

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Tese

**Taxonomia e sistemática de helmintos de mamíferos silvestres do Parque
Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil**

Everton Gustavo Nunes dos Santos

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**TAXONOMIA E SISTEMÁTICA DE HELMINTOS DE MAMÍFEROS
SILVESTRES DO PARQUE NACIONAL SERRA DA CAPIVARA,
PIAUÍ, BRASIL**

EVERTON GUSTAVO NUNES DOS SANTOS

Sob a Orientação da Professora

Cláudia Portes Santos Silva

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Novembro de 2016

636.0896962

S237t

T

Santos, Everton Gustavo Nunes dos,
1983-

Taxonomia e sistemática de
helmintos de mamíferos silvestres do
Parque Nacional Serra da Capivara,
Piauí, Brasil / Everton Gustavo
Nunes dos Santos. - 2016.

xiv, 80 f.: il.

Orientador: Cláudia Portes Santos
Silva.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2016.

Bibliografia: f. 74-79.

1. Helminologia veterinária -
Teses. 2. Mamífero - Parasito -
Parque Nacional da Serra da Capivara
(PI) - Teses. 3. Helminto -
Morfologia - Teses. 4. Helminto -
Genética - Teses. I. Silva, Cláudia
Portes Santos, 1959- II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

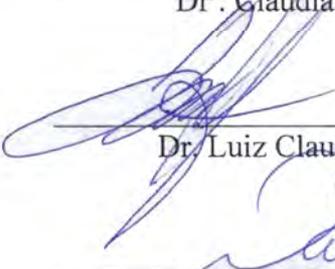
EVERTON GUSTAVO NUNES DOS SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

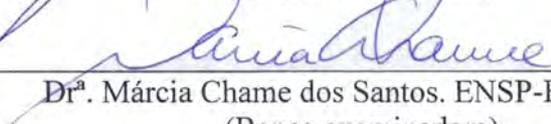
TESE APROVADA EM 1 / 11 / 2016



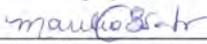
Dr.^a. Gláudia Portes Santos Silva. IOC/UFRRJ
(Orientadora)



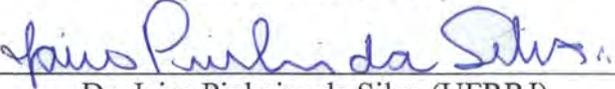
Dr. Luiz Claudio Muniz Pereira. IOC-FIOCRUZ
(Banca examinadora)



Dr.^a. Márcia Chame dos Santos. ENSP-FIOCRUZ
(Banca examinadora)



Dr.^a. Marília de Carvalho Brasil Sato. (UFRRJ)
(Banca examinadora)



Dr. Jairo Pinheiro da Silva. (UFRRJ)
(Banca examinadora)

“A coisa boa que a Ciência tem é que é verdade quer você acredite quer não.”

Neil deGrasse Tyson

Dedico este trabalho à minha família e todos os meus amigos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à minha orientadora Dr^a. Cláudia Portes Santos Silva (FIOCRUZ/RJ-IOC) pela dedicação e ensinamento dado tornando possível a realização do meu doutorado.

À todos os amigos do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental em especial Viviane Costa, Karina Lopes, Juliana Novo, Ronaldo Augusto, Luiz Felipe, Ana Carolina, Daniele Miranda, Claudiane, Ana Cristina, Vanessa Chagas-Moutinho, Maralina, Pedro e pela cooperação nas tarefas do laboratório, incentivo e alegrias proporcionadas no trabalho.

À todos os professores, funcionários, e amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, principalmente ao professor e coordenador do curso Dr. José Luis Fernando Luque Alejos pelo apoio oferecido durante todo curso de doutorado.

À Dr^a. Márcia Chame (FIOCRUZ/RJ-ENSP) e Dr^a Niede Guidon da FUMDHAM por terem possibilitado esta pesquisa no Parque Nacional Serra da Capivara.

Agradeço também à todos os amigos e familiares que de alguma forma contribuíram na minha carreira.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, na forma de bolsa de estudo e à Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Lista de espécies de Nematoda utilizados nas análises filogenéticas de <i>Aspidodera raillieti</i> utilizando sequencias do gene parcial 28S rDNA	27
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Lista de espécies de acantocéfalos utilizado nas análises filogenéticas de <i>Oncicola venezuelensis</i> com as sequências de ITS1, 5.8S, e ITS2 e gene parcial 28S rDNA	55
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Medida de ovos de parasitos gastrointestinais de mamíferos silvestres do Parque Nacional Serra da Capivara	68
---	----

QUADRO

Quadro 1. Sequências nucleotídicas de <i>Toxocara canis</i> de mtDNA <i>cox1</i> e ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA	41
--	----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Parque Nacional Serra Capivara localizado no sudeste do estado do Piauí, Brasil (FUMDHAM, 2016) 3
- Figura 2.** Fotografia da Fundação Museu do Homem Americano (www.fundham.org.br) 3
- Figura 3.** Fotografia de pinturas rupestres nos sítios arqueológicos do Parque Nacional Serra Capivara (www.fundham.org.br) 3

CAPÍTULO I

- Figura 1.** *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) adulto encontrado morto no Parque Nacional Serra Capivara (Fotografia: Everton Gustavo) 12
- Figura 2.** *Dasypus novemcinctus* (Linnaeus, 1758) adulto encontrado morto no Parque Nacional Serra Capivara (Fotografia: Everton Gustavo) 12
- Figura 3.** Desenho em câmara clara de *Aspidodera raillieti*. A. Região anterior mostrando três lábios, capuz cefálico, cordões cefálicos, vestíbulo, anel nervoso, esôfago com um bulbo terminal (Barra: 200 µm); B. Cauda do macho com um par espículos longos, gubernáculo, ventosa genital e papilas caudais (Barra: 500 µm) 15
- Figura 4.** Microscopia Eletrônica de Varredura de *Aspidodera raillieti*. A. Região anterior com capuz cefálico e cordões cefálicos; B. Detalhes do capuz cefálico e dos cordões cefálicos demonstrando um lábio dorsal e dois ventrolaterais; C. Cauda do macho demonstrando uma cutícula estriada, uma ventosa genital e cloaca com a ponta do gubernáculo; D. Cauda do macho com a ponta arredondada de um dos espículos. 16
- Figura 5.** Desenho em câmara clara de *Aspidodera subulata*. A. Região anterior demonstrando o capuz cefálico com três lábios, cordões cefálicos curtos, vestíbulo, altura do anel nervoso, esôfago longo com um bulbo terminal; B. Cauda da fêmea demonstrando a posição do ânus (A e B, barra: 200 µm) 17
- Figura 6.** Desenho em câmara clara de *Aspidodera binansata*. A. Região anterior demonstrando o capuz cefálico três lábios, cordões cefálicos, vestíbulo, anel nervoso, esôfago longo e bulbo na porção terminal do esôfago (Barra: 200 µm); B. Cauda do macho com um par espículos, gubernáculo, ventosa genital, papilas caudais e uma cauda com espínho terminal (Barra: 500 µm) 19
- Figura 7.** Microscopia Eletrônica de Varredura de *Aspidodera binansata*. A. Detalhes do capuz cefálico e dos cordões cefálicos com voltas por todo capuz; B. Cauda do macho demonstrando uma ventosa genital, cloaca e detalhes da distribuição das papilas caudais. 20
- Figura 8.** Desenho em câmara clara de *Aspidodera vazi*. A. Região anterior demonstrando o capuz cefálico alongado, cordões cefálicos alongados, vestíbulo, altura do anel nervoso, esôfago longo e bulbo na porção terminal do esôfago; B. Cauda do macho com um par espículos longo, gubernáculo, ventosa e papilas caudais e um espínho caudal longo (A e B, barra: 400 µm) 22
- Figura 9.** Microscopia Eletrônica de Varredura de *Aspidodera vazi*. A. Detalhes do capuz cefálico alongado e cordões cefálicos alongados; B. Observa-se as papilas labiais no lábio dorsal; C. Cavidade oral e detalhes dos lábios; D. Linha lateral no corpo; E. Detalhes do capuz cefálico e um lábio dorsal e dois ventrolaterais; F. Detalhes do poro excretor. 23

- Figura 10.** Desenho em câmara clara de *Hadrostrongylus speciosum*. A. Região anterior com esôfago e anel nervoso; B. Bolsa copuladora, espículos de desiguais e gubernáculo; C. Cauda da fêmea com ânus e espinho terminal. D. Útero com ovos e *vagina vera* 25
- Figura 11.** Correlação das *Aspidodera* spp. e suas respectivas famílias de hospedeiros no Brasil 26
- Figura 12.** Árvore de máxima-verossimilhança de *Aspidodera railletii* baseada no gene parcial 28S rDNA para mostrar o relacionamento com outras espécies de Nematoda. Números (%) no braço indica 1000 reamostragem de *bootstrap*. O número de acesso do GenBank estão demonstrados e a barra de escala indica a mutação de sítios de nucleotídeos. 28
- ## CAPÍTULO II
- Figura 1.** *Cerdocyon thous* (Linneus, 1766) encontrado morto na região do Parque (Fotografia: Everton Gustavo) 36
- Figura 2.** *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) encontrado morto na região do Parque (Fotografia: Everton Gustavo) 36
- Figura 3.** Desenho em câmara clara de *Toxacara canis*. A. Região anterior mostrando a cavidade oral com três lábios, um dorsal e dois ventro-laterais, asa cefálica e altura do anel nervoso; B. Cauda da fêmea com ânus subterminal (A e B, Barra: 1 mm); C. Ovo globular, morulado com camada externa ligeiramente ornamentada (Barra: 20 µm) 40
- Figura 4.** Desenho em câmara clara de *Molineus* sp. A. Região anterior com esôfago, anel nervoso e poro excretor (Barra: 250 µm); B. Cauda do macho com a bolsa copuladora fórmula 2-1-2, um par de espículos iguais em forma e tamanho e um gubernáculo (Barra: 100 µm) C. Cauda da fêmea (Barra: 200 µm) D. Útero com ovos morulados e em série (Barra: 200 µm); E. Ovojector e braços da *vagina vera* de comprimento iguais e uma vulva (Barra: 200 µm); F. Sínlofe da fêmea (Barra: 25 µm) 43
- Figura 5.** Desenho em câmara clara de *Ancylostoma buckleyi*. A. Região anterior mostrando a cápsula bucal com três pares de dentes ventro-laterais e 2 pares dorso-laterais, anel nervoso e esôfago (Barra: 200 µm); B. Cauda do macho com um par de espículos longos e finos (Barra: 200 µm); C. Cauda da fêmea mostrando o intestino e ânus (Barra: 300 µm) 45
- Figura 6.** Desenho em câmara clara de *Oncicola canis*. A. Macho com lemnisco longo, testículo na região mediana do tronco, glândulas de cimento, bolsa de Saefftigen e bolsa copuladora invaginada (Barra: 2 mm); B. Probóscide globular e ganchos (Barra: 500 µm); C. Detalhes dos ganchos I, II, III, IV, V e VI a partir da esquerda para a direita (Barra: 200 µm) 47
- Figura 7.** Fotomicrografia de ovos no útero de Nematoda gen. sp. Tipo 1 (Fotografia: Everton Gustavo). 48
- Figura 8.** Desenho em câmara clara de Nematoda gen. sp. Tipo 2. A. Fêmea com uma cavidade oral simples e altura do anel nervoso; B. Comprimento da cauda da fêmea e um com espinho terminal; C. Ovojector com infundíbulo, esfíncter e braços da *vagina vera* iguais em comprimento; D. Ovos em série e morulados no útero (A, B, C, D barra: 200 µm) 49
- Figura 9.** Desenho em câmara clara de *Physaloptera* sp. A. Região anterior contendo dois grandes lábios laterais e triangulares. Cutícula dobrada sobre o corpo, um colarete cefálico e o anel nervoso (Barra: 200 µm); B. Vulva localizada na região média posterior do corpo (Barra: 500 µm); C. Ânus na região posterior e três pequenos espinhos na porção final da cauda da fêmea (Barra: 200 µm) 51

Figura 10. Desenho em câmara clara de *Oncicola venezuelensis* mostrando A. Macho com probóscide globular, lemniscos enovelados, testículos na região mediana do tronco, glândulas de cimento, bolsa de Saëfftigen e bolsa copuladora invaginada (Barra: 2,5 mm); B. Probóscide globular e ganchos (Barra: 250 µm); C. Ganchos I, II, III, IV, V e VI, de cima para baixo (Barra: 250 µm); D. Fêmea com probóscide, lemnisco e poro genital subterminal (Barra: 2,5 mm); E. Ovo com quatro camadas, sendo a externa membranosa (Barra: 50 µm) 53

Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Oncicola venezuelensis* mostrando: A. Corpo inteiro com probóscide; B. Probóscide com ganchos e pescoço; C. Probóscide globular com 36 ganchos com ponta com formado de cinzel e D. Poro genital subterminal na fêmea. 54

Figura 12. Máxima verossimilhança de *Oncicola venezuelensis* baseada com ITS1, 5.8S e ITS2 mostrando o relacionamento com outras espécies de acantocéfala. Números (%) nos braços indicam 5.000 de reamostragem de *bootstrap*. Os animais representam hospedeiros definitivos dos grupos. Os números de acesso do GenBank estão mostrados e a barra de escala indica a mutação de nucleotídeos por sítios. 57

Figura 13. Máxima verossimilhança de *Oncicola venezuelensis* baseada no gene 28S rRNA mostrando o relacionamento com outras espécies de acantocéfala. Números (%) nos braços indicam 5.000 de reamostragem de *bootstrap*. Os animais representam hospedeiros definitivos dos grupos. Os números de acesso do GenBank estão mostrados e a barra de escala indica a mutação de nucleotídeos por sítios. 58

Figura 14. Distribuição parasito-hospedeiro de espécies de *Oncicola* no Brasil 59

CAPÍTULO III

Figura 1. A. *Toxocara canis*; B. *Oncicola venezuelensis*; C. Nematoda gen. sp. Tipo 1; D. *Aspidodera raillieti*; E. *Aspidodera subulata*; F. *Aspidodera binansata*; G. *Aspidodera vazi*; H. Nematoda gen. sp. Tipo 2.; I. *Molineus* sp.; J. *Hadrostrongylus speciosum*; K. *Haemunchus* sp; L. *Trichostrongylus colubriformis* 70

Figura 2. Chave dicotômica de identificação elaborada para o diagnóstico das espécies encontradas no Parque Nacional Serra Capivara baseadas nas características morfométricas dos ovos. 71

RESUMO GERAL

SANTOS, Everton Gustavo Nunes dos. **Taxonomia e sistemática de helmintos de mamíferos silvestres do Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.** 2016. 80 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2016.

O Parque Nacional Serra Capivara (PNSC), Piauí, Brasil, possui um extraordinário cenário para estudos da biodiversidade de helmintos, principalmente de mamíferos silvestres como Gambás, Tatus, Jaguatiricas, Cachorros-do-mato, Veados-catingueiro, entre outros. Estudos prévios com ovos de helmintos colhidos de fezes recentes ou em coprólitos na região do parque indicam uma grande diversidade de helmintos intestinais em mamíferos silvestres que necessitam ser identificados. Este projeto teve como objetivo a caracterização morfológica e genética de helmintos adultos de mamíferos silvestres que habitam o PNSC, sendo apresentado em três capítulos: I- Caracterização morfológica e genética de Nematoda parasitos de gambá *Didelphis albiventris* e Tatu-verdadeiro *Dasypus novemcinctus*; II- Caracterização morfológica e genética de helmintos de Cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* e Jaguatirica *Leopardus pardalis* e III- Caracterização morfológica dos ovos de helmintos de *Mazama gouazoubira*, *Cerdocyon thous*, *Leopardus pardalis*, *Didelphis albiventris* e *Dasypus novemcinctus*. Os mamíferos encontrados mortos por atropelamento ou apreendidos de caçadores pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade foram doados para a Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM). Para fins de estudo, a FUMDHAM doou as vísceras para o Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ. Um total de 16 espécimes de mamíferos silvestres foram estudados: Veado-catingueiro, Cachorro do mato, Jaguatirica, Gambá, Tatu-verdadeiro, Cutia e Porco selvagem. Os helmintos coletados do intestino foram fixados em álcool 70% ou formol 4%. Os Nematoda foram clarificados em glicerina e os Acanthocephala corados em Carmalumen de Mayer. Alguns espécimes foram estudados por microscopia eletrônica de varredura e o DNA foi extraído para estudos genéticos. As espécies encontradas foram: *Aspidodera railletii* e *A. subulata* parasitos intestinais do gambá-de-orelha-branca e *A. binansata*, *A. vazi* e *Hadrostrongylus speciosum* parasitos do tatu *Dasypus novemcinctus*. Em Cachorro do mato foram encontrados os seguintes helmintos: *Toxocara canis*, *Ancylostoma buckleyi*, *Molineus* sp., *Oncicola canis* e mais dois Nematoda não identificados. Na Jaguatirica foram encontrados *Molineus* sp., *Physaloptera* sp. e *Oncicola venezuelensis*. Novos dados moleculares, ultraestruturais e de distribuição geográfica são apresentados e discutidos. A ocorrência de espécies de *Toxocara* e *Oncicola* em material recente e coprólitos indica que espécies destes gêneros podem estar mantendo seus ciclos de vida há milênios no Parque. A proposta de uma chave de identificação de helmintos baseada na morfometria e imagens dos ovos obtidos de fêmeas adultas, em conjunto com os dados genéticos, facilitará o diagnóstico dos ovos de helmintos de mamíferos silvestres do PNSC. Este trabalho contribui para melhor compreender a diversidade e distribuição das espécies de helmintos além de servir de base comparativa para os estudos com helmintos da fauna atual e ancestral do Parque.

Palavras-chave: morfologia, ultraestrutura, DNA, filogenia, chave de identificação de ovos de helmintos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE NEMATODA PARASITOS DE GAMBÁ <i>Didelphis albiventris</i> LUND, 1840 E TATU VERDADEIRO <i>Dasypus novemcinctus</i> LINNAEUS, 1758	
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 Obtenção dos hospedeiros	9
2.2 Análise morfológica dos parasitos	9
2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	9
2.4 Extração de DNA	9
2.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR)	10
2.6 Eletroforese e purificação dos produtos amplificados pela PCR	10
2.7 Determinação das sequências nucleotídicas	11
2.8 Análise computacional das sequências nucleotídicas	11
3. RESULTADOS	13
3.1 Parasitos de <i>Didelphis albiventris</i>	13
3.2 Parasitos de <i>Dasypus novemcinctus</i>	18
3.3 Correlação de espécies e hospedeiros de <i>Aspidodera</i> no Brasil	26
3.4 Análise filogenética baseada no gene parcial 28S rDNA	27
4. DISCUSSÃO	29
CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE HELMINTOS DE CACHORRO-DO-MATO <i>Cerdocyon thous</i> (LINNAEUS, 1766) E JAGUATIRICA <i>Leopardus pardalis</i> (LINNAEUS,1758)	
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Obtenção dos hospedeiros	35
2.2 Análise morfológica dos parasitos	35
2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	35
2.4 Extração de DNA	35
2.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR)	35
2.6 Eletroforese e purificação dos produtos amplificados pela PCR	37
2.7 Determinação das sequências nucleotídicas	37
2.8 Análise computacional das sequências nucleotídicas	37
3. RESULTADOS	38
3.1 Parasitos de <i>Cerdocyon thous</i>	39
3.2 Parasitos de <i>Leopardus pardalis</i>	50
3.3 Análise molecular e filogenia baseada na região ITS, 5,8S, ITS2 e 28S rDNA	52
4. DISCUSSÃO	68

CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS OVOS DE HELMINTOS DE <i>Mazama gouazoubira</i>, <i>Cerdocyon thous</i>, <i>Leopardus pardalis</i>, <i>Didelphis albiventris</i> E <i>Dasyus novemcinctus</i> DO PARQUE NACIONAL SERRA DA CAPIVARA, PIAUÌ, BRASIL	63
RESUMO	64
ABSTRACT	65
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS	67
3. RESULTADOS	67
4. DISCUSSÃO	72
5. CONCLUSÕES GERAIS	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	74
ANEXO	80

1 INTRODUÇÃO GERAL

O estudo da biodiversidade de parasitos vem oferecendo evidências da história e biogeografia de seus hospedeiros e outros organismos, assim como dados sobre a estrutura de comunidades em uma determinada região (BROOKS; HOBERG, 2000; POULIN; MORAND, 2000; POULIN; MORAND, 2005). Pesquisas ampliadas de biodiversidade indicam que os parasitos referidos de diferentes hospedeiros ou localidades, possibilitam realizar predições sobre a diversidade de espécies de vida livre relacionadas com a diversidade de parasitos (LAFFERTY, 2012).

A diversidade de parasitos pode ser medida em diferentes escalas, seja estudando uma única espécie, um espécime ou uma população de hospedeiros assim como uma área geográfica específica ou subdivida em escalas de estudo (POULIN; MORAND, 2005). Como exemplo, estes autores referiram estudos de helmintos de diferentes sítios do trato gastrointestinal de uma população de hospedeiros, mas é possível também exemplificar estudos com larvas e ovos de helmintos encontrados no ambiente ou em fezes.

Em 2014, Sianto et al. descreveram a biodiversidade de helmintos intestinais de felídeos através de pesquisas de ovos em coprólitos encontrados em sítios arqueológicos no sudeste do Piauí, Brasil. Neste estudo, os autores relataram ter encontrado ovos em escavações que datam de 9.000 anos. Ovos de *Spirometra* sp., *Toxocara cati* (Schrank 1788), Spirurida Chitwood 1933, Oxyuroidea Travassos 1920, *Calodium* cf. *hepaticum* (Brancoft, 1893), *Trichuris* cf. *muris* (Schrank, 1788), *Trichuris* sp., Trichuridae Railliet 1915, *Oncicola* sp. e larvas de Nematoda foram encontrados, e os autores concluíram que os felídeos possuíam um importante papel na transmissão de parasitos de importancia zoonótica.

Na mesma região, estudando a helmintofauna recente, Brandão et al. (2009) descreveram uma diversidade de ovos encontrados em fezes de mamíferos silvestres e domésticos coletadas no Parque Nacional Serra da Capivara (PNSC), Estado do Piauí, Brasil. Os pesquisadores referiram 47 morfotipos de ovos assim distribuídos: Ancilostomidae (7 morfotipos), Ascarididae (7), Aspidoderidae (com 2), Strongiloidea (5), Tricoststrongiloidea (4), Trichuroidea (3), Spiruroidea (2) e Trematoda (3 morfotipos), além de outros ovos não identificados. Estes estudos pioneiros com ovos de helmintos abriram novas perspectivas sobre a diversidade da fauna ancestral e recente de parasitos da região do PNSC (SOUZA et al., 2012). No entanto, os adultos das espécies de helmintos que mantêm seus ciclos de vida na região continuam sem uma identificação específica.

