola@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5170-656X>³✉ mfonsecarossi@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0001-7573-5544>⁴✉ fabiolasilvacosta1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0297-3626>⁵✉ rjuniodias@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2404-4337>^{*}Corresponding author: ✉ zacarosalina@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7611-9126>**Abstract**

Although the diversity (~35 species) and worldwide distribution of goats (Ruminantia, Bovidae, Caprinae) are significant, studies on the diversity of symbiotic ciliates in these mammals are scarce in comparison to other ruminants. The present work is a review and checklist of species based on taxonomic, morphologic, and ecologic studies of rumen ciliate protozoa in goats, presenting geographic distribution and hosts, as well as estimating the macroevolutionary relationships of the species observed in the studies. To that end, all of the available literature on databases was reviewed, the schematic drawings were made based on information present in the original description of the taxa, and the phylogenetic relationships were inferred based on Maximum Likelihood and Bayesian Inference analyses. According to our review, 72 species and 14 genera of ciliates have been associated with goats. Through the analysis of the association between ciliate genera and caprine hosts, it was shown that ciliates are more associated with domestic animals (*Capra hircus*—14 genera) than wild ones (*Rupicapra rupicapra*—six genera, *Capra ibex*—one genus, *Capra pyrenaica*—one genus). Thirteen countries were

ANEXO H. Artigo publicado na Revista Zootaxa em colaboração.

 Zootaxa 0000 (0): 000–000 https://www.mapress.com/j/zt/ Copyright © 2021 Magnolia Press	<h1>Article</h1>	ISSN 1175-5326 (print edition) ZOOTAXA ISSN 1175-5334 (online edition)
https://doi.org/10.11646/zootaxa.0000.0.0 http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:00000000-0000-0000-0000-000000000000		
<p>Systematic review of the genus <i>Ostracodinium</i> (Ciliophora, Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae) and notes on the taxonomy of <i>Ostracodinium rugoloricatum</i> Kofoid & MacLennan, 1932</p>		
<p>FRANCIANE CEDROLA^{1*}, PRISCILA FREGULIA², ZACARIAS ROSALINA JOÃO DA SILVA³, MARIANA FONSECA ROSSI⁴, SAULO MOREIRA MENDES⁵ & ROBERTO JÚNIO PEDROSO DIAS⁶ <i>Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.</i></p>		
<p>¹ ✉ francedrola@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5170-656X ² ✉ priscilafregulia@hotmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6931-6965 ³ ✉ zacarosalina@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7611-9126 ⁴ ✉ mfonsecarossi@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7573-5544 ⁵ ✉ saulomoreiramendes@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2596-8782 ⁶ ✉ rjuniodias@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2404-4337 *Corresponding author: ✉ francedrola@gmail.com</p>		
<p>Abstract</p> <p>The family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorpha) constitutes a diverse and monophyletic group of symbiotic ciliates of herbivorous mammals. The family includes approximately 200 species, distributed in three subfamilies and sixteen genera. The subfamily Diplodiniinae is the most diverse group in Ophryoscolecidae and comprises the genus <i>Ostracodinium</i>, which includes species with two retractable ciliary zones in the anterior body portion, a broad skeletal plate covering almost all the right surface of the body and a variable number of contractile vacuoles. The genus currently comprises 28 species, classified according to body size and shape, position and shape</p>		

ANEXO I. Capítulo publicado no livro *Avanços da Zoologia no Século XXI* (PPG-Biodiversidade e Conservação da Natureza, UFJF)

CAPÍTULO 5

ETNOZOOLOGIA NA CONSERVAÇÃO DA FAUNA SILVESTRE: UM ESTUDO NO PARQUE NACIONAL DAS QUIRIMBAS EM MOÇAMBIQUE

Zacarias Rosalina Joao da Silva

Laboratório de Protozoologia, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Comportamento e Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, CEP 36036-900, Minas Gerais, Brasil.

Contato: zacarosalina@gmail.com

BIODIVERSIDADE

Falar da conservação das espécies nos remete a um conceito bem conhecido de biodiversidade cuja sua definição tem merecido vários comentários em varias áreas de saber, comentários estes que são importantes para sua melhor compreensão. O termo diversidade biológica apareceu precocemente, em 1968, no livro *A Different Kind of Country*, de autoria do cientista e conservacionista Raymond F. Dasmann. Entretanto, apenas na década de 1980 se tornou mais corrente no mundo científico. Este termo é uma forma

ANEXO J. Certificado de autorização de coleta e exportação de produtos biológicos (Capítulo 2).