O Parque Nacional Serra da Capivara (PNSC) possui riquezas arqueológicas únicas, com a maior concentração de sítios pré-históricos das Américas, fruto de uma história geológica, climática e biológica complexa (Figura 1). Possui área de 130.000 ha com um morfoclima característico da Caatinga (clima semiárido à árido) com 17 fisionomias de vegetações distintas, constituindo um mosaico de diferentes zonas de vegetação (CHAME, 2007).

Foi em 1986 que um grupo de pesquisadores de diferentes instituições criou a Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM) com um centro de pesquisa e um museu e com um objetivo principal de preservar o parque nacional e seu acervo cultural e natural, (FUMDHAM, 2016) (Figura 2). Em 1991, o PNSC foi considerado pela Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) como Patrimônio Natural e Cultural (UNESCO, 2016). Schobbenhaus e Silva (2010) referiram que ao longo de décadas a caça e extração de madeira de modo indiscriminado contribuiu para a queda do número de espécies que mantem o equilíbrio ecológico da região. Embora não exista um número significativo de levantamentos da fauna no PNSC, é possível encontrar na localidade uma diversidade de espécies sendo algumas endêmicas da caatinga e outras de ampla distribuição geográfica presentes no Cerrado e Amazônia (SCHOBHENHAUS; SILVA, 2010). Estes autores referiram que as pesquisas da fauna atual realizadas no PNSC haviam registrado até

aquela data a ocorrência de 57 espécies de mamíferos, 208 espécies de aves, 36 de répteis, 17 de anfíbios e um número desconhecido de invertebrados.

Pesquisadores referiram nesta região do PNSC diferentes pinturas rupestres e os registros mais antigos da presença humana nas Américas, com datações que superam 50.000 anos (FUMDHAM, 2016) (Figura 3). Neste contexto, foi realizado um estudo sobre helmintos de animais em corpólitos de origem humana em populações pre-colombianas do PNSC (SIANTO, 2009).

O parque apresenta um extraordinário cenário para o aprofundamento do conhecimento de espécies de parasitos que compõem a fauna atual e pré-histórica e suas adaptações ao longo do tempo (SIANTO, 2009). Entretanto, é importante realçar que estudos da diversidade baseados nas características morfológicas de ovos ou larvas são considerados parciais, principalmente devido às semelhanças entre os tipos de ovos e pela escassez de descrições encontradas na literatura (BRANDÃO et al., 2009). Para uma identificação específica é preciso o estudo do parasito adulto coletado diretamente de seu hospedeiro em seu sítio de infecção. Neste contexto, este projeto tem como objetivo a caracterização morfológica e genética de helmintos parasitos de mamíferos silvestres que habitam o Parque Nacional Serra da Capivara, no Estado do Piauí, Brasil. Este trabalho é apresentado em três capítulos:

- (I) Caracterização morfológica e genética de Nematoda parasitos de gambá *Didelphis albiventris* e Tatu-verdadeiro *Dasybus novemcinctus*;
- (II) Caracterização morfológica e genética de helmintos de Cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* e Jaguaritica *Leopardus pardalis*;
- (III) Caracterização morfológica dos ovos de helmintos de *Mazama gouazoubira*, *Cerdocyon thous*, *Leopardus pardalis*, *Didelphis albiventris* e *Dasybus novemcinctus* do Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

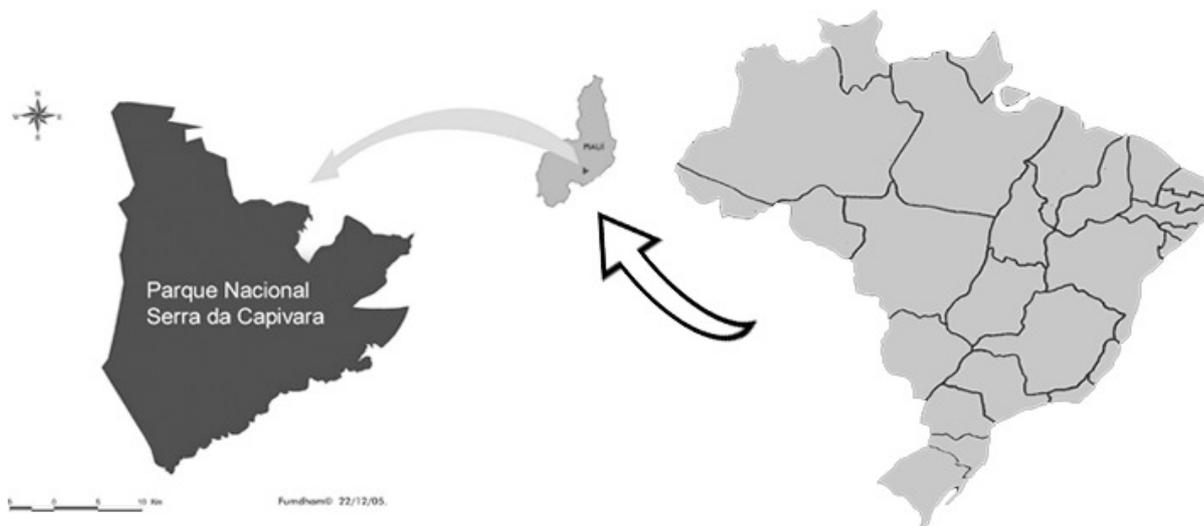


Figura 1. Parque Nacional Serra da Capivara localizado no sudeste do estado do Piauí, Brasil (FUMDHAM, 2016)



Figura 2. Fotografia da Fundação Museu do Homem Americano (www.fumdham.org.br)



Figura 3. Fotografia de pinturas rupestres nos sítios arqueológicos do Parque Nacional Serra da Capivara (www.fumdham.org.br)

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE NEMATODA PARASITOS DE GAMBÁ *Didelphis albiventris* LUND, 1840 E TATU-VERDADEIRO *Dasypus novemcinctus* LINNAEUS, 1758

RESUMO

O Parque Nacional Serra da Capivara, Estado de Piauí, Brasil apresenta um extraordinário cenário para o aprofundamento dos estudos da biodiversidade de helmintos. Possui uma fauna de mamíferos diversificada incluindo os marsupiais e tatus que são frequentemente vistos e, ocasionalmente, encontrados atropelados nas rodovias periféricas. Três espécimes de gambás *Didelphis albiventris* e dois de tatus *Dasyopus novemcinctus* foram encontrados mortos na área do parque e suas vísceras foram doadas pela Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM) para serem estudados no Instituto Oswaldo Cruz - RJ. Os helmintos coletados do intestino foram fixados em álcool 70% ou formol 4%. Foram clarificados em glicerina para estudos por microscopia de luz e alguns espécimes foram pós-fixados em 1% OsO₄ e ferrocianeto de potássio 0,8%, desidratados em série alcoólica, levados ao ponto crítico com CO₂, revestidos com ouro e examinados através da microscopia eletrônica de varredura. O DNA genômico dos parasitos foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit. Dois pares de *primers* foram desenhados para reação da cadeia da polimerase e em seguida o material foi sequenciado. As espécies encontradas foram: *Aspidodera raillieti* e *A. subulata* parasitos intestinais do gambá-de-orelha-branca e *A. binansata*, *A. vazi* e *Hadrostrongylus speciosum* parasitos do tatu *Dasyopus novemcinctus*. Novos dados ultraestruturais de *A. binansata* e *A. vazi* foram obtidos. Sequências do citocromo c-oxidase da subunidade 1 do DNA mitocondrial (mtDNA *cox1*), da região parcial 16S rDNA (rnnL), nova sequência parcial do gene 18S rDNA (SSU), espaçadores transcritos internos (ITS) 1 e 2 e o gene 5.8S rDNA, além de nova sequência parcial do gene 28S rDNA (LSU) de *A. raillieti* são apresentados. Os dados genéticos incluem a primeira sequência de SSU e LSU para *A. raillieti* e primeiro gene LSU para Aspidoderidae. Além disso, foi obtida a primeira sequência de *A. vazi* do gene parcial 16S rDNA. A análise filogenética da máxima-verossimilhança utilizando o gene LSU rDNA mostrou que Heterakoidea, representado por Aspidoderidae e Heterakidae, compõe um clado com alto suporte estatístico, considerado grupo irmão de Cosmocercoidea representado por *Rondonia rondonia* e *Orientattractis moravecii* (Atractidae). Ransomnematoida, Rhigonematoida e outros Cosmocercoidea representados por *Cosmocercoides pulcher* e *C. tonkinensis* (Cosmocercidae) formam um clado separado com alto suporte estatístico. Cosmocercoidea é considerado um grupo parafilético. Novos dados ultraestruturais, genéticos e de distribuição geográfica são apresentados e discutidos.

Palavras-chave: Nematoda, taxonomia, filogenia, Serra da Capivara, Caatinga.

ABSTRACT

The National Park Serra da Capivara, Piauí state, Brazil, presents an extraordinary scenario for improvement of the studies of helminth biodiversity. The Park has diversity mammals' species among them marsupials and armadillos are frequently seen and occasionally found dead by running over on the road. Three specimens of opossum *Didelphis albiventris* and two of armadillo *Dasypus novemcinctus* were found dead in the Park and their viscera were donated by Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM) to be studied in Instituto Oswaldo Cruz. Helminths collected in intestine were fixed in alcohol 70% or formal 4%. Parasites were clarified in glycerin for studies in microscopy of light. Some specimens were post-fixed in 1% OsO₄ and potassium ferrocyanide 0.8%, dehydrated in alcoholic series, and conducted to critical point with CO₂ coated with gold and visualized through scanning electron microscopy. Genomic DNA of the parasites was extracted using QIAmp DNA Mini Kit, and two set of primers were designed to polymerase chain reaction and amplicons sequenced. The species found were *Aspidodera raillieti*, and *A. subulata* from *Didelphis albiventris* and *A. binansata*, *A. vazi* and *Hadrostrongylus speciosum* from *Dasypus novemcinctus* from the Serra da Capivara National Park, Piauí State, Brazil were studied herein. New ultrastructural data of *A. binansata* and *A. vazi* were obtained. Sequences of cytochrome c-oxidase subunit 1 of mitochondrial DNA (mtDNA *cox-1*), partial mitochondrial 16S rDNA (rnnL), new sequence of partial 18S rDNA (SSU), internal transcriber spacers (ITS) 1, and 2 and 5.8S rDNA gene, and new sequence of partial 28S rDNA (LSU) gene of *A. raillieti* are presented. Genetic data includes the first sequence of SSU and LSU for *A. raillieti* and first LSU gene for Aspidoderidae. Additionally, first sequence of 16S rDNA of *A. vazi* was obtained. Phylogenetic analysis of maximum-likelihood using LSU gene showed Heterakoidea (represented by Aspidoderidae and Heterakidae) compose clade strongly supported (100%) and considered sister-group of Cosmocercoidea, represented by *Rondonia rondonia* and *Orientattractis moraveci* (Atractidae). Ramsonnematoidea, Rhigonematoidea and other Cosmocercoidea represented by *Cosmocercoides pulcher* and *C. tonkinensis* (Cosmocercoidea) appear in a separated clade with high statistical support. Cosmocercoidea is considered a paraphyletic group. New ultrastructural, genetic and of geographical distribution are presented and discussed.

Key words: Nematoda, Taxonomy, Phylogeny, Serra da Capivara, Caatinga.

1 INTRODUÇÃO

O Parque Nacional Serra da Capivara (PNSC), localizado no sudeste do estado do Piauí, Brasil é considerado um patrimônio da humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e Cultura (UNESCO), possuindo numerosos sítios pré-históricos representativos das Américas (FUMDHAM, 2016). Possui uma fauna de mamíferos diversificada incluindo os marsupiais e tatus que são frequentemente vistos e, ocasionalmente, encontrados atropelados nas rodovias periféricas. Dentre os marsupiais destaca-se o gambá de orelha branca *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Mammalia: Didelphidae) por ser uma espécie que pode estar presente em ambientes florestais, agrícolas e urbanos, com capacidade de coexistir com o impacto causado pelo homem em seus ambientes naturais. Possui uma distribuição que inclui o Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina, Bolívia, Equador, Peru e Colômbia (WILSON; REEDER, 2005; COSTA et al., 2008; GARDNER, 2008). Tem sido uma espécie frequentemente estudada por ser considerada reservatório de diferentes doenças de interesse médico/veterinário tais como a raiva, leishmaniose, tripanossomiase, hospedeiros de Nematoda, fungos patogênicos e ectoparasitos (SCHALLIG et al., 2007; PEIXOTO, 1998; MANGIA et al., 1999; GOMES et al., 2003; TAYLOR, 1962; MULLER et al., 2005)

Um outro mamífero comumente encontrado no Parque é o tatu-verdadeiro *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758. Esta espécie pode consumir pequenos vertebrados, ovos e carniça mas alimenta-se principalmente de invertebrados (BREECE; DUSI 1985; CUÉLLAR, 2008). Tem sido amplamente estudado principalmente por ser hospedeiro do carrapato *Amblyomma concolor* Neumann, 1899, *A. pseudoconcolor* Aragão, 1908, *A. parvum* Aragão 1908, *A. auricularium* (Conil, 1878) (SZABÓ et al. 2007), da pulga *Tunga terasma* Jordan, 1937, portador do protozoário com tripanossomas e hospedeiro para os helmintos *Ascarops* sp., *Aspidodera fasciata* (Schneider, 1866) Railliet e Henry, 1913, *Brachylaemus virginianus* Dollfus, 1935, *Hamanniella* sp., *Mazzia mazzia* Khalil & Vogelsang, 1932, *Oncicola canis* (Kaupp, 1909), *Oochoristica* sp. e *Physocephalus* sp. (FARIA-CORRÊA et al., 2012).

Estudos prévios realizados em amostras de fezes de tatus *D. novemcinctus* coletadas no parque revelaram diferentes morfotipos de ovos de Nematoda identificados como sendo de Aspidoderidae Skrjabin e Schikhobalova, 1947 e Trichostrongyloidea Cram, 1927 (BRANDÃO et al., 2009).

Entre os Aspidoderidae, as espécies de *Aspidodera* têm sido relatadas em uma ampla variedade de hospedeiros em diferentes localidades no continente americano (PROENÇA, 1937; PINTO et al., 1982; GOMES et al., 1984; SANTOS et al., 1990; FUJITA et al., 1995; CHAGAS-MOUTINHO et al., 2007, 2014; JIMENEZ-RUIZ et al., 2012). Estes parasitos são encontrados nos cecos intestinais e no intestino grosso de mamíferos das ordens Edentata, Marsupialia e Rodentia encontrados ao sul da região Neártica e Neotropical (JIMENEZ-RUIZ et al., 2012; CHAGAS-MOUTINHO et al., 2014). As características morfológicas das espécies podem ser distinguidas principalmente pelo arranjo dos cordões cefálicos que contêm seis a nove voltas longitudinais, três lábios com papilas, esôfago com um bulbo terminal, uma ventosa genital nos machos, um par de espículos e um gubernáculo, além de uma projeção digitiforme na extremidade posterior (CHAGAS-MOUTINHO et al., 2007, 2014; SANTOS et al., 1990).

Atualmente, o gênero *Aspidodera* é composto por *A. scoleciformes* (Diesing, 1851) Railliet e Henry, 1912, *A. subulata* (Molin, 1860) Railliet e Henry, 1912, *A. fasciata* (Schneider, 1866) Railliet e Henry, 1913, *A. binansata* Railliet e Henry, 1913, *A. raillieti* Travassos, 1913, *A. ansirupta* Proença de 1937, *A. vazi* Proença de 1937, *A. lacombae* Vicente, 1964, *Aspidodera esperanzae* Fujita et al., 1995, *A. sogandaresi* Jiménez-Ruiz, Gardner e Varela-Stokes, 2006 e *A. lanfredi* Chagas-Monteiro et al. 2014. Estudos moleculares de *A. raillieti* foram realizados por Jimenez-Ruiz et al. (2012, 2013), que obteve

sequências que abrangem as regiões da citocromo c-oxidase subunidade 1 (*cox1*) do DNA mitocondrial (mtDNA), 16S, ITS1, 5.8S e ITS2 do DNA ribossomal (rDNA). Sabe-se que as regiões 18S e 28S rDNA são amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas entre filos ou famílias de organismos intimamente relacionados (HILLIS; DIXON, 1991). No entanto, ainda não há sequências genéticas destas regiões para os Aspidoderidae.

Entre os Trichostrongyloidea *Hadrostrongylus speciosum* Hoppe e Nascimento, 2007, *H. ransomi* (Travassos, 1921), *Macielia macieli* (Travassos, 1915), *M. flagellata* Travassos, 1937, *Moennigia moennigi* Travassos, 1935, *M. complexus* (Travassos, 1935), *M. pinto* (Travassos, 1935), *M. littlei* Durette-Desset, 1970, *Delicata variabilis* Travassos, 1935 foram referidos em tatus no Brasil (VICENTE et al., 1997, 2011; HOPPE; NASCIMENTO, 2007).

Durante uma pesquisa de helmintos do tatu-verdadeiro *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 e do gambá-de orelha-branca *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) encontrados mortos no Parque Nacional Serra da Capivara, foram encontrados Nematoda Aspidoderidae e Trichostrongyloidea que serão apresentados com dados morfológicos, ultraestruturais e genéticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos hospedeiros

Três adultos sendo um macho e duas fêmeas de *Didelphis albiventris* (Figura 1) e dois *Dasyurus novemcinctus* (Figura 2) sendo dois machos foram encontrados mortos no Parque Nacional Serra da Capivara (08°26'50,099"N à 08°54'23,365"S e 08°36'33,681"L à 08°46'28,382"O) por atropelamento nas estradas ou apreendidos de caçadores pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) foram doados para a Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM). Para fins de estudo, a FUMDHAM doou as vísceras para o Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ - Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental. Os animais foram necropsiados, o trato digestório foi removido e amarrado com barbante da região anterior até posterior, com separações entre o esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso.

2.2. Análise morfológica dos parasitos

Os parasitos encontrados no conteúdo gastrointestinal que havia sido congelado foram lavados em solução salina (0,7%) e armazenados em álcool 70% ou em formol 4%. No laboratório, os Nematoda foram montados em glicerina para a identificação morfológica. As medidas foram feitas com ocular micrométrica do Microscópio Leica DM LS2 e são apresentadas em micrometros (μm), salvo indicação contrária, com amplitude entre parênteses. Os desenhos foram feitos em câmara clara e redesenhados no programa Adobe Illustrator CS6. Os espécimes foram depositados em álcool 70% na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os parasitos foram lavados em tampão 0,1 M cacodilato pH 7,2, pós-fixados em 1% OsO₄ e ferrocianeto de potássio 0,8% por 1h e desidratados em séries decrescentes de solução de etanol (30–100%) 1h em cada etapa, levados ao ponto crítico em CO₂, revestidos com ouro e examinados nomicroscópio Jeol JSM 6390.

2.4. Extração de DNA

O DNA genômico de cada um dos parasitos foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Os parasitos foram colocados individualmente em tubos de 1,5 mL e lavados em solução fisiológica 0,7%. Os parasitos foram macerados com ponteira e em seguida foi adicionado ao tubo 80 μL de tampão fosfato salino (PBS), 100 μL do tampão ATL do kit, e 20 μL de Proteinase K (Promega, Madison, EUA). O material foi homogeneizado e incubado a 56 °C até a lise completa do tecido. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 s. Em seguida foram adicionados 200 μL do tampão AL do kit e a amostra homogeneizada por 15 s e incubada a 70 °C por 10 min. Após nova homogeneização, foram adicionados 200 μL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 s. A mistura foi aplicada à mini coluna e foi centrifugada a 8000 rpm por 1 min. O resíduo foi descartado e na mini coluna foi adicionado 500 μL do tampão AW1 do kit para em seguida ser centrifugado a 8000 rpm por 1 min. O resíduo foi novamente descartado. Na mini coluna foram adicionados 500 μL do tampão AW2 do kit para em seguida ser centrifugada a 14000 rpm por 3 min. Após o descarte do resíduo foram

adicionados 40 µL do tampão AE do kit e os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 5 min. e depois centrifugados a 8000 rpm por 1 min. O material foi congelado para análise posterior.

2.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas para as regiões gênicas: subunidade menor do DNA ribossomal (18S rDNA), subunidade maior do DNA ribossomal (28S rDNA), região ITS1, 5.8 e ITS2 rDNA e Citocromo c-Oxidase I do DNA mitocondrial (mtDNA *cox1*) e o gene 16S rDNA. Todas as reações feitas tiveram um volume final de 15 µL sendo 7,5 µL de 2 × GoTaq® Colorless Mastermix (Promega, Madison, WII - USA), 1,5 µL de cada oligonucleotídeo (concentração final de 0,5 pmol), 0,5 µL de MgCl₂ (concentração final de 1,6 mM), 2,5 µL de DNA e água ultrapura para completar. As PCRs foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler Personal - Eppendorf.

Para amplificar o gene 18S rDNA de *Aspidodera* spp. utilizamos um novo iniciador direto desenhado para este estudo Asp18SF (5'- CGTTCCGTCGGCGGTAAATATG-3') e um iniciador reverso conhecido 136 (5'- TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') nas seguintes condições: pré-aquecimento a 94 °C por 3 min., seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 59,5 °C por 30 s, 72 °C por 60 s e 72 °C por 5 min. Para amplificar a região ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA nos utilizamos um conjunto de iniciadores desenhado para este estudo Asp_ITS_F (5'-GTTGCTGCATGCTTGAAAGT-3') e Asp_ITS_R (5'-GCACTAGCGGAATACTCCTAAC-3') nas seguintes condições: pré-aquecimento a 94 °C por 2 min., seguido de 40 ciclos a 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 60 s e 72 °C por 7 min.

Para amplificar a região parcial do gene 28S rDNA novos iniciadores foram desenhados para este estudo Asp_28SF (5'- AAGCCAGCGCTGAATCCATTA -3') e Asp_28SR (5'-TCAACTTTCACACCGAGAGGCTA -3') e utilizados nas seguintes condições: pré-aquecimento a 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 60 s, e 72°C por 7 min.

Para a região gênica mtDNA *cox1* foi utilizado o conjunto de iniciadores 'cocktail' segundo Prosser et al. (2013) com os iniciadores direto NemF1_t1 (tgtaaacgacggccagtCRACWGTWAATCAYAARAATATTGG), NemF2_t1 (tgtaaacgacggccagtARAGATCTAATCATAAAGATATYGG) e NemF3_t1 (tgtaaacgacggccagtARAGTTCTAATCATAAARGATATTGG). Os iniciadores reversos foram NemR1_t1 (caggaaacagctatgactAACTTCWGGRTGACCAAAAAATCA), NemR2_t1 (caggaaacagctatgactAWACYTCWGGRTGMCCAAAAAYCA) e NemR3_t1 (caggaaacagctatgactAAACCTCWGGATGACCAAAAAATCA). As amostras submetidas ao seguinte ciclo: pré-aquecimento 94 °C por 1 min., seguidos de 5 ciclos de 94 °C por 40 s, 45 °C por 40 s, 72 °C por 1 min seguido de 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 51 °C por 40 s, 72 °C por 1 min, com extensão final de 72 °C por 5 min.