República de Moçambique

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL
DIRECÇÃO NACIONAL DE VETERINÁRIA**

**CERTIFICADO VETERINÁRIO INTERNACIONAL PARA EXPORTAÇÃO
DE PRODUTOS BIOLÓGICOS**

**INTERNATIONAL VETERINARY CERTIFICATE FOR EXPORTATION OF
BIOLOGICAL PRODUCTS**

NÚMERO DO CERTIFICADO (CERTIFICATE NUMBER) : 02AMOS/DEV/2020

Pais Exportador (Exporting country): **Moçambique (Mozambique)**
 Ministério de (Ministry of) : **Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural
(Ministry of Agriculture) - Direcção Nacional de Veterinária (National Directorate
of Veterinary)** Província ou Distrito (Province or District, etc.): **Maputo**

I. IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS (IDENTIFICATION OF THE PRODUCTS)

Tipo de produtos (Type of products): **Amostra de LIQUIDO RUMINAL DE: CAPRINO
(60) ; BOVINO (4) ; OVINO (4) (Sample of RUMINAL LIQUID OF: GOAT (60)
BOVINE (04); SHEEP (4).**
 Para teste de (Test required) : **DIAGNOSTICO MOLECULAR E MICROSCOPICA
(MOLECULAR AND MICROSCOPIC TEST).**
 País de destino (Country of destination): **BRASIL**
 Número de embalagens (number of packaging units): **1**
 Master veterinary import permit N^o --

II. ORIGEM DOS PRODUTOS (ORIGIN OF THE PRODUCTS)

Endereço do estabelecimento de origem (Address of the establishment of origin):
**UNIVERSIDADE ROVUMA , EXTENSÃO DE CABO DELGADO, CAMPUS DE
NCORIPO – AMOSTRAS COLHIDAS EM MONTEPUEZ - ATT DR ZACARIAS ROSALINA
JÓAO DA SILVA – CABO DELGADO, MOÇAMBIQUE.**

III. DESTINO DOS PRODUTOS (PRODUCTS DESTINATION)

Local de embarque (load port) : **PEMBA – Moçambique (PEMBA – Mozambique)**
 País e lugar de destino (Country and place of destination): **BRASIL (BRASIL –
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA- RUA JOSE LOURENÇO KELMER –
CAMPUS UNIVERSITÁRIO – SÃO PEDRO – CEP 36036-900 – JUIZ DE FOR A - MG).**

1/2 

Meio de transporte (Means of transport) -----

Flight N^o: / Airway bill N^o:

Nome e endereço do destinatário (Name and address of consignee): **UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA- RUA JOSE LOURENÇO KELMER – CAMPUS UNIVERSITÁRIO – SÃO PEDRO – CEP 36036-900 – JUIZ DE FORA – MG.**

IV. CERTIFICAÇÃO (CERTIFICATION)

Eu, abaixo assinado, veterinário oficial da **Direção Nacional de Veterinária do Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural**, certifico que os produtos acima descritos, obedecem aos seguintes requisitos (I, the undersigned, official veterinarian of the **National Directorate of Veterinary of the Ministry of Agriculture** hereby certify that the products described above, meet the following requirements):

As amostras vão embaladas em recipientes hermeticamente fechados até **UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA- BRASIL** para **ANALISE LABORATORIAL** (The samples are packed in leak proof, and are transported through **UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - BRASIL**, for **LABORATORIAL** testing).

Emitido em Maputo aos 13 de Fevereiro de 2020 (Issued in Maputo , 13th February 2020)

DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA
(EPIDEMIOLOGY DEPARTMENT)

MARIA EMILIA PINTO

Nome (letras de imprensa)
(Name in print)


Assinatura e Carimbo Oficial
(Signature and official government stamp)



02AMOS/DEV/2020
2/2

ANEXO K. Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite (Capítulo 4).



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo metabólico de fêmeas Holandês-Gir com fenótipos divergentes para Eficiência Alimentar", Protocolo Nº 05/2015, sob a responsabilidade de **Fernanda Samarini Machado** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, em reunião de 19/06/2015.

Vigência do Projeto	De 01/08/2015 a 31/12/2015
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> /Bovino
Nº de Animais	36 Bovinos
Peso/idade	8 - 15 meses e aprox. 250Kg
Sexo	Machos () Fêmeas (X)
Origem	Biotérios da Embrapa Gado de Leite (x) Frigorífico ()

Virginia S. C. Barbosa

Virginia de Souza Columbiano Barbosa
Secretária Administrativo da CEUA/EGL 2016

Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Bairro Dom Bosco - 36038-330 Juiz de Fora/MG
Telefone: (32) 3311-7405 Fax: (32) 3311-7401 ceua@cpqgl.embrapa.br