Para amplificar o gene 16S rDNA foram utilizados o iniciador direto 16SCE 5' ATTCTATCTCACAATGAATTAAC 3' e iniciador reverso C2F3 5' CGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG 3' nas seguintes condições: pré-aquecimento a 94°C por 4 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 45 s, 70°C por 60 s, e 72°C por 5 min (JIMENEZ et al., 2012).

2.6 Eletroforese e purificação dos produtos amplificados pela PCR

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5 % corado com SYBERGREEN 10000X (Promega, Madison, WII - USA). Foram utilizados 5 µL de peso molecular

(Promega), 5 µL de produto da PCR com 1 µL de corante em cada poço, sendo submetidas à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 90V e posteriormente visualizados no transiluminador sob luz ultravioleta. Os resultados da PCR foram registrados fotograficamente com câmera fotográfica (Sony Cybershot DSC-W180). Na purificação das amostras adicionou-se 2 µL de EXOSAP-IT (Affymetrix, EUA) ao restante do produto da PCR, levando as amostras ao termociclador sob as seguintes condições: aquecimento de 37 °C por 25 min seguido de 80 °C por 15 min.

2.7 Determinação das sequências nucleotídicas

As amostras purificadas foram encaminhadas para a reação de sequenciamento nucleotídico com o conjunto de diagnóstico ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems-Perkin Elmer, EUA) de acordo com o protocolo utilizado pela Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz. Na reação de sequenciamento foram utilizados 1,5 µL de Big Dye, 1,25 µL de tampão, utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores da PCR, com exceção aos utilizados para amplificar a região *cox1* em que o conjunto de iniciadores foram M13F (5'TGTAAAACGACGGCCAGT'3) e M13R (5'CAGGAAACAGCTATGAC'3). Em todas as reações utilizamos os iniciadores na concentração de 3,2 pmol/µL, 3,0-5,0 µL de produto da PCR purificado e água para completar a reação para o volume final de 10 µL. A reação foi submetida a 40 ciclos de sequenciamento com 94 °C por 30 s, 50 °C por 10 s, 60 °C por 4 min. Ambas as fitas foram analisadas no sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems-Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA) da plataforma PDTIS-Fiocruz.

2.8 Análise computacional das sequências nucleotídicas

As sequências foram obtidas em forma de cromatogramas e analisadas no programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013). O alinhamento foi realizado pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). Para a análise de similaridade foi utilizado o servidor BLAST 2.2 (“Basic Local Alignment Search Tool”) (ALTSCHUL et al., 1990) do ‘National Center for Biotechnology Information’ (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (‘National Institute of Health’), Maryland, EUA (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). O alinhamento das sequências deste estudo com as sequências depositadas no GenBank serviu como base para a construção de árvores filogenéticas, utilizando o software MEGA 6.0.

As reconstruções filogenéticas foram realizadas através da Máxima Verossimilhança (MV) construída com o programa PhyML 3.1 e o suporte estatístico dos nós foi estimado por 1000 réplicas de *bootstrap* (SWOFFORD, 2002). O melhor modelo de substituição de nucleotídeo para a região parcial da 28S rDNA foi o modelo GTR+I+G selecionado pelo Critério de Informação de Akaike (CIA) pelo MrModeltest2 com auxílio do PAUP4.0a147 (NYLANDER, 2004). A topologia da árvore foi visualizada no FigTree 1.4.2.



Figura 1. *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) adulto encontrado morto no Parque Nacional Serra da Capivara (Fotografia: Everton Gustavo)



Figura 2. *Dasypus novemcinctus* (Linnaeus, 1758) adulto encontrado morto no Parque Nacional Serra da Capivara (Fotografia: Everton Gustavo).

3 RESULTADOS

Neste estudo foram encontradas duas espécies de Nematoda parasitando o gambá-de orelha-branca, *Aspidodera raillieti* e *A. subulata*. No tatu-verdadeiro, 193 exemplares do gênero *Aspidodera* foram recuperados em um dos dois tatus examinados. Alguns dos espécimes estavam em boas condições para estudo, mas a maioria apresentava um estado acentuado de degradação devido ao longo período de congelamento, não sendo utilizados no diagnóstico específico. As espécies identificadas do tatu incluem *Aspidodera binansata*, *A. vazi* e *Hadronstrongylus speciosum*. As cinco espécies foram identificadas segundo Vicente et al. (1966, 1997), Santos et al. (1990), Chagas-Moutinho et al. (2007), Hoppe e Nascimento (2007) e Jimenez-Ruiz et al. (2012) e são descritas abaixo de acordo com os hospedeiros.

3.1 Parasitos de *Didelphis albiventris*

Classe Mammalia
Ordem Didelphimorphia
Família Didelphidae

Aspidodera raillieti Travassos, 1913
(Figuras 3A-B)

Sítio: Cecos e intestino grosso.

Prevalência: 2 de 3 espécimes necropsiados (66%).

Intensidade: 26 e 72 parasitos.

Espécimes depositados: CHIOC nº 38.352

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Macho (*baseado em dez espécimes*): Comprimento do corpo 6445 (5600-7550), largura na região mediana do corpo 577 (500-665). Capuz cefálico 130 (110-140), cordões cefálicos 74 (60-90) de comprimento (Figura 3A). Razão capuz cefálico/comprimento do corpo 1:41-58. Esôfago 779 (700-970) de comprimento; bulbo 207 (200-225) de comprimento e 177 (165-195) de largura (Figura 3A). Anel nervoso a 261 (250-275) e poro excretor 616 (585-650) de distância da extremidade anterior. Espículos iguais em tamanho e forma, 1025 (950-1200) de comprimento com uma ponta ligeiramente arredondada. Gubernáculo 195 (185-205) de comprimento. Ventosa genital 117 (105-135) de comprimento, situado 80 (70-90) da cloaca (Figura 3B). Espinho caudal 41 (35-50) de comprimento. Observou-se 17 pares de papilas, sendo 5 pares precloacais, 1 par adcloacal e 11 pares pós cloacais.

Fêmea (*baseado em dez espécimes*): Comprimento do corpo 8748 (7800-9790), largura de 858 (740-970) na região da vulva. Capuz cefálico 174 (155-200) e cordões cefálicos 96 (85-110) de comprimento. Esôfago 832 (775-925) de comprimento; bulbo 258 (200-300) de comprimento e 195 (175-205) de largura. Anel nervoso a 225 (190-235) e poro excretor 447 (425-475) de distância da extremidade anterior. Abertura da vulva situada a 2990 (2300-3430) da extremidade cefálica. Cauda longa e fina, com ânus subterminal, 1273 (1190-1390). Ovos elipsoides, 64 (50-72,5) de comprimento e 45 (42,5-47,5) de largura.

A ultraestrutura revelou capuz cefálico formado por três lábios, um dorsal e dois ventrolaterais, cada um com projeção fina para a região posterior (Figura 4A). Linha lateral é observada na Figura 4 A. Os lábios ventrolaterais apresentam um par de papilas e um anfídeo. Foram observadas projeções interlabiais com estrutura similar a um poro. A projeção entre os lábios ventrolaterais e o dorsal são mais finas do que a observada entre os lábios ventrolaterais. Papilas são visualizadas abaixo do capuz cefálico (Figura 4B). A cauda do macho apresenta ventosa genital precloacal bem delimitada com 2 pares de papilas (um par na borda anterior e um na posterior) e cloaca com ponta do espículo proeminente (Figura 4 C-D).

As sequências de *A. raillieti* obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank como mtDNA *cox1* n° de acesso KX962175 com 600 pb; a região parcial 16S rDNA n° KX954131 com 930 pb; nova sequência da região parcial 18S rDNA n° KX954128 com 722 pb; ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA n° KX954129 com 765 pb e nova sequência da região parcial 28S rDNA KX954130 com 726 pb. Nossas sequências do ITS1, 5.8S e ITS2 e 16S, e do *cox1* mtDNA de *A. raillieti* obtidas neste trabalho são similares a sequência de *A. raillieti* depositado no GenBank com número de acesso, JQ995300, KC470125, JN852767 respectivamente, enquanto que a nova sequência do gene 18S rDNA foi similar a *Aspidodera* sp. (EF180070), e para a região 28S rDNA foi similar a *Strongyluris calotis* (Heterakidae) (LC133188).

O resultado do BLAST indicou que a região *cox1* mtDNA apresentou 81% de cobertura e 94% de identidade com *A. raillieti* (KC470125) com escore máximo de 734. Para a região 16S rDNA foi encontrado 96% de cobertura e 95% de identidade com *A. raillieti* (JN852767) com escore máximo de 1408. A região ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA indicou 100% de cobertura e 99% de identidade com *A. raillieti* (JQ995300) com escore máximo de 1402. Para a nova região 18S rDNA indicou 100% de cobertura e 99% de identidade com *Aspidodera* sp. (EF180070), com escore máximo de 1328, e para a nova região 28S rDNA foi encontrado 100% de cobertura e 90% de identidade com *S. calotis* (LC133188) com escore máximo de 950.

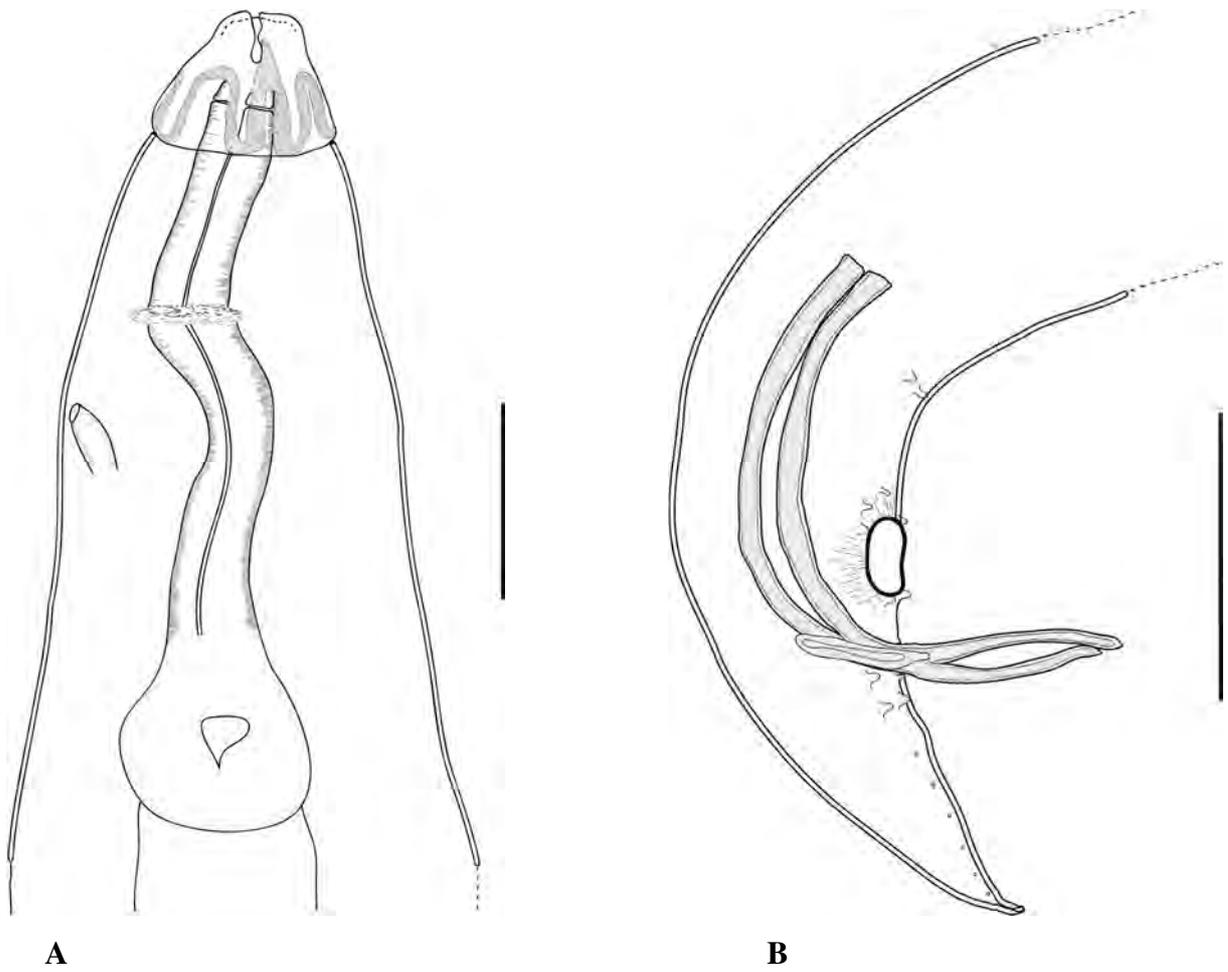


Figura 3. Desenho em câmara clara de *Aspidodera raillieti*. A. Região anterior mostrando três lábios, capuz cefálico, cordões cefálicos, vestíbulo, anel nervoso, esôfago com um bulbo terminal (Barra: 200 μm); B. Cauda do macho com um par espículos longos, gubernáculo, ventosa genital e papilas caudais (Barra: 500 μm).

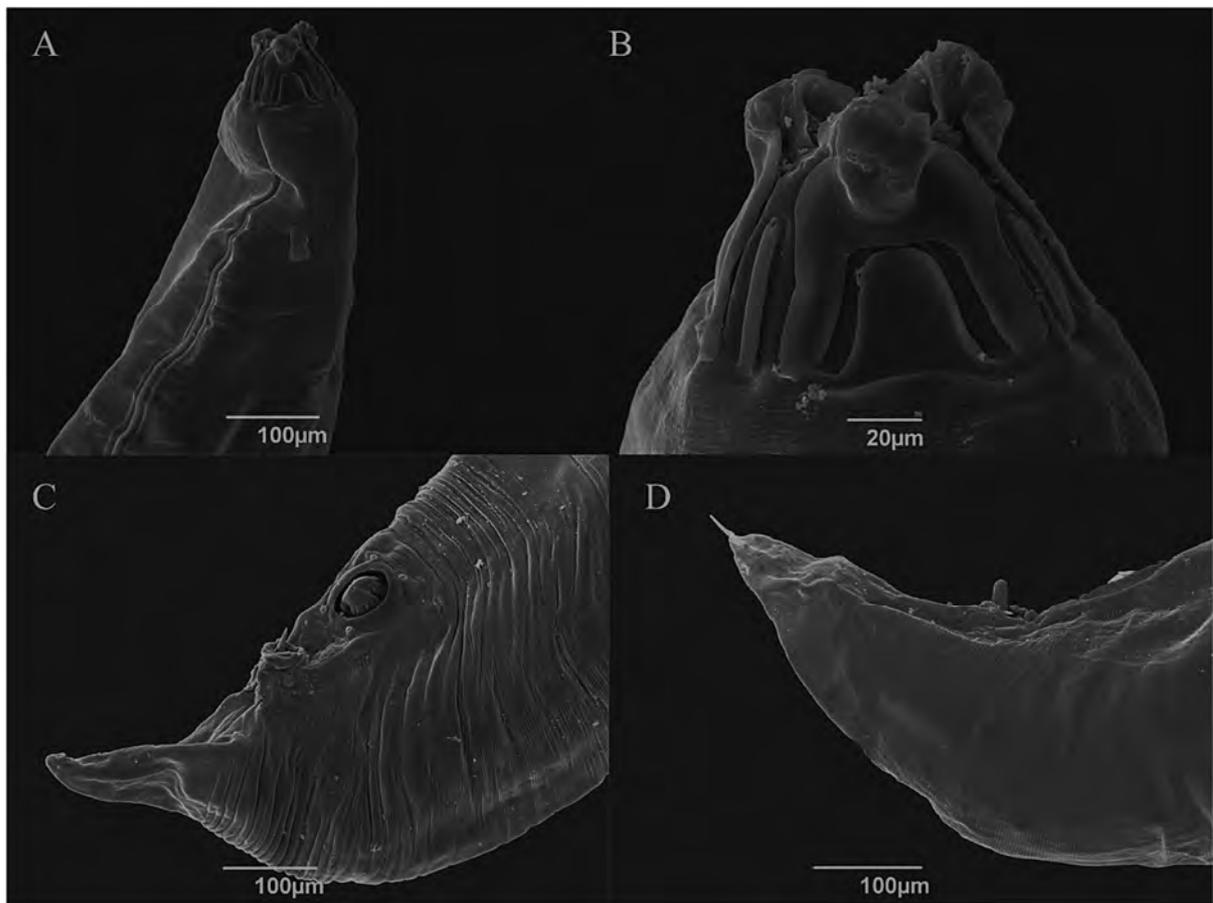


Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Aspidodera railletii*. A. Região anterior com capuz cefálico e cordões cefálicos; B. Detalhes do capuz cefálico e dos cordões cefálicos demonstrando um lábio dorsal e dois ventrolaterais; C. Cauda do macho demonstrando uma cutícula estriada, uma ventosa genital e cloaca com a ponta do gubernáculo; D. Cauda do macho com a ponta arredondada de um dos espículos.

Aspidodera subulata (Molin 1860) Raillieti e Henry, 1912
(Figuras 5A-B)

Sítio: Cecos e intestino grosso.

Prevalência: 1 de 3 espécimes necropsiadas (33%).

Intensidade: 1 parasito.

Material depositado: CHIOC n°38.353

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Fêmea (*baseado em um espécime*): Comprimento do corpo 7100 e largura 830 na região da vulva. Capuz cefálico 140 e cordões cefálicos com 85 de comprimento. Esôfago 775 de comprimento, com bulbo 225 de comprimento e 200 de largura. Anel nervoso a 250 da extremidade anterior. Poro excretor não observado. Vulva a 2490 de distância da extremidade anterior. Abertura anal subterminal a 650 da região posterior. Ovos 67 (62,5-72,5) de comprimento e 46 (42,5-50) de largura.

Não foi possível realizar estudo genético e ultraestrutural de *A. subulata* pela escassez de material.

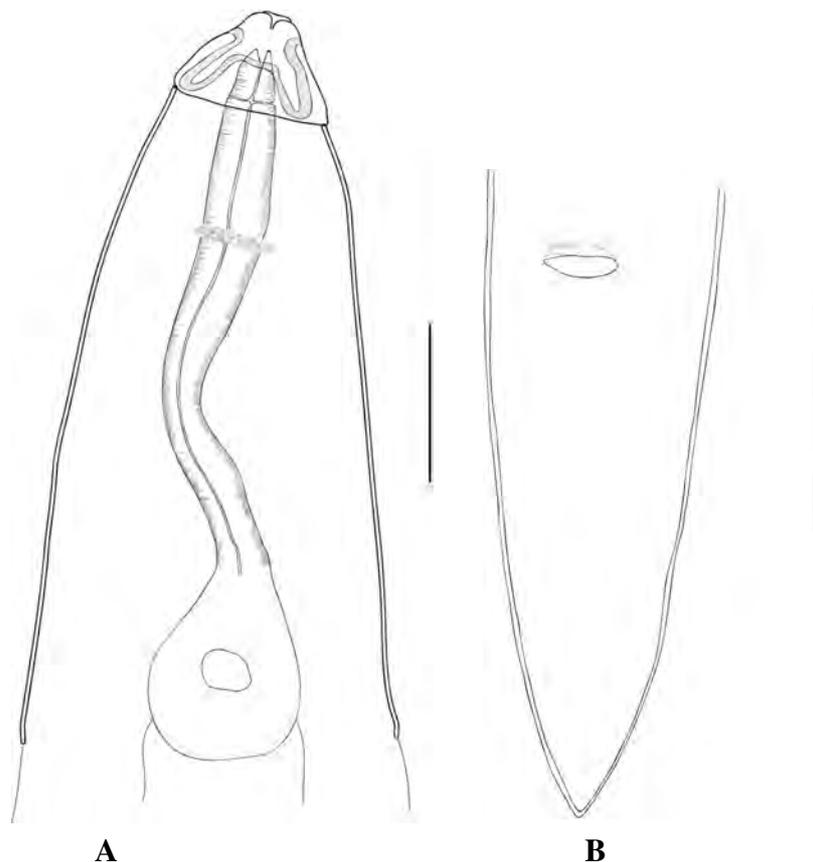


Figura 5. Desenho em câmara clara de *Aspidodera subulata*. A. Região anterior demonstrando o capuz cefálico com três lábios, cordões cefálicos curtos, vestibulo, altura do anel nervoso, esôfago longo com um bulbo terminal; B. Cauda da fêmea demonstrando a posição do ânus (A e B, barra: 200 μ m).

3.2 Parasitos de *Dasyopus novemcinctus*

Classe Mammalia
Ordem Cingulata
Família Dasypodidae

Aspidodera binansata Railliet e Henry, 1913
(Figuras 6A-B)

Sítio: Cecos e intestino grosso.

Prevalência: 1 de 2 espécimes (50%)

Intensidade: 26 parasitos.

Espécimes depositados: CHIOC nº 38.351.

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Macho (*baseado em dez espécimes*): Comprimento do corpo 6483 (6000-7500), largura 368 (320-460) na região mediana do corpo. Capuz cefálico 150 (130-160) e cordões cefálica 104 (88-115) de comprimento. Relação comprimento capuz cefálico/corpo 1:37-50. Esôfago 1148 (1020-1280) de comprimento; bulbo 198 (173-250) de comprimento e 178 (145-220) de largura. Anel nervoso a 444 (350-500) e poro excretor a 607 (550-660) da região anterior. Espículos iguais na forma e tamanho, 322 (300-335), com a ponta ligeiramente arredondada. Gubernáculo 156 (140-165) de comprimento. Ventosa genital 116 (105-135) de comprimento e situado próximo a cloaca 23 (10-40). Espinho caudal 112 (100-125) de comprimento. Observou-se 32 pares de papilas, 8 pares precloacal, 1 par adcloacal e 24 pósclouacal.

Fêmea (*baseado em dez espécimes*): Comprimento do corpo 7093 (5625-7750), largura de 457 (370-510) na região da vulva. Capuz cefálico 163 (125-175) e cordões cefálica 113 (100-125) de comprimento. Relação comprimento capuz cefálico/corpo 1:40-46. Esôfago 1206 (1100-1270) de comprimento; bulbo 196 (163-225) de comprimento e 195 (175-208) de largura. Anel nervoso 536 (500-600) e poro excretor 720 (670-800) da extremidade anterior. Abertura da vulvar 4050 (3500-4750) da extremidade anterior. Cauda longa e fina, com abertura anal subterminal a 1008 (825-1200) da ponta da cauda. Ovos 64,3 (57,5-70) de comprimento e 45,6 (42,5-50) de largura.

A ultraestrutura da região anterior evidenciou capuz cefálico com três lábios. Projeções digitiformes presentes nas laterais dos lábios. Há uma projeção interlabial longa que chega até a base do capuz cefálico. Pequenas papilas foram observadas abaixo do capuz cefálico (Figura 7A-B).

Sete espécimes foram utilizados na extração de DNA mas nenhum produto de PCR foi gerado.

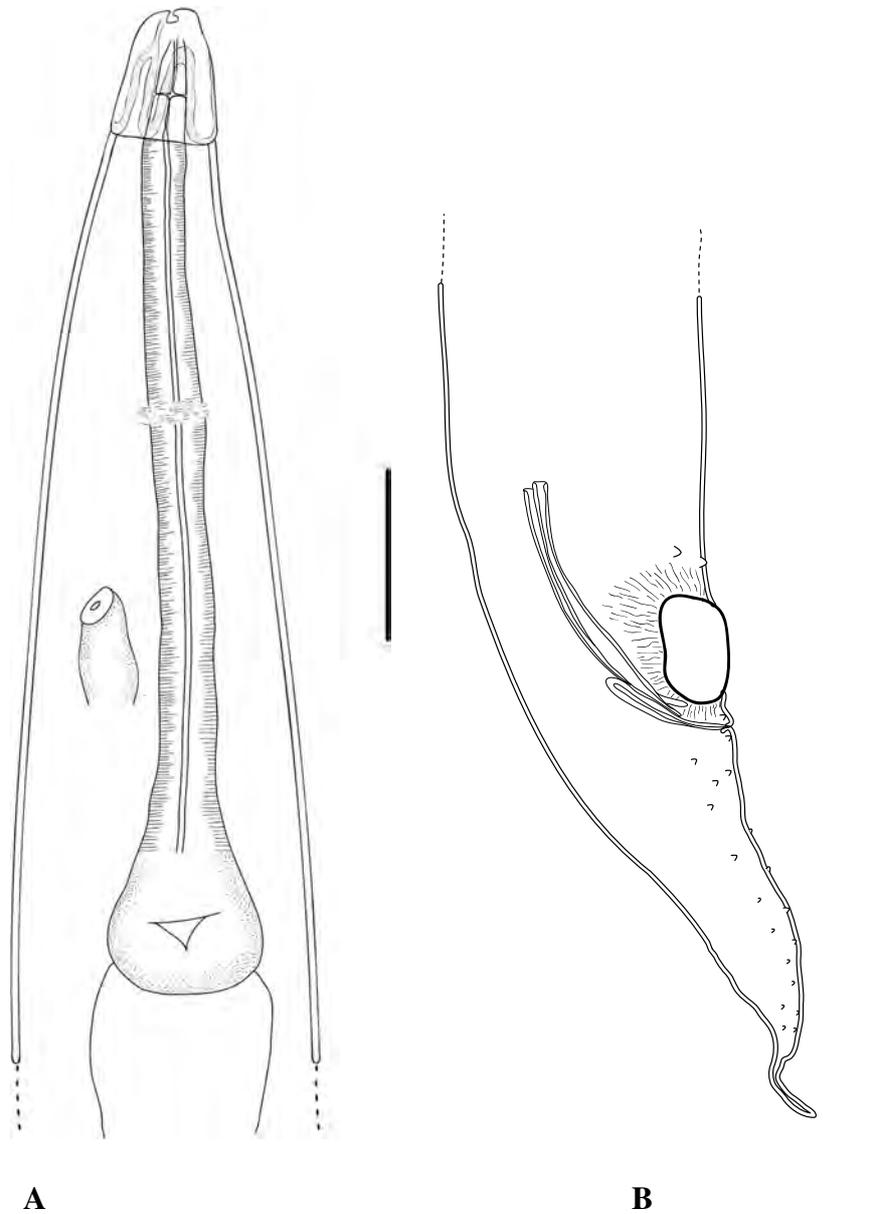


Figura 6. Desenho em câmara clara de *Aspidodera binansata*. A. Região anterior demonstrando o capuz cefálico três lábios, cordões cefálicos, vestíbulo, ânus longo e bulbo na porção terminal do esôfago (Barra: 200 μm); B. Cauda do macho com um par espículos, gubernáculo, ventosa genital, papilas caudais e uma cauda com espínho terminal (Barra: 500 μm).

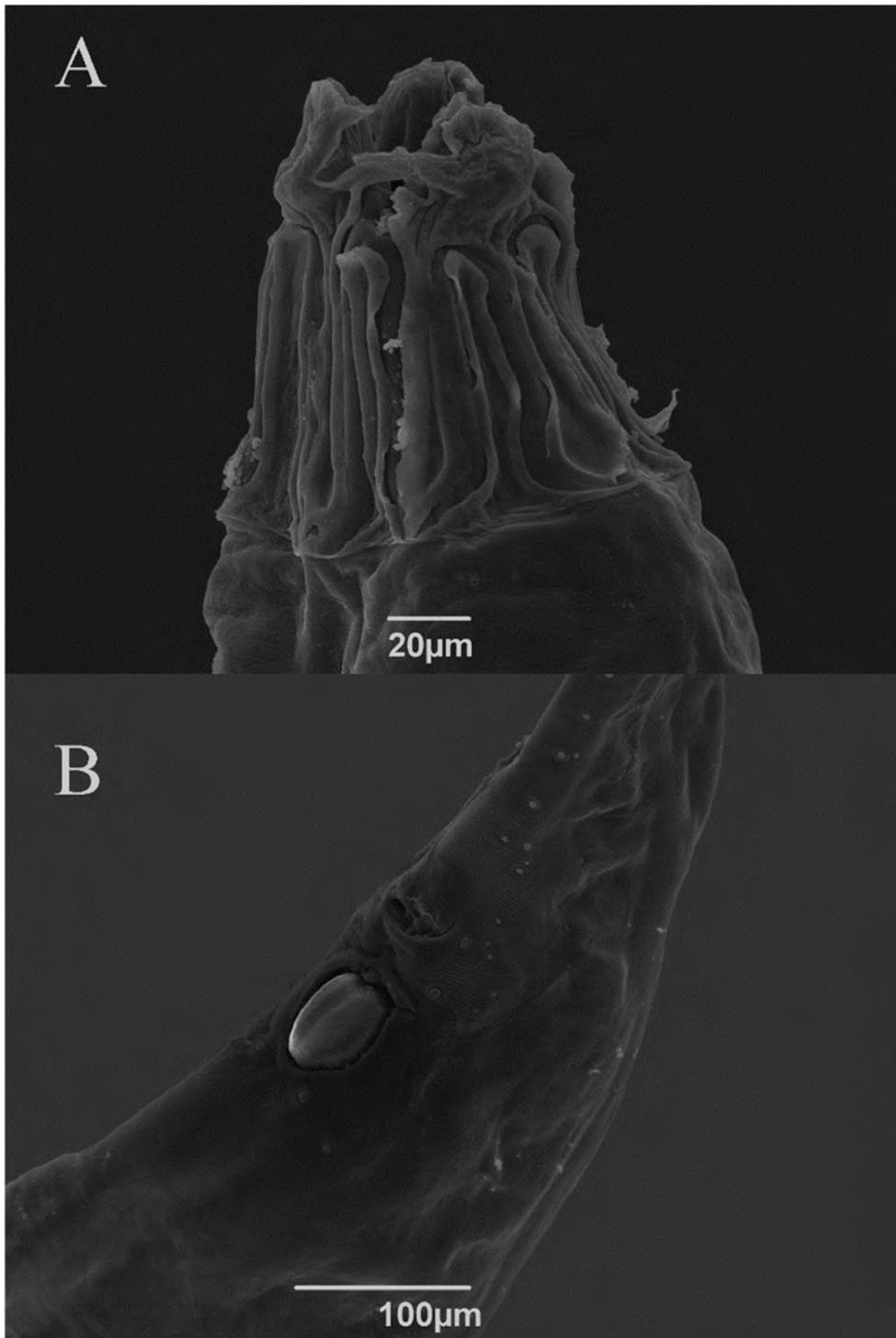


Figura 7. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Aspidodera binansata*. A. Detalhes do capuz cefálico e dos cordões cefálicos com voltas por todo capuz; B. Cauda do macho demonstrando uma ventosa genital, cloaca e detalhes da distribuição das papilas caudais.

Aspidodera vazi Proença 1937
(Figura 8A-B)

Sítio: Cecos e intestino grosso.

Prevalência: 1 em 2 espécimes (100%)

Intensidade: 25 parasitos.

Espécimes depositados: CHIOC nº 38.354.

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Macho (*baseado em 15 espécimes*): Comprimento do corpo 7485 (6250-8625), largura na região mediana do corpo 347 (250-510). Capuz cefálico 363 (337-395) e cordões cefálicos 311 (277-333) de comprimento. Relação extremidade cefálica/comprimento do corpo 1:18-23. Esôfago 1159 (1000-1400) de comprimento; bulbo 182 (150-250) de comprimento e 166 (125-250) de largura. Anel nervoso a 717 (650-750) e poro excretor 993 (780-1200) de distância da região anterior. Espículos iguais em forma e tamanho, 822 (650-1225) de comprimento. Gubernáculo 156 (145-180) de comprimento. Ventosa genital 122 (100-150) de comprimento e situado próximo à cloaca 45 (25-55). Espinho caudal 118 (50-200). Observou-se 26 pares de papilas, 3 pares précloacal, 1 par adcloacal e 23 pós-cloacal.

Fêmea (*baseado em dez espécimes*): Comprimento do corpo 7345 (6950-8000) e largura de 355 (280-490) na região da vulva. Capuz cefálico 438 (378-478) e cordões cefálica 338 (313-375) de comprimento. Relação extremidade cefálica/comprimento do corpo 1:15-19. Esôfago 1379 (1210-1530) de comprimento; bulbo 211 (175-238) de comprimento e 192 (173-213) de largura. Anel nervoso a 723 (680-800) e poro excretor 892 (800-980) de distância da extremidade anterior. Abertura da vulvar 2763 (2500-3500) da extremidade cefálica. Cauda longa e fina, com abertura anal subterminal 677 (575-750) da ponta da cauda. Ovos com casca fina 60 (58-63) de comprimento e 52 (48-55) de largura.

A ultraestrutura demonstrou a extremidade anterior com um capuz cefálico alongado, três lábios, um dorsal e dois ventrolaterais, cada um possuindo duas projeções longas e finas para a região posterior. Da base do capuz cefálico foram observados em cada lábio uma grande projeção direcionada à extremidade anterior. Lábios ventrolaterais com um anfídeo e uma papila. Ao lado direito do ápice do lábio lateral apresenta uma projeção digitiforme. Pequenas papilas foram observadas abaixo do capuz cefálico e próximo ao poro excretor (Figura 9A-F).

Oito espécimes de *A. vazi* foram utilizados para estudos moleculares, mas apenas em um foi possível obter a região parcial do gene 16S rDNA, depositada no GenBank sob o número de acesso KX951458. A sequência de 16S rDNA foi similar a *Haemonchus contortus* (EU346694) indicando 12% cobertura e 92% de identidade e escore máximo de 134. Entre os Aspidoderidae, *Paraspidodera uncinata* (JN852763) apresentou apenas 10% de cobertura e 89% de identidade com escore máximo de 93,5.

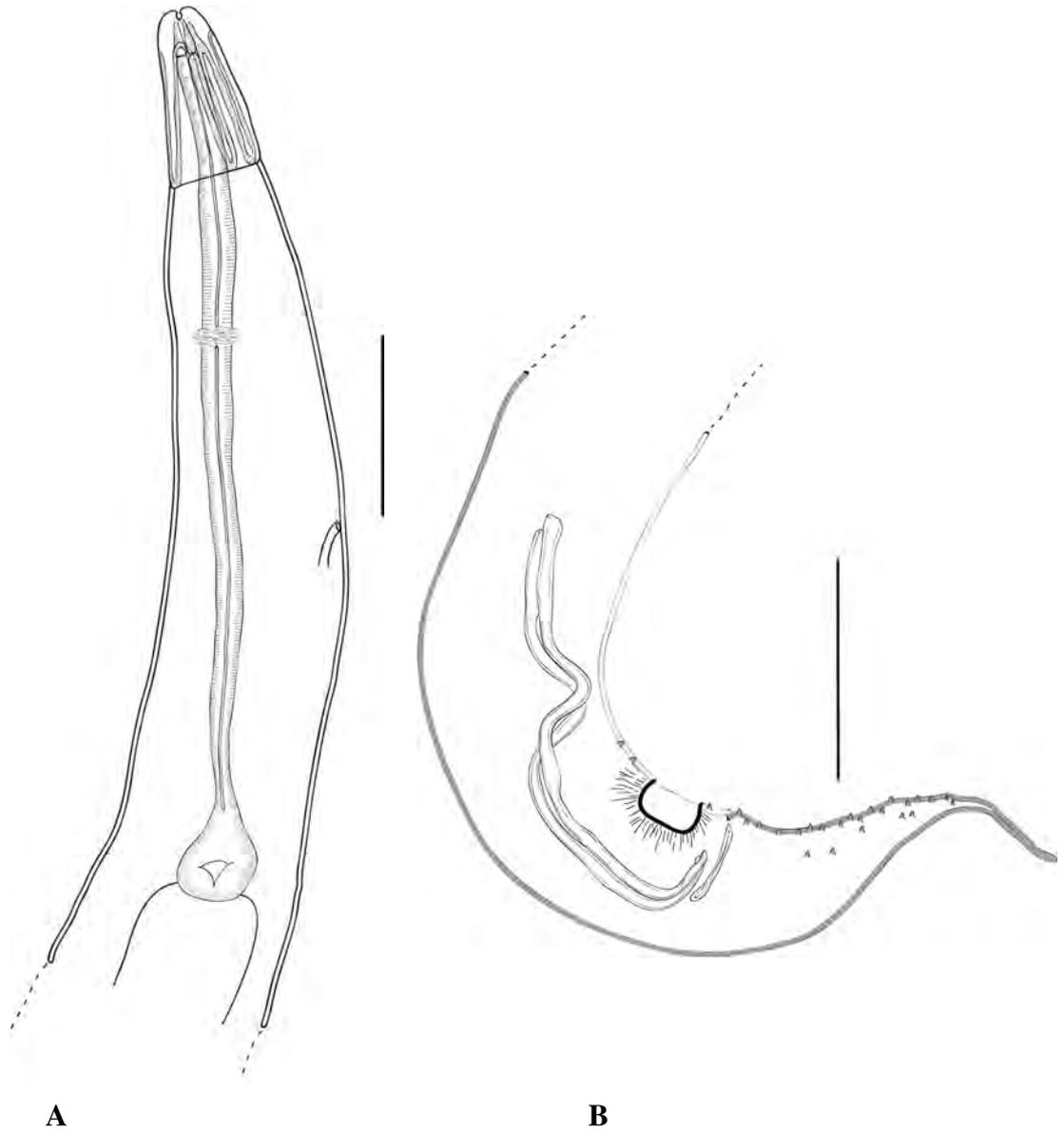


Figura 8. Desenho em câmara clara de *Aspidodera vazi*. A. Região anterior demonstrando o capuz cefálico alongado, cordões cefálicos alongados, vestibulo, altura do anel nervoso, esôfago longo e bulbo na porção terminal do esôfago; B. Cauda do macho com um par espículos longo, gubernáculo, ventosa e papilas caudais e um espínho caudal longo (A e B, barra: 400 μ m).

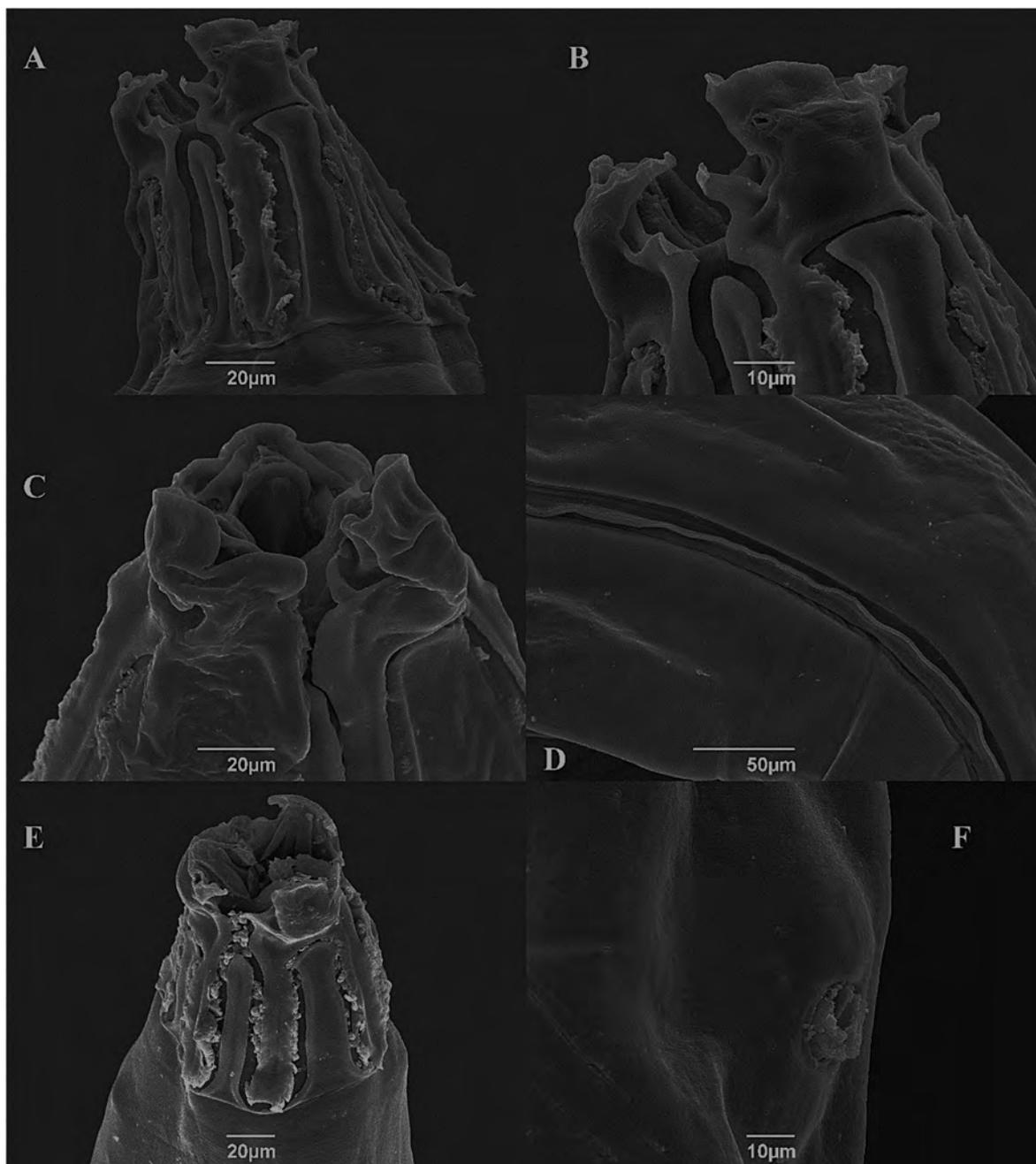


Figura 9. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Aspidodera vazi*. A. Detalhes do capuz cefálico alongado e cordões cefálicos alongados; B. Observa-se as papilas labiais no lábio dorsal; C. Cavidade oral e detalhes dos lábios; D. Linha lateral no corpo; E. Detalhes do capuz cefálico e um lábio dorsal e dois ventrolaterais; F. Detalhes do poro excretor.

Hadrostrongylus speciosum Hoppe e Nascimento, 2007
(Figura 10A-D)

Trichostrongyloidea Cram, 1927
Molineidae Skrjabin e Schulz, 1937
Anoplostrongylinae Chandler, 1938

Sítio: Cecos e intestino grosso.

Prevalência: 1 de 2 espécimes (50%).

Intensidade: 37 parasitos.

Material depositado: CHIOC nº 38.355.

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Macho (*baseado em dez espécimes*): Comprimento do corpo 4287 (3825-4750) e 126 (105-150) de largura. Dilatação cefálica 39. Anel nervoso a 153 (145-160). Esôfago 287 (275-310) de comprimento. Espículos desiguais, o maior 196 (187-212) e o menor 155 (137-170) de comprimento. Gubernáculo 123 (112-137) de comprimento. Bolsa copuladora trilobada (tipo 2-1-2), 134 (117-150) de comprimento e 167 (125-192) de largura. Raios 2-3 unidos em toda extensão originados de um tronco comum. Raios 4-6 emergem em tronco comum. Raio 4 é curto e mais grosso do que os outros, separado na base dos raios 5-6. Raio dorsal grosso, bifurcado na extremidade distal.

Fêmea (*baseado em dez espécimes*): Comprimento do corpo 5740 (5125-6625) e 142 (100-165) de largura na região da vulva. Esôfago 330 (280-360) de comprimento. Anel nervoso a 130 (100-165). Vulva 1110 (875-1250) da extremidade anterior. Ramo anterior da *vagina vera* 201 (180-225) e ramo posterior 135 (125-145) de distância da vulva. Abertura anal subterminal 119 (110-150). Ovos com casca fina, elípticos 54 (50-57,5) de comprimento e 31,1 (27,5-32,5) de largura. Cauda da fêmea com um espinho terminal.

Cinco espécimes foram estudados por análise molecular utilizando diferentes iniciadores genéricos para eucarioto, mas nenhum produto de PCR foi gerado.

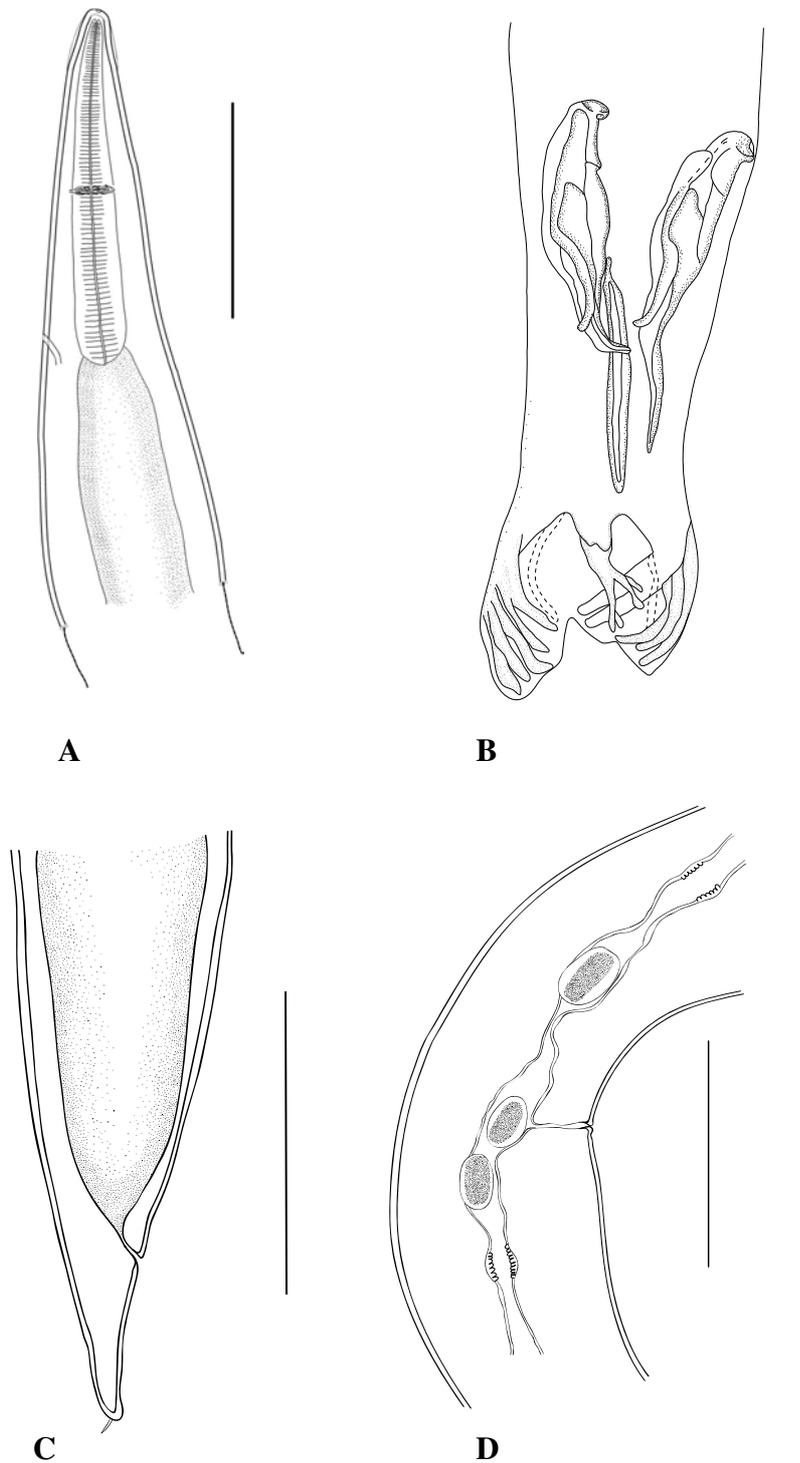


Figura 10. Desenho em câmara clara de *Hadrostrongylus speciosus*. A. Região anterior com esôfago e anel nervoso; B. Bolsa copuladora, espículos de desiguais e gubernáculo; C. Cauda da fêmea com ânus e espinho terminal. D. Útero com ovos e *vagina vera*.

3.3 Correlação de espécies e hospedeiros de *Aspidodera* no Brasil

No Brasil foram referidas nove espécies de *Aspidodera* em cinco famílias de mamíferos (Figura 11). As espécies incluem: *A. ansirupta*, *A. binansata*, *A. fasciata*, *A. lacombeae*, *A. lanfredi*, *A. raillieti*, *A. scoleciformis*, *A. subulata* e *A. vazi*. Os hospedeiros da ordem Rodentia incluem as famílias Cricetidae e Dasyproctidae.

A maior diversidade de espécies de *Aspidodera* é encontrada nos Didelphidae (6 espécies), seguido por Dasypodidae (5) e Myrmecophagidae (2) enquanto os Cricetidae e Dasyproctidae são parasitados por apenas uma espécie cada um.

Dentre as espécies de *Aspidodera*, a que tem sido mais estudada é *A. raillieti*. Tendo em vista que neste trabalho é apresentada a primeira sequência do gene 28S rDNA desta espécie, será a seguir apresentada uma nova análise filogenética.

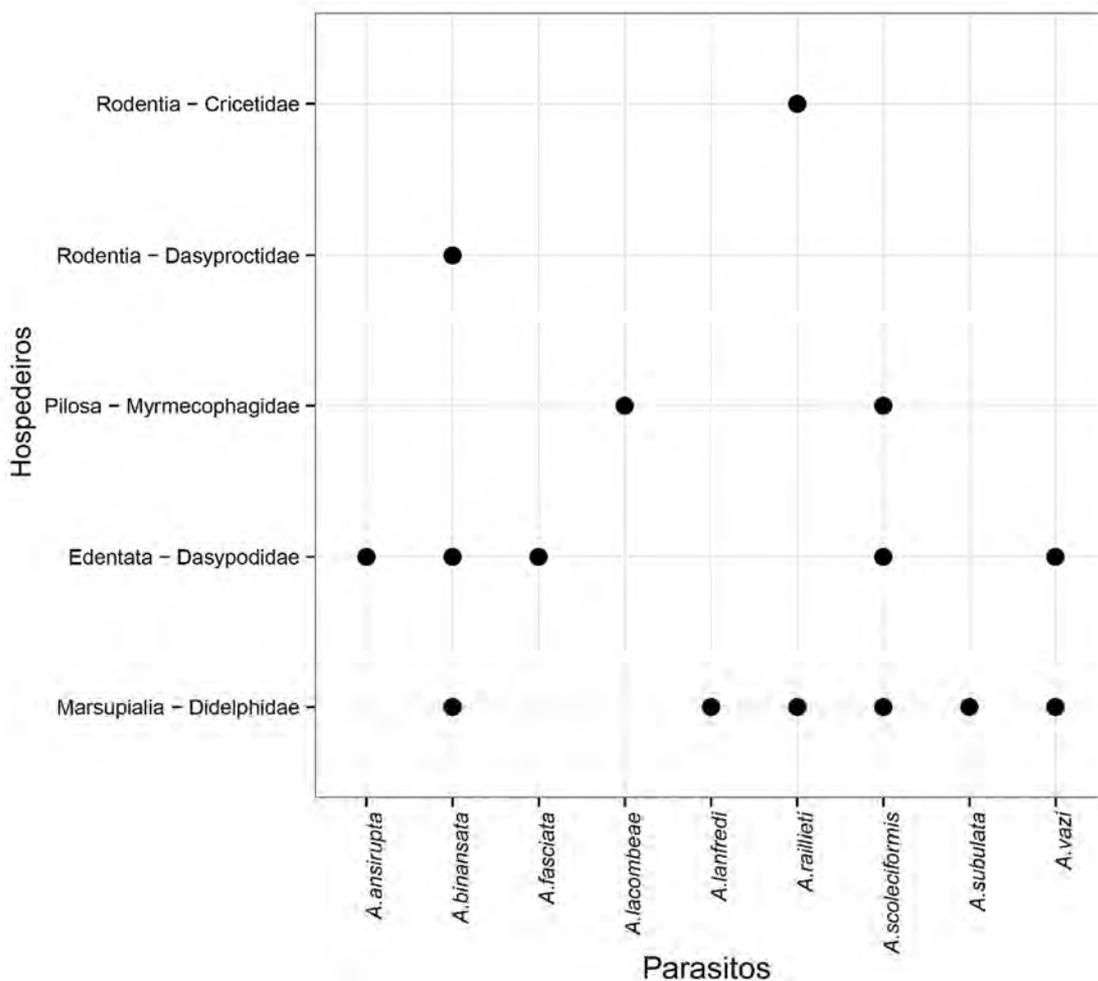


Figura 11. Correlação das *Aspidodera* spp. e suas respectivas famílias de hospedeiros no Brasil.

3.4 Análise filogenética baseada no gene parcial 28S rDNA

A reconstrução filogenética de *A. raillieti* utilizando o gene parcial 28S rDNA apresentou Heterakidae + Aspidoderidae (Heterakoidea) compondo um clado com 100% de suporte, e considerado grupo irmão de Cosmocercoidea representado por *Rondonia rondonia* e *Orientatractis moraveci* da família Atractidae. Ransomnematodea, Rhigonematodea e Cosmocercoidea, neste clado representado por *Cosmocercoides tonkinensis* e *Cosmocercoides pulcher*, formam um outro clado com suporte estatístico de 100%. Cosmocercoidea é considerado neste estudo como um grupo parafilético. *Protospirura muricola* (Spiruroidea) foi utilizado como grupo externo (Figura 11). A lista contendo os taxa e seus hospedeiros estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de espécies de Nematoda utilizados nas análises filogenéticas de *Aspidodera raillieti* utilizando sequencias do gene parcial 28S rRNA.

Taxa	Espécies de Hospedeiro	GenBank acesso n.
Heterakoidea		
<i>Aspidodera raillieti</i>	<i>Didelphis albiventris</i>	KX954130
<i>Strongyluris calotis</i>	<i>Pseudocalotes brevipes</i>	LC133188
Ransomnematodea		
<i>Carnoya filipjevi</i>	diplópodo <i>Saipidobolus</i> sp.	JX946703
Rhigonematodea		
<i>Rhigonema ingens</i>	diplópodo <i>Thyropygus</i> sp.	JX131616
Cosmocercoidea		
<i>Rondonia rondonia</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	KX524511
<i>Orientatractis moraveci</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	KX524513
<i>Cosmocercoides pulcher</i>	<i>Bufo japonicus</i>	LC018444
<i>Cosmocercoides tonkinensis</i>	<i>Acanthosaura lepidogaster</i>	AB908160
Spiruroidea		
<i>Protospirura muricola</i>	<i>Gorilla</i> sp.	KP760405

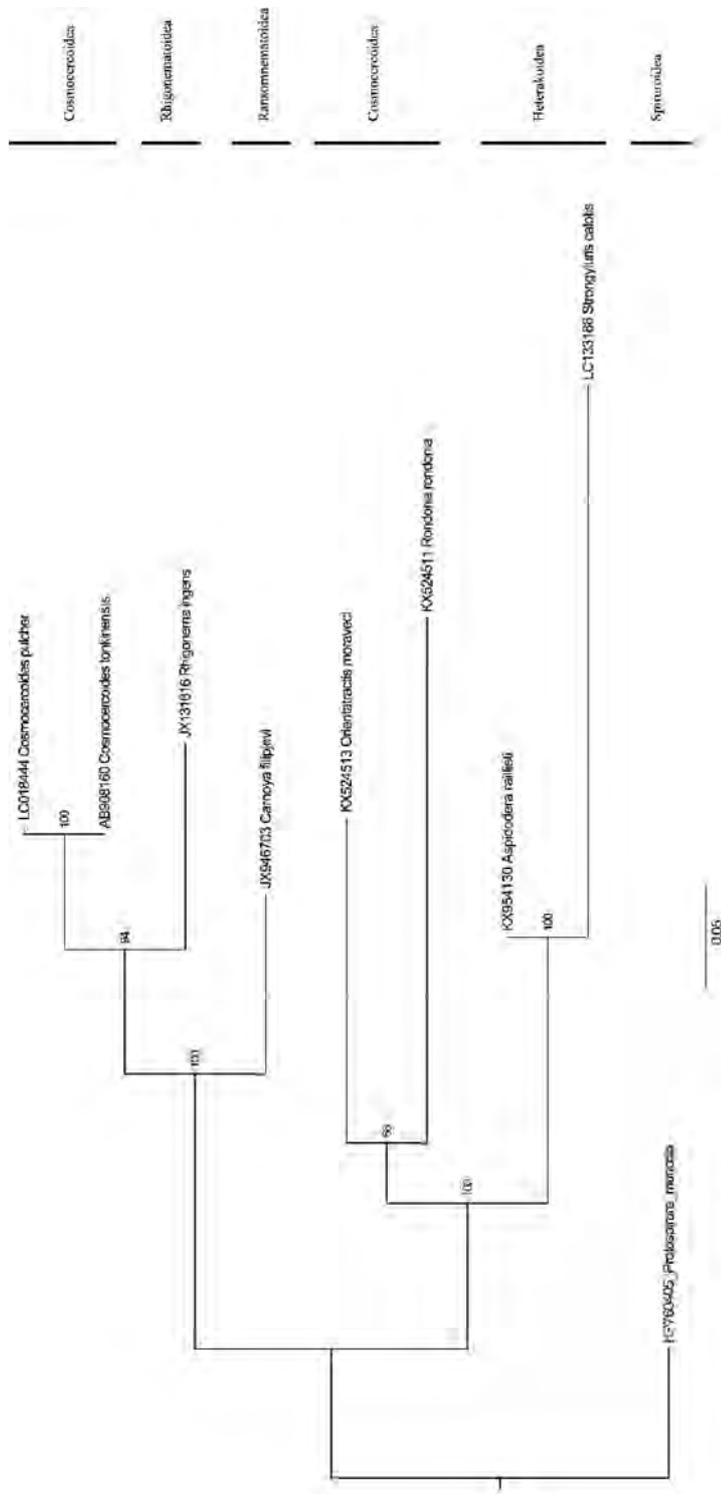


Figura 12. Árvore de máxima-verossimilhança de *Aspidodera raillietii* baseada no gene parcial 28S rDNA para mostrar o relacionamento com outras espécies de Nematoda. Números (%) no braço indica 1000 reamostragem de *bootstrap*. O número de acesso do GenBank estão demonstrados e a barra de escala indica a mutação de sítios de nucleotídeos.

3 DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou helmintos em todos os animais analisados com um total de cinco espécies de Nematoda. Em *Didelphis albiventris* foram encontradas duas espécies, *Aspidodera raillieti* e *A. subulata*. As medidas e características morfológicas das espécies de *Aspidodera* encontradas neste estudo estão de acordo com os dados de Vicente et al. (1966, 1997) e Santos et al. (1990). As características morfológicas de *Aspidodera* spp. podem ser distinguidas principalmente pelo arranjo dos cordões cefálicos que contêm seis voltas longitudinais, três lábios com papilas, esôfago com um bulbo terminal, uma ventosa genital nos machos, um par de espículos e um gubernáculo, e uma projeção digitiforme na extremidade posterior (CHAGAS-MOUTINHO et al., 2014 e SANTOS et al., 1990). A ocorrência do gênero *Aspidodera* na ordem Edentata, Marsupialia e Rodentia é conhecida e tipicamente frequente (VICENTE, 1966, 1997, SANTOS et al., 1990, JIMENEZ et al., 2012).

A identificação morfológica de *A. raillieti* está bem estabelecida e as espécies podem ser caracterizada pela região anterior com uma expansão cuticular que ultrapassa o comprimento do vestíbulo, adornado com cordões cefálicos que possuem seis laços longitudinais que tocam a base do capuz cefálico (SANTOS et al., 1990). O perfil morfológico de *A. raillieti* é extremamente relacionado a *A. lanfredi*, mas pode ser diferenciado por ter uma projeção interlabial maior que *A. raillieti* e uma estrutura similar ao um poro observado no ápice das projeções interlabiais. Também pode ser diferenciado de *A. soganderensis* por estas espécies ter um capuz cefálico grande, espículos menores e ter um número maior de pares de papilas caudais (23–29 pares).

O perfil genético de *A. raillieti* referente ao mtDNA *cox1* e 16S genes e o DNA ribossomal ITS1, 5.8S e ITS2 foi obtida por Jimenez-Ruiz et al. (2012, 2013) em diferentes hospedeiros de diferentes localidades, tais como *Didelphis pernigra* Allen, 1900 da Bolívia, *D. marsupialis* Linnaeus 1758 da Guatemala e *D. virginiana* Kerr 1792 dos Estados Unidos. Entretanto, não há dados genéticos de *A. raillieti* em *D. albiventris* nem no Brasil, assim como sequências do gene 18S rDNA para esta espécie ou 28S rDNA para qualquer Aspidoderidae.

O gene mtDNA *cox1* inicialmente tem sido proposto como um marcador genético padrão confiável para elucidar espécies crípticas e na diversidade de espécies (HEBERT 2003, 2004). Estudos utilizando *cox1* como marcador genético para Nematoda tem sido demonstrado baixo nível de variação intraespecífico (BLOUIN, 2002) e um alto nível de variação interespecífico, mas existem exceções. Estudos prévios revelaram um alto nível de porcentual de diferença (até 6,0%) para *Ostertagia ostertagia* (Nematoda: Trichostrongilidae) para sequências de mtDNA (BLOUIN et al., 1998). Um estudo recente relatou uma variação intraespecífica para a região *cox1* de até 15.5% na população de *Longidorus orientalis* (Nematoda: Dorilaimida) (SUBBOTIN et al., 2015). A baixa similaridade entre a região *cox1* de *A. raillieti* depositada no GenBank com a obtida em nosso estudo (diferença de 6%) pode ser devido a localização geográfica e a espécie de hospedeiro a qual os parasitos foram coletados, i.e., Bolívia vs Brasil e *D. pernigra* vs *D. albiventris*, respectivamente. É possível que o isolamento genético sofrido pela população de parasitos do parque tenha proporcionado estas diferenças assim como o processo evolutivo ocorrido em diferentes hospedeiros. Estes dados podem tornar duvidosos a confiabilidade do *Barcode* para este grupo. Logo, a identificação de nematodas por *Barcode* pode adversamente afetar a acurácia da abordagem taxonômica (GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ et al., 2013).

A variação de sequências observadas dos espaçadores transcritos internos (ITS rDNA) intraespecífica são tipicamente baixa, aproximadamente $\leq 1\%$ (NADLER et al., 2000). Entretanto, D'Amelio et al. (2002) encontraram uma grande diferença de porcentual de nucleotídeos para ITS em populações de *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Anisakidae)

de diferentes espécies de hospedeiros (até 5,2%). Em nossos estudos, a região ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA de *A. railletii* apresentou 99% de identidade com *A. railletii* depositado no GenBank, embora *cox1* apresentasse uma grande diferença para espécie.

Este trabalho revela o primeiro estudo molecular do gene parcial 28S rDNA para Aspidoderidae. A topologia da árvore demonstra de um modo geral um alto valor estatístico para os nós do clado. Nossa reconstrução filogenética demonstrou um resultado similar ao de Nadler et al. (2007) utilizando a gene 18S rDNA, em que relatou que a Heterakoidea, Cosmocercoidea, Rhigonematida (Rhigonematoidea) e Ransomnematoida representam grupos filogeneticamente relacionados. Também similar a este estudo, consideramos que Cosmocercoidea é um grupo parafilético com espécies representantes compondo diferentes cladros. Heterakoidea + Aspidoderidae é considerado grupo irmão de Atractidae com alto valor de *bootstrap* (100%) separado de Cosmocercoidea (aqui representado por *Cosmocercoidea pulcher* e *Cosmocercoidea tonkinensis*), Rhigonematoidea, e Ransomnematoida que compõe um clado com alto valor *bootstrap* (100%).

O diagnóstico de *A. subulata* encontrada em gambá esta baseado principalmente na forma e posição dos cordões cefálicos que por sua vez são curtos e que não ultrapassam o comprimento do vestíbulo e também não tocam a base do capuz cefálico (SANTOS et al., 1990; PROENÇA 1937, VICENTE 1966).

Em tatu-verdadeiro (*D. novemcinctus*) foram encontradas duas espécies de aspidoderídeo, *A. binansata* e *A. vazi* e um Anoplostrongylinea *Hadrostrongylus speciosum*. A identificação de *A. binansata* é caracterizada pelo espinho caudal alongado no macho; numerosos pares de papilas caudais (34) e um espículo reduzido em comparação com outras espécies (SANTOS et al., 1990). *Aspidodera vazi* por sua vez tem um capuz cefálico alongado com a menor proporção capuz cefálico/comprimento do corpo; comprimento dos espículos considerado grande.

O Nematoda *Hadrostrongylus speciosum* (Hadro – (gr.): fino; -strongylus (lat.): cilíndrico) em que o gênero foi erguido em 2007 (anteriormente *Delicata speciosum*) é caracterizado por uma cutícula longitudinal estriada com uma dilatação cefálica finamente estriada. Cavidade oral simples; sem capsula bucal ou anel bucal. Fêmea didelfa, anfidelfa com tendência a prodelfia. Macho com bolsa copuladora do tipo 2-1-2. Há apenas uma espécie de Anoplostrongylineae que se assemelha a *H. speciosum* é a *H. ransomi* (Travassos, 1921) Travassos, 1935 que também é parasito de outros tatus. *Hadrostrongylus speciosum* é muito diferente dos outros gêneros principalmente devido morfologia dos espículos, além disso é a única espécie que é encontrada no intestino grosso (HOPPE; NASCIMENTO 2007). Embora alguns espécimes fossem submetidos a análises moleculares, não foi obtida nenhuma sequencia.

Alguns espécimes de acantocéfalos foram encontrados em nosso trabalho, mas estavam na forma imatura, com tromba revertida e órgãos internos ligeiramente degenerados, inviabilizando qualquer estudo morfológico. Brandão et al. (2009) não encontraram ovos de acantocéfalos em espécimes da família Dasypodidae, embora *Oligacanthorhynchus carinii* e *Centrorhynchus* sp. fosse relatada em *D. novemcinctus* no Brasil (TRAVASSOS, 1917, GOMES et al., 2012).

Estudos paleoparasitológicos realizados no parque não encontraram ovos de helmintos em coprólitos de Dasypodidae (SIANTO, 2009). Chame (1988) trabalhando com fezes recentes de Dasypodidae obtidas na mesma região não encontrou ovos de helmintos neste hospedeiro. Em nosso estudo, embora apenas duas espécimes de *D. novemcinctus* fossem estudadas, ambas estavam infectadas e com elevada intensidade de parasitos (até 193 aspidoderídeo em um dos espécimes).

Nossos resultados relatam uma nova distribuição geográfica e novos dados ultraestruturais e genéticos de Nematoda parasitos de *Didelphis albiventris* e *Dasypus*

novemcinctus no PNSC, Piauí, Brasil. Além disso, este trabalho servirá de base para as pesquisas com fauna de helmintos ancestral e recente na localidade e irá contribuir para melhor entender a biodiversidade no bioma Caatinga.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE HELMINTOS DE *Cerdocyon thous* (LINNAEUS, 1766) E *Leopardus pardalis* (LINNAEUS, 1758) DO PARQUE NACIONAL SERRA DA CAPIVARA, PIAUÍ, BRASIL

Santos, E.G., Chame, M., Chagas-Moutinho, V.A., Santos, C.P. Morphology and molecular analysis of *Oncicola venezuelensis* (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae) from the ocelot *Leopardus pardalis* in Brazil. *Journal of helminthology (in press)*, 2016. (ANEXO 1)

RESUMO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e nesta região está localizado o Parque Nacional Serra da Capivara (PNSC), Piauí, onde o cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* e a Jaguatirica *Leopardus pardalis*, predadores carnívoros, são comumente encontrados. No entanto, estas espécies também podem ser encontradas em todo território nacional. A helmintofauna destes mamíferos é conhecida em diferentes biomas brasileiros, mas há um número reduzido de estudos na Caatinga. Neste trabalho a helmintofauna de cachorro-do-mato (n=2) e da jaguatirica (n=2) encontrados mortos na área do PNSC foram estudados. Os Nematoda foram diafanizados em glicerina e os Acanthocephala foram corados com Carmalumen de Mayer para estudos de microscopia de luz. Alguns espécimes de Nematoda e Acanthocephala foram pós-fixados em 1% OsO₄ e ferrocianeto de potássio 0,8%, desidratados em série alcoólica, levados ao ponto crítico com CO₂, revestidos com ouro e examinados no microscópio eletrônico de varredura. O DNA genômico dos parasitos foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit, submetidos a reação em cadeia da polimerase e sequenciamento para as regiões citocromo c-oxidase da subunidade 1 do DNA mitocondrial (mtDNA *cox1*) e os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), os genes 5.8S rDNA e parcial 28S rDNA. Em *C. thous*, fêmeas de *Toxocara* sp. foram identificadas e os dados moleculares indicaram uma similaridade de 95% para gene mtDNA *cox1* e 99% para ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA com sequências de *Toxocara canis* do GenBank. Em *C. thous*, fêmeas de *Toxocara* sp. foram identificadas e os dados moleculares indicaram uma similaridade de 95% para gene *cox1* e 99% para a região ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA com sequências de *Toxocara canis* do GenBank. Espécimes de *T. canis*, *Ancylostoma buckleyi*, *Molineus* sp. e *Oncicola canis* encontrados no cachorro-do-mato são agora referidos em uma nova localidade geográfica. Os helmintos encontrados em jaguatirica foram *Molineus* sp., *Physaloptera* sp. e *Oncicola venezuelensis*, todos referidos em nova localidade geográfica. Novos dados ultraestruturais de *O. venezuelensis* são apresentados e seu perfil genético inclui uma nova sequência parcial do gene 28S rDNA (LSU), além de sequências de ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA. Os resultados das análises das árvores filogenéticas por máxima-verossimilhança para cada região mostraram que Oligacanthorhynchidae e Gigantorhynchidae são próximas (suporte>91%). Ambas as famílias usam mamíferos e aves como hospedeiros definitivos. Novos dados moleculares, ultraestruturais e de distribuição geográfica são apresentados e discutidos.

Palavras-chave: Nematoda, Acanthocephala, ultraestrutura, filogenia, rDNA, mtDNA.

ABSTRACT

The Caatinga is a biome exclusive from Brazil and in this region is located the Serra da Capivara National Park (PNSC), Piauí, where the dog-eating fox *Cerdocyon thous* and the Ocelot *Leopardus pardalis*, both carnivorous predators, are commonly found. However, these species can also be found throughout the country. The helminths of these mammals are known in different biomes, but there are a few studies in the Caatinga. In this work the helminth fauna of dog-eating fox (n = 2) and ocelot (n = 2) found dead in the area of the PNSC were studied. The Nematoda were cleared in glycerin and the Acanthocephala were stained with Mayer's carmalum for light microscopy studies. Some specimens of Nematoda and Acanthocephala were post-fixed in 1% OsO₄ and potassium ferrocyanide, dehydrated in alcohol series, critically dried with CO₂, coated with gold and examined in the scanning electron microscope. The genomic DNA of parasite was extracted using a QIAamp DNA Mini Kit, subjected to polymerase chain reaction and sequencing of mitochondrial DNA cytochrome c-oxidase subunit 1 (mtDNA *cox-1*), internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS 1, ITS2) and the genes 5.8S rDNA and partial 28S rDNA. In *C. thous*, females of *Toxocara* sp. were identified and molecular data indicated 95% similarity for mtDNA *cox1* and 99% similarity for the ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA with sequences of *Toxocara canis* from GenBank. Specimens of *T. canis*, *Ancylostoma buckleyi*, *Molineus* sp. and *Oncicola canis* found in the dog-eating fox are now reported from a new geographic locality. The helminths from the Ocelot were *Molineus* sp., *Physoloptera* sp. and *Oncicola venezuelensis*, all reported in a new geographic locality. New ultrastructural data of *O. venezuelensis* are presented and its new genetic profile includes a new partial sequence of the 28S rDNA (LSU), and sequences of the ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA. The results of the analysis of phylogenetic trees by maximum likelihood for each region showed that Oligacanthorhynchidae and Gigantorhynchidae are close related (support > 91%). Both families use mammals and birds as final hosts. New molecular, ultrastructural and geographic distribution data are presented and discussed.

Key words: Nematoda, Acanthocephala, ultrastructure, phylogeny, rDNA, mtDNA.

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro que apresenta uma grande variedade de espécies da fauna e da flora, sendo uma boa parte destas endêmicas (ALMEIDA et al., 2015). Sua diversidade de mamíferos foi por muito tempo considerada pobre e de baixo grau de endemismo, mas desmistificada após dois inventários da diversidade de mamíferos da Caatinga publicados por Oliveira et al. (2003) e Oliveira (2004). A única consideração ainda aceita é a do baixo investimento no conhecimento da maioria dos grupos zoológicos deste bioma (CRUZ et al., 2005).

O Parque Nacional Serra da Capivara, localizado no Sudeste do Estado do Piauí, situa-se em um planalto bem erodido, em área de transição do domínio da Caatinga com o do Cerrado (ARAÚJO et al. 1998). No Parque podemos encontrar uma variedade de espécies de mamíferos que inclui o cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) e a jaguatirica *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758), bem conhecidos nos biomas brasileiros. Estes mamíferos são predadores que possuem uma larga amplitude de habitats e ampla distribuição por todo território nacional (OLIVEIRA et al., 2013; BEISIEGEL et al., 2013). Podem atuar como reguladores de populações de presas sendo um importante fator na conservação da biodiversidade animal (REDFORD, 1992). Ambos possuem uma dieta bastante diversificada, mas a dieta de *C. thous* destaca-se por ser um onívoro oportunista, se alimentando também de crustáceos, frutos, insetos, pequenos mamíferos, aves, répteis, anfíbios e ovos de diversas espécies (COURTENAY; MAFFEI 2004). *Leopardus pardalis* por sua vez se alimenta de pequenos roedores, mas em termos de biomassa como grandes roedores, pacas, cutias, tatus, ungulados e macacos são bem importantes na sua dieta (LUDLOW; SUNQUIST, 1987; MORENO et al., 2006; BIANCHI; MENDES 2007; OLIVEIRA et al. 2010).

Esta dieta variada pode aumentar as chances de parasitos que utilizam a teia trófica em completar seus ciclos de vida, como é o caso de alguns Nematoda e os Acanthocephala. A helmintofauna referida de *L. pardalis* inclui: *Ancylostoma braziliense* Faria, 1910, *Dirofilaria* sp., *Oligacanthorhynchus pardalis* (Westrumb, 1821), *Oncicola campanulata* (Diesing, 1851), *On. chibigouzensis* Machado Filho, 1963, *On. Oncicola* (Ihering, 1892), *Oncicola* sp., *Physaloptera* sp., *Prosthenorchis* sp., *Toxascaris leonina* (Linstow, 1902), *Toxocara canis* (Werner, 1782), *Toxocara mistax* (Zeder, 1800) e *Toxocara* sp. (VIEIRA et al. 2008). Por outro lado, *C. thous* é considerado um hospedeiro com a maior diversidade de helmintos dentre os carnívoros silvestres no Brasil, com um total de 24 helmintos registrados no levantamento de Vieira et al. (2008) e muito outros foram registrados (GOMES, 2013)

Este capítulo tem como objetivo estudar a biodiversidade de helmintos gastrointestinais de cachorro-do-mato e jaguatirica do Parque Nacional Serra da Capivara, uma região ainda pouco explorada, fornecendo dados morfológicos, ultraestruturais e genéticos dos parasitos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos Hospedeiros

O Parque Nacional Serra da Capivara está localizado no estado de Piauí, Brasil (08°26'50,099"N a 08°54'23,365"S e 08°36'33,681"L a 08°46'28,382"O). Dois adultos de *Cerdocyon thous* (Figura 1) duas fêmeas e dois *Leopardus pardalis* (Figura 2) sendo um macho e uma fêmea foram encontrados mortos no parque, atropelados nas estradas ou apreendidos de caçadores pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) foram doados à Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM). Para fins de estudo, a FUMDHAM doou os animais para o Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ - Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental. Os animais foram necropsiados, o trato digestório foi removido e amarrado com barbante da região anterior até posterior, com separações entre o esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso.

2.2. Análise morfológica

Os parasitos encontrados no conteúdo gastrointestinal foram lavados em solução salina fisiológica (0,7%) e armazenados em álcool 70%. No laboratório, os Nematoda foram montados em glicerina e os Acanthocephala corados em carmalumen de Mayer e montados em bálsamo do Canadá para a identificação morfológica. As medições feitas com auxílio de ocular micrométrica no microscópio Leica DM LS2 são apresentadas em micrometros (μm), salvo indicação contrária, com a mínima e máxima entre parênteses. Os desenhos foram feitos com auxílio de câmara clara e redesenhados utilizando o programa Adobe Illustrator CS6. Espécimes representativos dos helmintos foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), os parasitos guardados em álcool 70% foram lavados em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2, pós-fixados em 1% OsO₄ e ferrocianeto de potássio 0,8% por 1h e desidratados em série crescente de solução de etanol (30–100%), sendo 1h em cada etapa. Foram a seguir levados ao ponto crítico com CO₂, montados em suporte com fita dupla face, revestidos com ouro e examinados no microscópio Jeol JSM 6390 da Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

2.4 Extração de DNA

O DNA genômico de cada um dos parasitos foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e segue o protocolo como mencionado no Capítulo I.



Figura 1. *Cerdocyon thous* (Linneus, 1766) encontrado morto na região do Parque Nacional Serra da Capivara (Fotografia: Everton Gustavo)



Figura 2. *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) encontrado morto na região do Parque Nacional Serra da Capivara (Fotografia: Everton Gustavo)

2.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas para as regiões gênicas: subunidade maior do ribossomo (28S rDNA), região ITS1, 5.8 e ITS2 do DNA ribossomal e Citocromo c-Oxidase I do DNA mitocondrial (mtDNA *cox-I*). Todas as reações feitas tiveram um volume final de 15 µL sendo 7,5 µL de 2 × GoTaq® Colorless Mastermix (Promega, Madison, WII - USA), 1,5 µL de cada oligonucleotídeo (concentração final de 0,5 pmol), 0,5 µL de MgCl₂ (concentração final de 1,6 mM), 2,5 µL de DNA e água ultrapura para completar.

Para amplificar a região ITS1, 5.8S e ITS2 de *Toxocara* sp., foram desenhados novos conjuntos de iniciadores para serem usados neste estudo ToxoITS_F (5'-AGTCTCCGAACGTGCATAAG-3') e ToxoITS_R (5'-TCCATTACCACACCAGCATAG-3'). As amostras foram colocadas em termociclador (Mastercycler Personal - Eppendorf) e submetidas às seguintes condições: pré-aquecimento a 94 °C por 3 min., seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 55,4 °C por 30 s, 72 °C por 45 s e 72 °C por 5 min. Na amplificação da mesma região em *Acanthocephala* foram utilizados os iniciadores BD1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') e BD2 (5'-TATGCTTAARTTCAGCGGGT-3') desenhados por CHEN et al. (2010). As amostras foram submetidas às seguintes condições: pré-aquecimento a 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 60 s e 72 °C por 7 min.

A região parcial do 28S rDNA foi amplificada por PCR com o conjunto de *primers* C1 (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3') e D2 (5'-TGGTCCGTGTTTCAAGAC-3') segundo CHISHOLM et al. (2001). A reação foi feita sob as seguintes condições: 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 60 s e 72 °C por 5 min.

Para a região gênica mtDNA *cox-I* foi utilizado o conjunto de iniciadores 'cocktail' seguindo o protocolo de Prosser et al. (2013).

2.6 Eletroforese e purificação dos produtos amplificados pela PCR

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5 % corado com SYBERGREEN 10000X (Promega, Madison, WII - USA). Foram utilizados 5 µL de peso molecular (Promega), 9 µL de produto da PCR com 1 µL de corante em cada poço, sendo submetidas à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 90V e posteriormente visualizados no transiluminador sob luz ultravioleta. Os resultados da PCR foram registrados fotograficamente com câmera fotográfica (Sony Cybershot DSC-W180). Na purificação das amostras adicionou-se 2 µL de EXOSAP-IT (Affymetrix, EUA) ao restante do produto da PCR, levando as amostras ao termociclador sob as seguintes condições: aquecimento de 37 °C por 25 min seguido de 80 °C por 15 min.

2.7 Determinação das sequências nucleotídicas

As amostras purificadas foram encaminhadas para a reação de sequenciamento nucleotídico com o conjunto de diagnóstico ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems-Perkin Elmer, EUA) de acordo com o protocolo utilizado pela Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz. Na reação de sequenciamento foram utilizados 1,5 µL de Big Dye, 1,25 µL de tampão, oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 1 pmol/µL, 2,5 µL de produto da PCR purificado e água para completar a reação para o volume final de 10 µL. A reação foi submetida a 40 ciclos de sequenciamento com 94 °C por 30 s, 50 °C por 10 s, 60 °C por 4 min. Ambas as fitas foram

analisadas no sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems-Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA) da plataforma PDTIS-Fiocruz.

2.8 Análise computacional das sequências nucleotídicas

As sequências foram obtidas em forma de cromatogramas e analisadas no programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013). O alinhamento foi realizado pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). Para a análise de similaridade foi utilizado o servidor BLAST 2.2 (“Basic Local Alignment Search Tool”) (ALTSCHUL et al., 1990) do ‘National Center for Biotechnology Information’ (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (‘National Institute of Health’), Maryland, EUA (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

O alinhamento das sequências deste estudo com as sequências depositadas no GenBank serviu como base para a construção de árvores filogenéticas, utilizando o software MEGA 6.0.

Os modelos evolutivos utilizados em cada reconstrução filogenética foram escolhidos através do software jModel test (POSADA 2008). As árvores filogenéticas foram construídas empregando o algoritmo de máxima-verossimilhança (ML) (FELSENSTEIN, 1981). Para cada construção, a veracidade dos ramos foi conferida por análise de ‘bootstrap’ (5.000 réplicas).

3 RESULTADOS

Neste estudo foram estudados os helmintos de dois espécimes de *Cerdocyon thous* e dois de *Leopardus pardalis*. Foram encontrados parasitos em todos os hospedeiros analisados. *C. thous* estava parasitado por seis espécies de helmintos: *Toxocara canis*, *Molineus* sp., *Ancylostoma buckleyi*, *Oncicola canis* e mais dois Nematoda gen. sp. não identificados. A helmintofauna encontrada em *L. pardalis* neste estudo inclui *Molineus* sp., *Physaloptera* sp. e *Oncicola venezuelensis*. Todos os parasitos são descritos a seguir.

3.1 Parasitos de *Cerdocyon thous* (Linneus, 1766)

Classe Mammalia
Ordem Carnivora
Família Canidae

Toxocara canis (Werner, 1782)
(Figuras 3A-C, Quadro 1)

Ascaridoidea Railliet & Henry, 1915
Ascarididae Baird, 1853
Toxocarinae (Hartwich, 1954) Osche, 1958

Sítio de infecção: Intestino delgado.

Prevalência: 1 dos 2 espécimes de cachorro do mato (50%).

Intensidade: 4 parasitos.

Material depositado: CHIOC nº 38.358.

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Fêmea (*baseado em dois espécimes*): Comprimento do corpo 6400–6500 e largura 1575–1600 na altura mediana do corpo. Asa cervical 2000–2300 de comprimento. Lábio dorsal mede 167–170 de comprimento e 179–188 de largura. Lábio subventral 127–132 de comprimento e 125–130 de largura. Esôfago longo 3650–3700 com ventrículo pouco diferenciado. Anel nervoso a 980–1016 da região anterior. Abertura da vulva a 3100 da extremidade anterior. Distância ânus/cauda 540–560 e espinho caudal 65–70. Ovos arredondados 65 (60–70) × 64 (60–65) (Figura 3).

As sequências de *T. canis* estão demonstradas como ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA com 690 pb e mtDNA *cox1* com 673 pb no Quadro 1. As sequências foram depositadas no GenBank e aguardam número de acesso.

Resultados do BLAST para a região ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA indicaram 100% de cobertura e 99% de identidade com *T. canis* com número de acesso LM055644 e escore máximo de 1219. Para a região mtDNA *cox1* o resultado encontrado foi de 76% de cobertura e 95% de identidade com *T. canis* (JN593098) com escore máximo de 752.

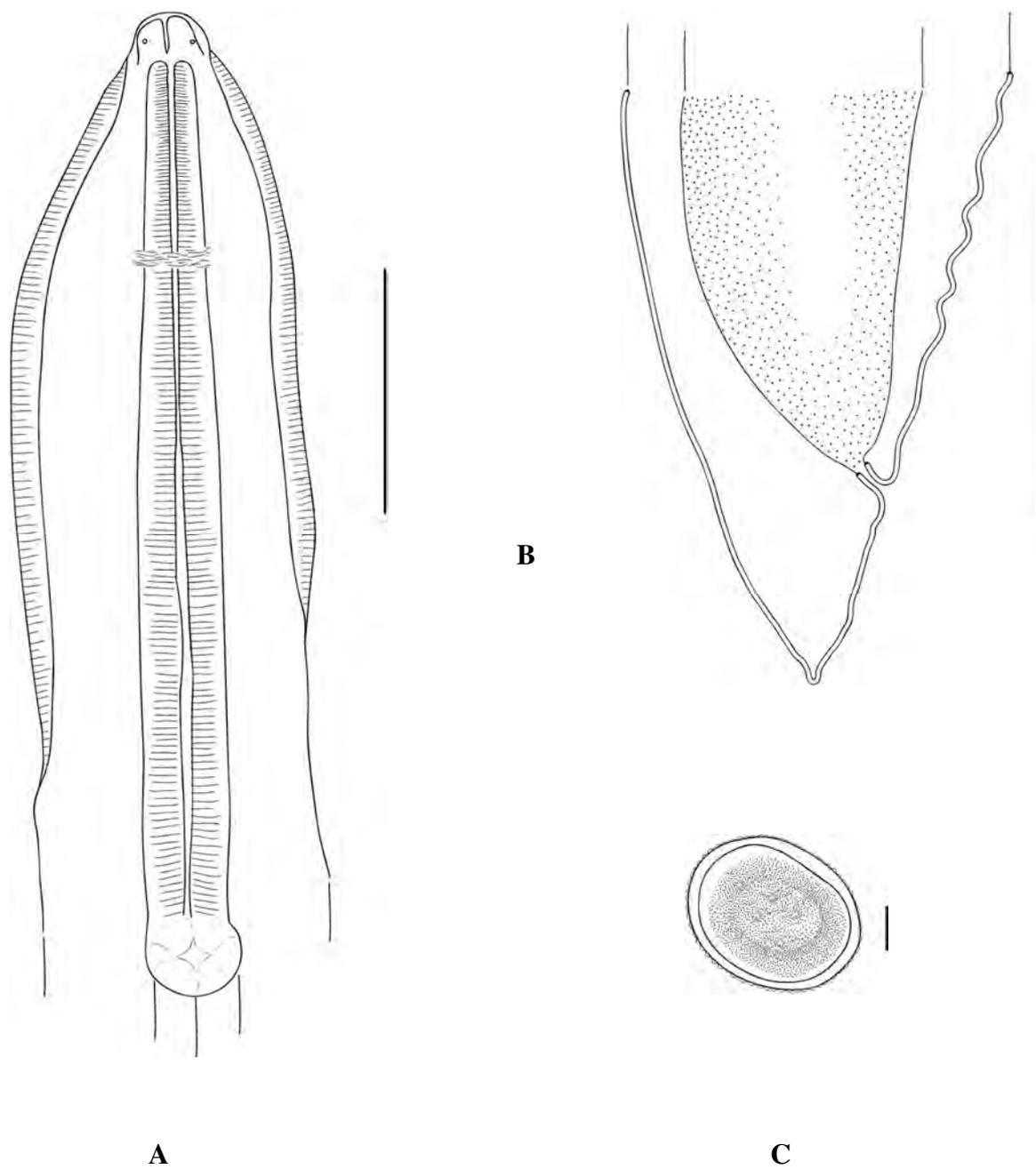


Figura 3. Desenho em câmara clara de *Toxacara canis*. A. Região anterior mostrando a cavidade oral com três lábios, um dorsal e dois ventro-laterais, asa cefálica e altura do anel nervoso; B. Cauda da fêmea com ânus subterminal (A e B, Barra: 1 mm); C. Ovo globular, morulado com camada externa ligeiramente ornamentada (Barra: 20 μ m).

Quadro 1: Sequências nucleotídicas de *Toxocara canis* de mtDNA *cox1* e ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA.

<i>Toxocara canis</i>
Toxocara canis citocromo c-oxidase subunidade 1 673pb (Hospedeiro: <i>Cercopithecus thomasi</i>)
TCTAATCATAAAGATATTGGGACCTTGTATTTTCTTTTTGGTTTGTGGTCTGGTATGGTTGGTACTGGTTTGTCTTTGATTGTTTCGTCCTTGGCTAAGCCGGGGCTTTTTTTGGGTAATGGGCAGTTGTATAATTCTGTTATTACGGCTCATGCTATTTTGGTATTTTTTTATGGTTATGCCAACTATGATTGGTGGTTTTGGTAACTGAATGTTGCCTTTGATGTTGGGGCTCCTGATAAGAGGTTTCTCGTTTGAATAATTTGAGTTTTTGGTTGTTACCTACGGCTATGTTTTGATTTAGATGCTGTTTTGTTGATATAGGGTGTGGTACTAGTTGGACTGTGTACCCTCCTTTGAGGACTATGGGGCATCCTGGCAGTAGGGTAGATTTGGCTATTTTTAGTTTACATTGCGCGGGGGTTAGCTCTATTCTTGGTGCTATTAATTTTATGACTACTAAGAATTTACGTAGTAGGTCTATTTCTTTGGAGCATATGAGGTTGTTTGTGTGGACTGTTTTTGTGACCGTTTTTTGTGGTTTTGTCTTTGCCTGTCTTAGCCGGGGCTATTACTATGTTGTTGACTGATCGTAATTTGAATACGTCTTTTTTTGACCTAGTACTGGGGCAATCCTTTGATTTACAGTATTTAT
Toxocara canis ITS1, 5.8S e ITS2 690 pb (Hospedeiro: <i>Cercopithecus thomasi</i>)
CACCATTTGCACGTATGCGTGAGCCGCGAATCAAGCTGCACACATGTGGTGCCGGTGTAGCCGTGAGCCGTGCTTTATTGGCAGACAATGGCCTGTGGCTTGGTGCGTGTGAGGGGAAATGGGTGACGTGCTGGGCAAGTTAGAAAGGCGCGCCGATAGCGCCCATTTTCTCGTATTCTTAACAACGGTGTCCAGTTTGGCGTCTGCGCCTCACCTAGCTATTGCCCGGACCGTCGGTAGCGATGAAAGGTGGGGAGAAAGCTCCTCGTTTTCGAGTTGAGTAGACTTAATGAGCATCAGCTGGGATGCCGCCAAAAACAAAAACACAATCAGTTAAGTTTATGTTGTTGAATTGTCGAGGATGAGCGCTGTTCTCGTGCAACGCTGCGCAACTTATGTTGTTGTTGCTAGTGAACATGTTTCGAGTGGACGAAATATGTACAAATCTTAGCGGTGGATCACTCGGTTCTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAAATTTGAAACGCACATTGCGCCATCGGGTTTATTCCCGTTGGCACGTCTGGCTGAGGGTCAGTATATTAAGGAGTATGATCGGCGGCCAATTTATGGAATGTGCTTAACGCGCAAGGTTGTGGTGCAATCTCTCGCAAGGTGCATTTCGGTGAG

Molineus sp. Durette-Dusset e Chabaud (1981)
(Figuras 4A-E)

Trichostrongyloidea Cram, 1927
Molineidae Skrjabin e Schulz, 1937
Anoplostrongylinae Chandler, 1938

Sítio de infecção: Intestino delgado.

Prevalência: 1 de 2 hospedeiros infectados (50%).

Intensidade: 20 parasitos.

Material depositado: CHIOC nº 38.356.

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Os 20 parasitos coletados não estavam em bom estado de conservação, dificultado a visualização de algumas estruturas.

Macho (*baseado em oito espécimes*): Comprimento do corpo 5900 (5300–6500) e 78 (70–92) de largura. Vesícula cefálica 14 (11–16). Esôfago 320 (304–330) e anel nervoso a 137 da região anterior. Espículos longos iguais em forma e tamanho, afilando em direção a extremidade terminal. Porção final de ambos os espículos com um pequena ponta arredondada e projetada a um ângulo de 90°. Comprimento dos espículos 191 (182–200) e gubernáculo 99 (95–100). Bolsa copuladora simétrica com padrão 2-1-2 sem espinhos nos lobos laterais. Comprimento da bolsa 133 (100–155) e 108 (97–125) de largura (Figura).

Fêmea (*baseado em três espécimes*): Comprimento do corpo 7937 (7625–8250) e 68 (65–75) de largura. Vesícula cefálica 14,5 (12-17). Esôfago 338 (315–362). Didélfica: comprimento do ovojector combinado 212 (200–225) e abertura vulva 1070 (1015–1050) na porção final da região anterior. Cauda cônica 162 (125–200) com um espinho caudal. Ovos em série no útero e oval 49 (40–55) × 33 (25–42).

Sínlofe estudado a partir de uma fêmea: doze cristas (seis dorsais e seis ventrais) interrompidas em duas regiões. Corte realizado na região mediana do esôfago.

Um total de 10 espécimes foram estudados por análise molecular, mas nenhum produto de PCR foi gerado.

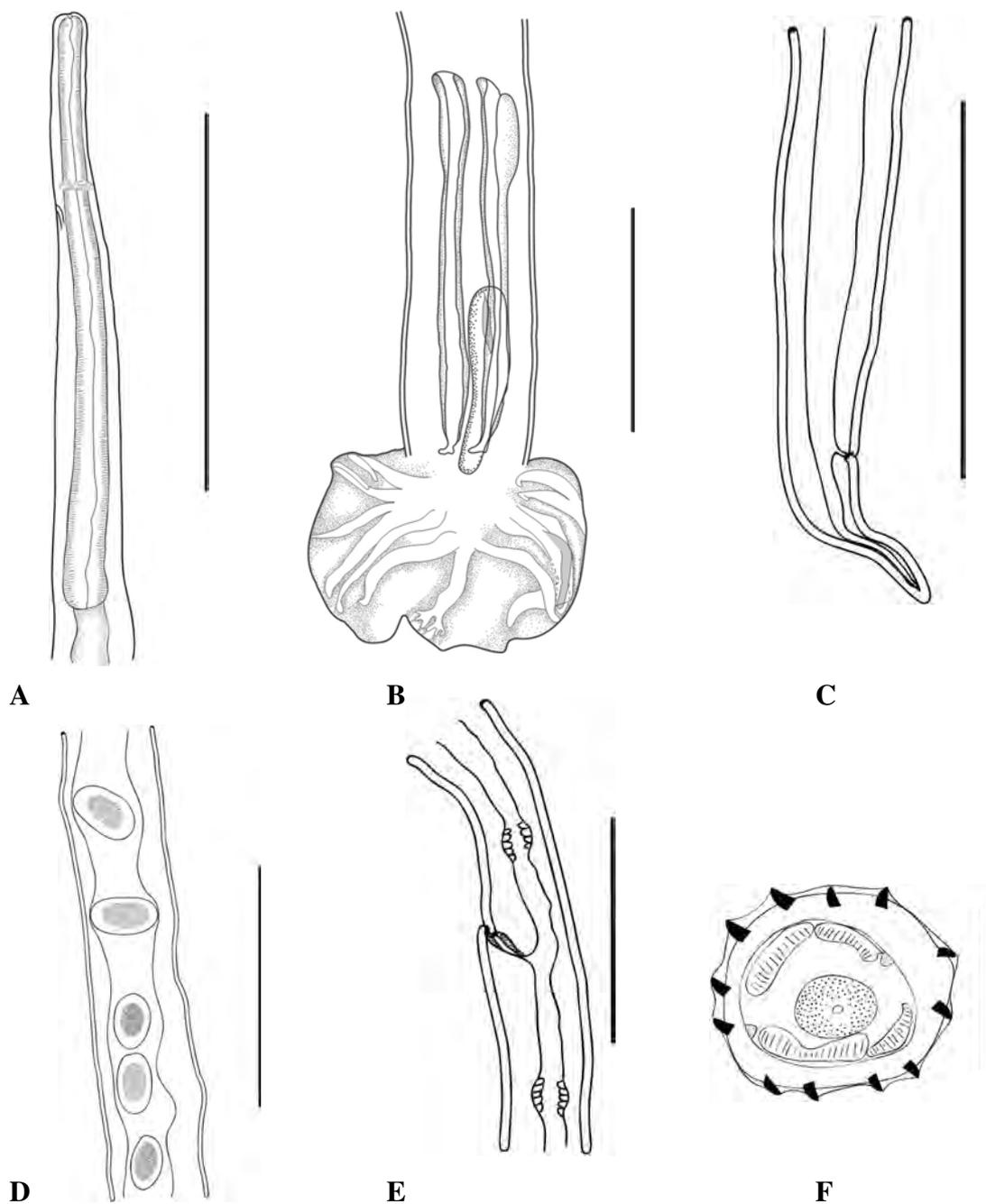


Figura 4. Desenho em câmara clara de *Molineus* sp. A. Região anterior com esôfago, anel nervoso e poro excretor (Barra: 250 μ m); B. Cauda do macho com a bolsa copuladora fórmula 2-1-2, um par de espículos iguais em forma e tamanho e um gubernáculo (Barra: 100 μ m) C. Cauda da fêmea (Barra: 200 μ m) D. Útero com ovos morulados e em série (Barra: 200 μ m); E. Ovojector e braços da *vagina vera* de comprimento iguais e uma vulva (Barra: 200 μ m); F. sínlofe da fêmea (Barra: 25 μ m).

Ancylostoma buckleyi Le Roux e Biocca, 1957
(Figuras 5A-C)

Ancylostomatoidea Chabaud, 1965
Ancylostomatidae (Looss, 1905)
Ancylostomatinae Looss, 1905

Sítio de infecção: Intestino delgado.

Prevalência: 1 de 2 espécimes infectados (50%).

Intensidade: 12 parasitos.

Material depositado: CHIOC nº 38.350.

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Macho (dois espécimes): Comprimento do corpo 4375–5000 e 2400–2800 de largura. Cápsula bucal 180-190 de comprimento e 100-120 de largura com 3 pares de dentes ventrolaterais e 2 pares de dentes dorsolaterais (Figura 5A). Anel nervoso a 352 da região anterior. Esôfago 750–770 de comprimento. Espículos iguais, finos e longos com 615–735 de comprimento. Gubernáculo de difícil visualização mede 120 (Figura 5B).

Fêmea (três espécimes): Comprimento do corpo 5600–6250 e 3233 (3000–3700) de largura. Cápsula bucal 167 (150–190) de comprimento e 113 (100–130) de largura. Anel nervoso a 300 da região anterior. Esôfago 820 (700–900) de comprimento. Abertura da vulva a 4500–3900 da região anterior. Distância ânus/cauda 120–175 (Figura 5C). Ovos não visualizados.

Um total de quatro espécimes foram estudados por análise molecular, mas nenhum produto de PCR foi gerado.

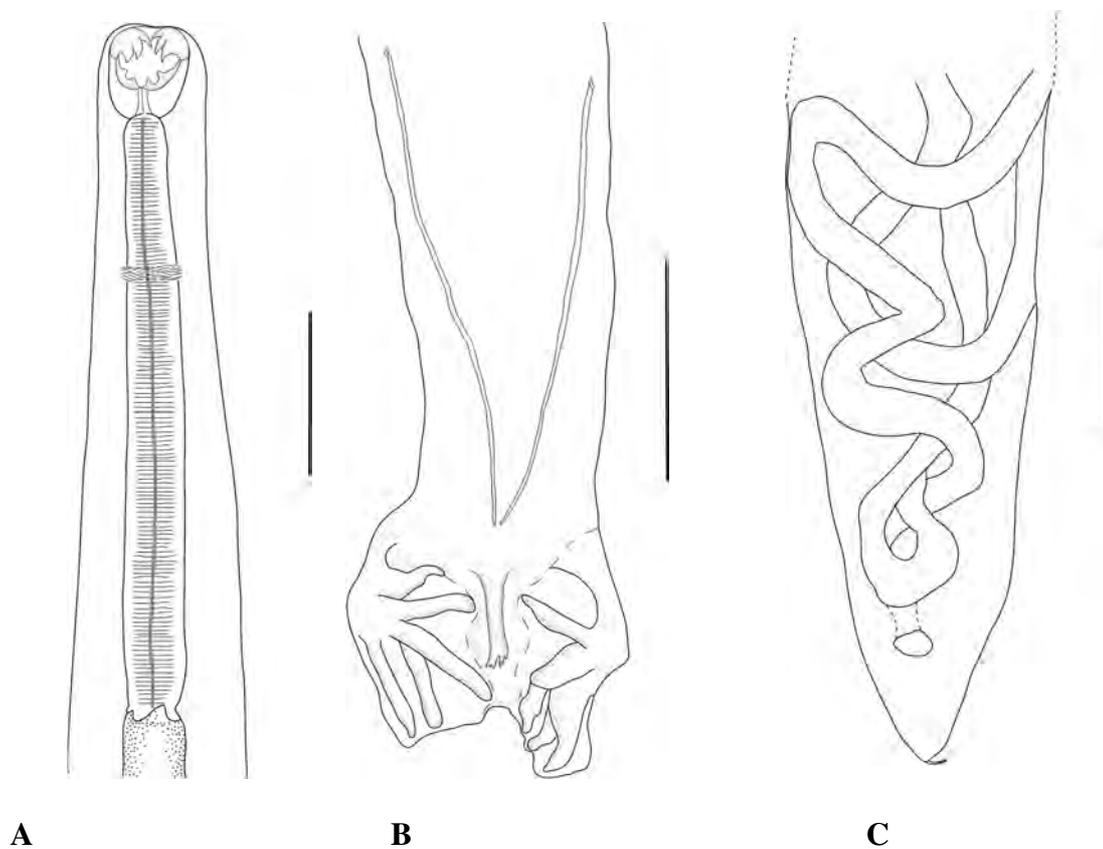


Figura 5. Desenho em câmara clara de *Ancylostoma buckleyi*. A. Região anterior mostrando a cápsula bucal com três pares de dentes ventro-laterais e 2 pares dorso-laterais, anel nervoso e esôfago (Barra: 200 μm); B. Cauda do macho com um par de espículos longos e finos (Barra: 200 μm); C. Cauda da fêmea mostrando o intestino e ânus (Barra: 300 μm).

Oncicola canis (KAUPP, 190938.443)
(Figuras 6A-D)

Acanthocephala Rudolphi, 1809
Archiacanthocephala Meyer, 1931
Oligacanthorhynchida Petrochenko, 1956
Oligacanthorhynchidae Southwell e Macfie, 1925

Sítio de infecção: Intestino delgado.

Prevalência: 1 de 2 espécimes infectados (50%).

Intensidade: 4 parasitos.

Material depositado: CHIOC nº 38.443 a-c.

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Macho (baseado em três espécimes): Comprimento do corpo 6617 (2250–9750) e 1817 (1750–1925) de largura. Probóscide globular 1175–1200 de comprimento e 892 (850–950) de largura. Pescoço sem ganchos. Ganchos: I- 178 (175–180); II- 158 (150–175); III- 120 (115–125); IV- 123 (120–125); V- 93 (85–100); VI- 77 (75–80). Receptáculo da probóscide 1558 (1425–1750) de comprimento. Testículo anterior 808 (700–875) de comprimento e 458 (375–525) de largura. Testículo posterior 742 (700–800) de comprimento e 492 (450–525) de largura. Glândulas de cimento dispostas em quatro pares, tendo 1525 (1450–1625) de comprimento. Bolsa de Safftigen 1717 (1500–1850) de comprimento e 433 (325–500) de largura. Bolsa copuladora estava invaginada.

Um espécime foi estudado por análise molecular utilizando iniciadores BD1 e BD2 e também C1 e D2. Entretanto, nenhum produto de PCR foi gerado.

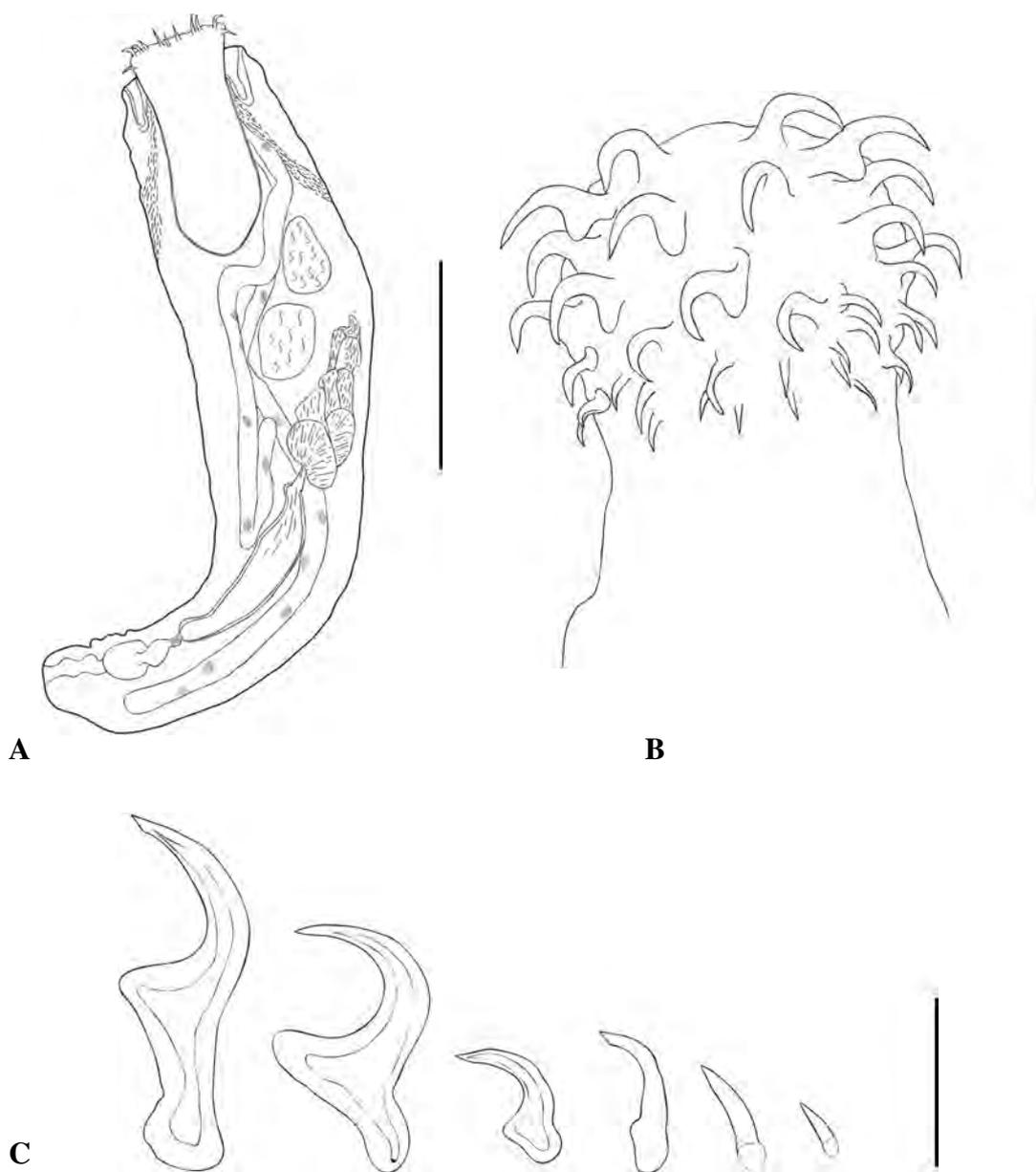


Figura 6. Desenho em câmara clara de *Oncicola canis*. A. Macho com lemnisco longo, testículo na região mediana do tronco, glândulas de cimento, bolsa de Saeftigen e bolsa copuladora invaginada (Barra: 2 mm); B. Probóscide globular e ganchos (Barra: 500 μ m); C. Detalhes dos ganchos I, II, III, IV, V e VI a partir da esquerda para a direita (Barra: 200 μ m).

Nematoda gen. sp. Tipo 1

Um Nematoda fêmea nomeado Tipo 1 foi encontrado em acentuado grau de degradação não tendo sido possível sua identificação específica. No entanto, esta fêmea possuía grande quantidade de ovos bem visíveis, alguns inférteis e outros larvados. Os ovos com casca espessa mediam 37,8 (35-40) de comprimento por 27,9 (25-30) μm de largura (Figura 7).

Nematoda gen. sp. Tipo 2

Fêmea (um espécime): comprimento do corpo 4612 e 75 de largura. Anel nervoso a 92 da região anterior. Vulva a 1160 da região anterior. Comprimento do ovojector 240 e braços da *vagina vera* iguais. Ânus a 112,5 de distância da cauda. Ovos 49,9 (40-70) \times 27,4 (20-35) (Figura 8A-D)

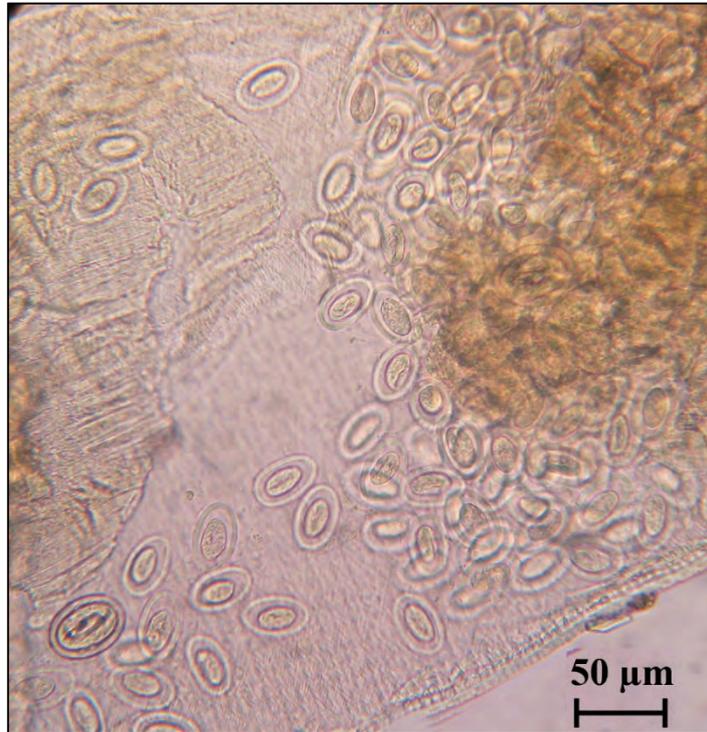


Figura 7. Fotomicrografia de ovos no útero de Nematoda gen. sp. Tipo 1 (Fotografia: Everton Gustavo).

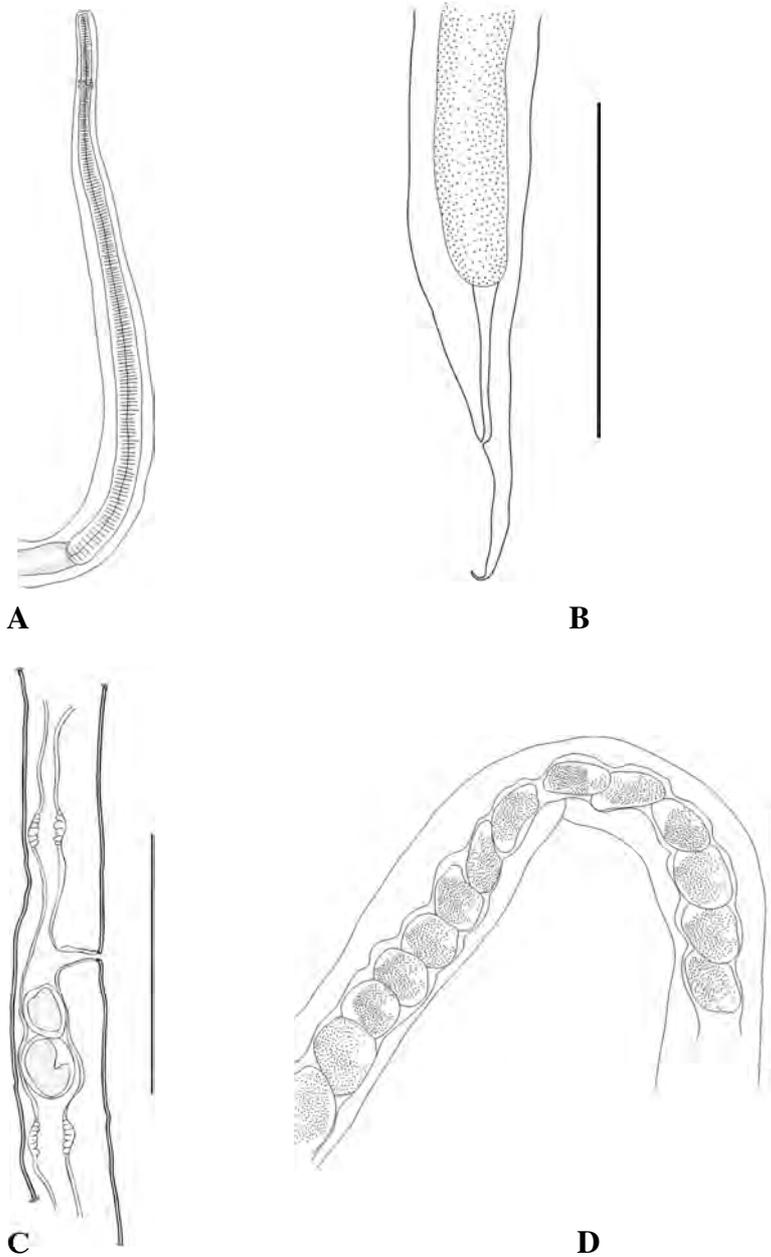


Figura 8. Desenho em câmara clara de Nematoda gen. sp. Tipo 2. A. Fêmea com uma cavidade oral simples e altura do anel nervoso; B. Comprimento da cauda da fêmea com espinho terminal; C. Ovojector com infundíbulo, esfíncter e braços da *vagina vera* iguais em comprimento; D. Ovos em série e morulados no útero (A, B, C, D barra: 200 μm).

3.2 Parasitos de *Leopardus pardalis*

Classe Mammalia
Ordem Carnivora
Família Felidae

Molineus sp. Durette-Dusset e Chabaud (1981)

Trichostrongyloidea Cram, 1927
Molineidae Skrjabin e Schulz, 1937
Anoplostrongylinae Chandler, 1938

Sítio de infecção: Intestino delgado.
Prevalência: 1 de 2 espécimes infectados (50%).
Intensidade: 26 parasitos.

Macho (*baseado em sete espécimes*): Comprimento do corpo 6156 (6000–6250) e 67 (50–82) de largura. Vesícula cefálica 12,6 (10–15). Esôfago 310–325 e anel nervoso 87 (77–92). Espículos longos iguais em forma e comprimento, afinando em direção a extremidade terminal. Porção final de ambos os espículos com um pequena ponta arredondada e projetada a um ângulo de 90°. Comprimento dos espículos 175 (172–177) e gubernáculo 88 (85–90). Bolsa copuladora simétrica de com padrão 2-1-2 de comprimento 90 (70–137) e 96 (80–112) de largura.

Fêmea (*baseado em sete espécimes*): Comprimento do corpo 7330 (6450–8125) e 74 (62–85) de largura. Vesícula cefálica 12,9 (11–15). Esôfago 358 (300–400). Didelfa e anfidelfa: comprimento do ovojector 205 (137–237) e abertura da vulva 1013 (800–1100) na porção final da região anterior. Cauda cônica 105 (87–130) com espinho terminal. Ovos em série no útero e morulados 52 (45–57) × 35 (27–45).

Sínlofe: apresenta doze cristas divididas em grupos de seis dorsais e seis ventrais interrompidas lateralmente. Corte realizado na região mediana do esôfago.

Os espécimes estudados conferem com a identificação de *Molineus* sp. de *C. thous*.

Physaloptera sp. Rudolphi 1819 (Figura 9A-C)

Spirurida Chitwood, 1933
Physalopteroidea Leiper, 1908
Physalopteridae Leiper, 1908

Sítio de infecção: Estômago.
Prevalência: 1 de 2 espécimes infectados (50%).
Intensidade: 1 parasito
Material depositado: CHIOC 38.357
Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Fêmea (*baseada em um espécime*): Comprimento do corpo 4300 e 350 de largura. Anel nervoso a 400 da região anterior. Esôfago com 9500 de comprimento com uma válvula terminal. Vulva a 1400 e ânus a 55 da região posterior. Ovos não visualizados (Figura 9).

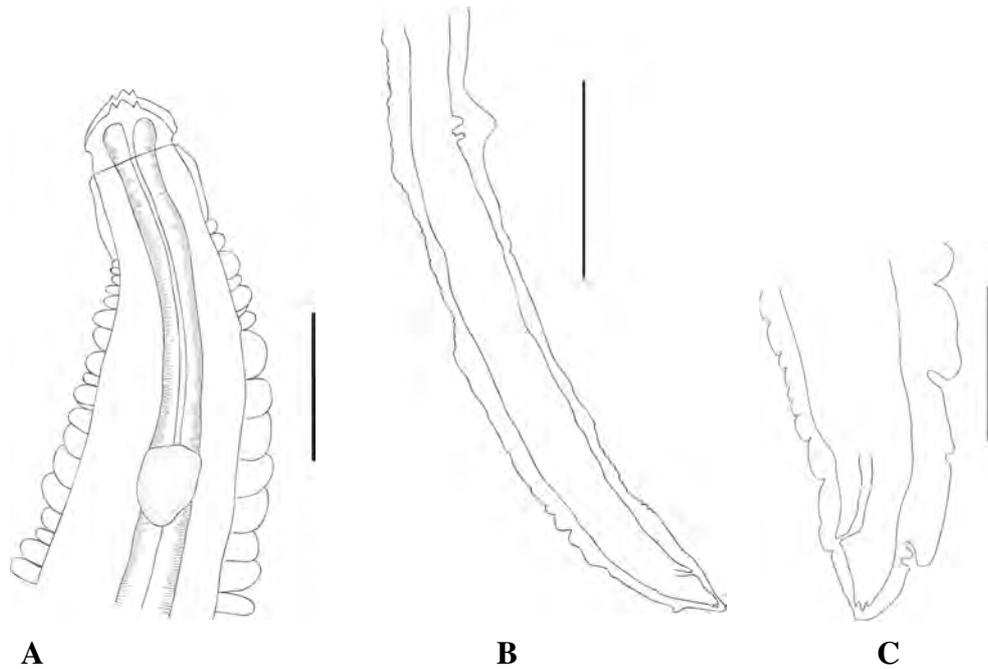


Figura 9. Desenho em câmara clara de *Physaloptera* sp. A. Região anterior contendo dois grandes lábios laterais e triangulares. Cutícula dobrada sobre o corpo, um colarete cefálico e o anel nervoso (Barra: 200 μm); B. Vulva localizada na região média posterior do corpo (Barra: 500 μm); C. Ânus na região posterior e três pequenos espinhos na porção final da cauda da fêmea (Barra: 200 μm).

Oncicola venezuelensis Marteau, 1977
(Figuras 10A-E)

Acanthocephala Rudolphi, 1809
Archiacanthocephala Meyer, 1931
Oligacanthorhynchida Petrochenko, 1956
Oligacanthorhynchidae Southwell & Macfie, 1925

Sítio de infecção: Small intestine.

Prevalência: 2 de 2 hospedeiros (100%)

Intensidade: 26 parasitos em cada hospedeiro.

Material depositado: CHIOC n° 38.417a-d

Nova localidade geográfica: Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Macho (*baseado em três espécimes*): Comprimento total do corpo 9167 (5625–12500) e largura 1167 (750–1500) (Figura 10A). Probóscide 433 (400–500) de comprimento e 507 (370–600) de largura (Figura 10B). Ganchos: I-120–125, distância entre as raízes (dr) 100–110; II-145–150, dr 100–115; III-125; dr 105–110; IV-105–110, dr: 90–100; V-95–105, dr 85–85; VI-95–100, dr 80–85 (Figura 10C). Receptáculo da probóscide 960 (600–1180), parede simples. Pescoço 220–270 (245) de comprimento por 200 de largura. Testículo anterior 930–1180 de comprimento e 500–600 de largura. Testículo anterior 1040–1250 de comprimento e 600–680 de largura. Glândulas de cimento 600–700 de comprimento e 550–850 de largura. Bolsa de Safftigen 1150–1200 de comprimento e 550–650 de largura. Bolsa copuladora 1500 de comprimento e 550 de largura.

Fêmea (*baseado em sete espécimes*): Comprimento total do corpo 9893 (6250–13250) e largura 1471 (1000–1950) (Figura 10D). Probóscide 540 (430–600) de comprimento e 670 (650–700) de largura. Ganchos: I- 127 (110–140), dr 122 (110–140); II-103 (80–120), dr 89 (75–100); III-88 (70–100), dr 73 (60–85); IV-84 (70–90), dr 77 (65–85); V-81 (70–100), dr 70 (60–85); VI-62 (50–70), dr 52 (50–60). Receptáculo da probóscide 1060 (970–1200), parede simples. Pescoço 300–340 (320) de comprimento por 400–550 (476) de largura. Gânglio cerebral 110 de comprimento por 110 de largura. Sino uterino 422 (350–500) de comprimento e 110 (100–130) de largura. Comprimento do útero 610 (400–720) e comprimento do esfíncter 318 (200–400). Ovos 42 (30–55) × 26 (22–30) (Figura 10E).

As imagens por MEV evidenciaram um tronco ligeiramente achatado e enrugado, com uma tromba globular (Figura 9A) com curto e liso do pescoço (Figura 11B). A probóscide apresentada 36 ganchos divididos em seis filas longitudinais de seis ganchos de cada uma (Figura 11C). Os ganchos diferem em tamanho e forma, diminuindo progressivamente em tamanho de apical para posições basais na probóscide. Gancho I, II e III são 'em forma de cinzel' na ponta. O poro genital feminino é subterminal (Figura 11D).

3.3 Análises moleculares e filogenia baseada na região ITS, 5.8S, ITS2 e 28S rDNA

As sequências genéticas foram depositadas no GenBank com os números de acesso KU521566 (ITS1, 5.8S e região ITS2 com 681 pb) e KU521567 (parcial 28S rDNA parciais com 747 pb). Os taxa utilizados na filogenia estão listados na Tabela 1.

O resultado do BLAST para região ITS1, 5.8S e ITS2 indicou uma identidade de 89% com cobertura de 38% e uma pontuação máxima de 324 para *Macracanthorhynchus ingens* (AF416414), seguido por 89% de identidade com cobertura de 37% e uma pontuação máxima de 309 para *Moniliformis* (Bremser de 1811) (Moniliformidae) (AF416415) e finalmente, uma

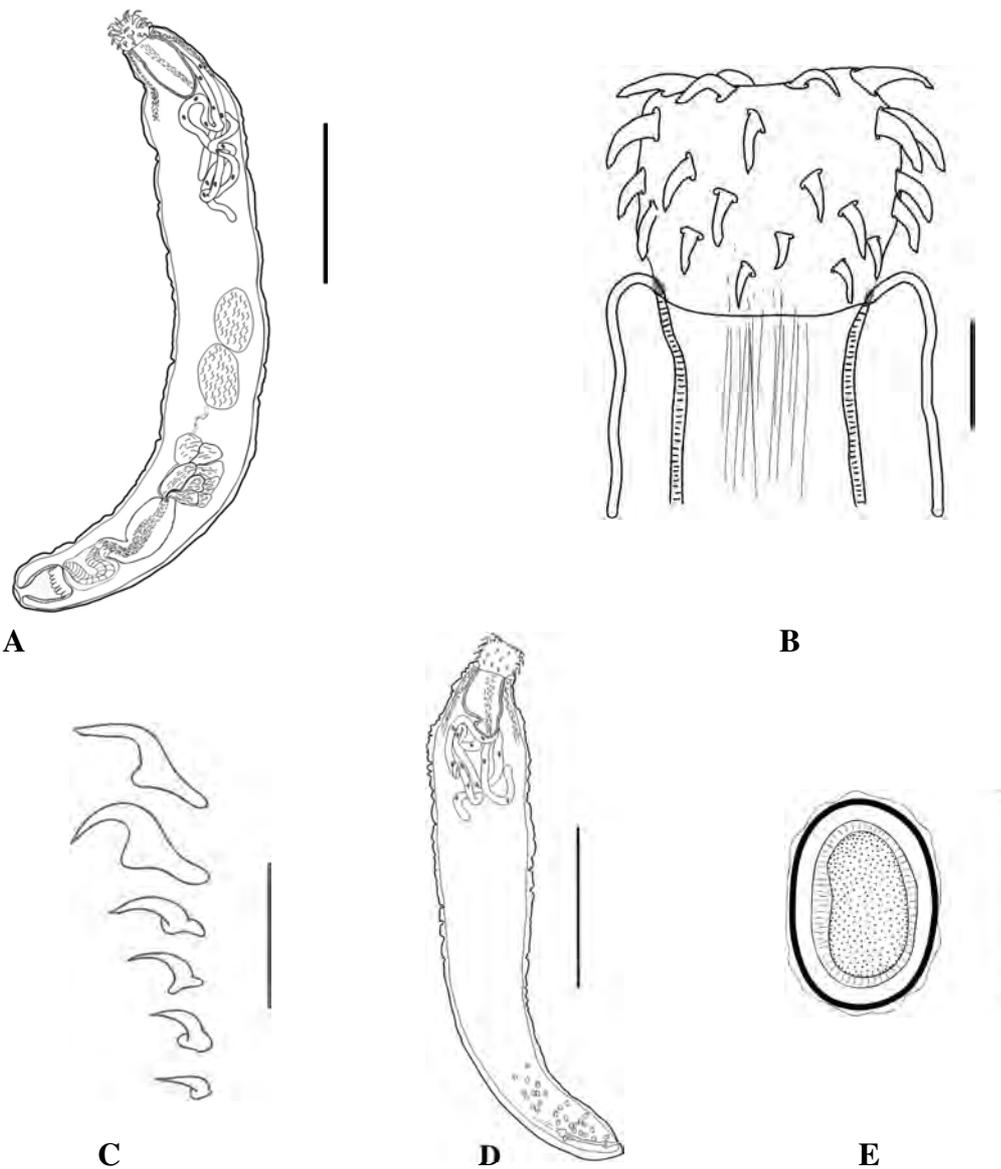


Figura 10. Desenho em câmara clara de *Oncicola venezuelensis* mostrando A. Macho com probóscide globular, lemniscos enovelados, testículos na região mediana do tronco, glândulas de cimento, bolsa de Saëfftigen e bolsa copuladora invaginada (Barra: 2,5 mm); B. Probóscide globular e ganchos (Barra: 250 μ m); C. Ganchos I, II, III, IV, V e VI, de cima para baixo (Barra: 250 μ m); D. Fêmea com probóscide, lemnisco e poro genital subterminal (Barra: 2,5 mm); E. Ovo com quatro camadas, sendo a externa membranosa (Barra: 50 μ m).

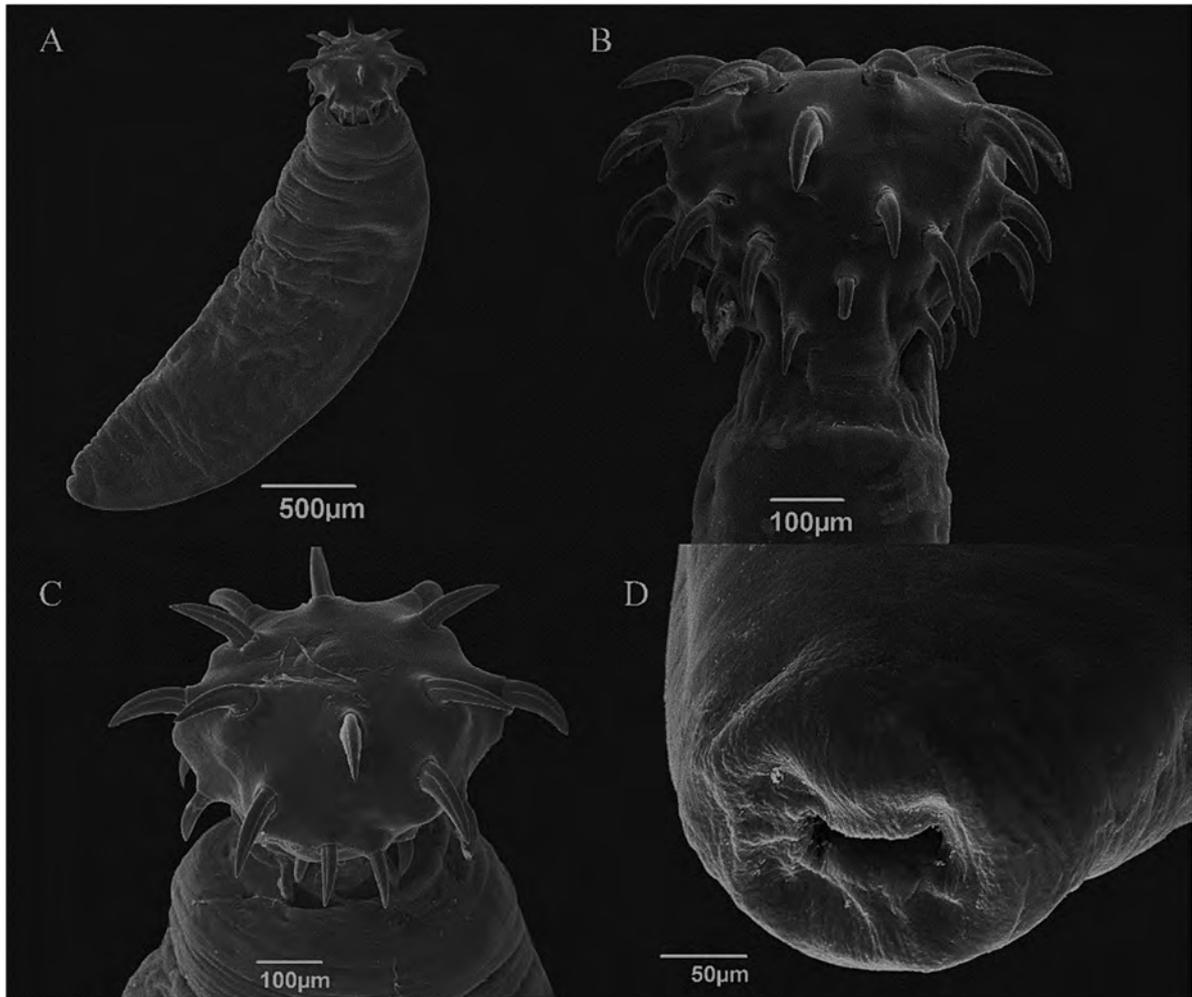


Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Oncicola venezuelensis* mostrando: A. Corpo inteiro com probóscide; B. Probóscide com ganchos e pescoço; C. Probóscide globular com 36 ganchos com ponta com formado de cinzel e D. Poro genital subterminal na fêmea.

Tabela 1 Lista de espécies de acantocefalos utilizado nas análises filogenéticas de *Oncicola venezuelensis* com as sequências de ITS1, 5.8S, e ITS2 e gene parcial 28S rRNA.

Espécies	Família	Gene	Acesso no GenBank
<i>Oncicola venezuelensis</i>	Oligacanthorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	KU521566
<i>Macracanthorhynchus ingens</i>	Oligacanthorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	AF416414
<i>Oncicola</i> sp.	Oligacanthorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	AF416416
<i>Mediorhynchus</i> sp.	Gigantorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	AF416413
<i>Acanthosentis cheni</i>	Quadrigyridae	ITS1, 5.8S, ITS2	JX960752
<i>Neoechinorhynchus roseum</i>	Neoechinorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	FJ388981
<i>Neoechinorhynchus emyditoides</i>	Neoechinorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	KC004175
<i>Neoechinorhynchus schmidtii</i>	Neoechinorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	KC004173
<i>Pseudoacanthocephalus nguyenthileae</i>	Echinorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	KC491890
<i>Pseudoacanthocephalus nickoli</i>	Echinorhynchidae	ITS1, 5.8S, ITS2	KC491884
<i>Polymorphus minutus</i>	Polymorphidae	ITS1, 5.8S, ITS2	AY532067
<i>Polymorphus altmani</i>	Polymorphidae	ITS1, 5.8S, ITS2	AY532066
<i>Brachionus diversicornis</i> *	Brachionidae	ITS1, 5.8S, ITS2	JN605277
<i>Lecane bulla</i> *	Lecanidae	ITS1, 5.8S, ITS2	EU202670
<i>Oncicola venezuelensis</i>	Oligacanthorhynchidae	partial 28S rRNA	KU521567
<i>Oncicola</i> sp.	Oligacanthorhynchidae	partial 28S rRNA	AY210467
<i>Oncicola</i> sp.	Oligacanthorhynchidae	partial 28S rRNA	AY829089
<i>Oligacanthorhynchus tortuosa</i>	Oligacanthorhynchidae	partial 28S rRNA	AY210466
<i>Macracanthorhynchus ingens</i>	Oligacanthorhynchidae	partial 28S rRNA	AY829088
<i>Mediorhynchus</i> sp.	Gigantorhynchidae	partial 28S rRNA	AY829087
<i>Acanthocephalus lucii</i>	Echinorhynchidae	partial 28S rRNA	KM656148
<i>Echinorhynchus truttae</i>	Echinorhynchidae	partial 28S rRNA	AY829101
<i>Polymorphus obtusus</i>	Polymorphidae	partial 28S rRNA	JX442184
<i>Polymorphus minutus</i>	Polymorphidae	partial 28S rRNA	EU267819
<i>Neoechinorhynchus schmidtii</i>	Neoechinorhynchidae	partial 28S rRNA	HQ634788
<i>Neoechinorhynchus emyditoides</i>	Neoechinorhynchidae	partial 28S rRNA	HQ634782
<i>Polyacanthorhynchus caballeroi</i>	Polyacanthorhynchidae	partial 28S rRNA	DQ089738
<i>Brachionus patulus</i> *	Brachionidae	partial 28S rRNA	AY829084
<i>Lecane bulla</i> *	Lecanidae	partial 28S rRNA	AY829083

*Rotifera como grupo externo

identidade de 97% com cobertura de 25% e uma pontuação máxima de 291 para *Oncicola* sp. (AF416416).

Quando a região ITS1 foi analisado separadamente, o resultado BLAST indicou nenhuma semelhança significativa com sequências depositadas no GenBank, resultado similar ocorreu para a região ITS2. O gene do 5.8S rDNA foi descrito como tendo 99% de identidade com cobertura de 99% para *M. moniliformis* (AF416415), assim como a identidade de 99% com 98% de cobertura para *Oncicola* sp. (AF416416) e uma pontuação máxima de 289 e 281, respectivamente.

A análise filogenética da sequência de gene 5.8S rDNA resultou em uma árvore inconclusiva para separar Oligacanthorhynchidae de Gigantorhynchidae e Moniliformidae. Árvores individuais para cada região ITS1 e ITS2 rDNA também resultou em achados inconclusivos, com baixo suporte estatístico para as espécies de Oligacanthorhynchidae.

A árvore utilizando a completa ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA melhor representou as relações filogenéticas entre as famílias acantocéfalos com suporte estatístico maior quando *M. moniliformis* foi excluído. Nossa sequência de *O. venezuelensis* foi alinhado com outras 13 sequências de diferentes famílias de Acantocéfalos. O melhor modelo de substituição para região ITS1, 5.8S e ITS2 foi Tamura-Nei 3 parâmetros com distribuição gama (+G) e sítios invariáveis (+I). Árvores utilizando a MV produziu uma árvore com -ln de -3929,701. Com base na análise, o clado Oligacanthorhynchidae foi de 99% de suporte e compreendida nossa sequência de *O. venezuelensis*, *Oncicola* sp. e *Macracanthorhynchus ingens* (von Linstow, 1879) e está intimamente relacionado com Gigantorhynchidae (100% de suporte). Outros cladus incluía espécies de Quadrigyridae Van Cleave, 1920 e Neoechinorhynchidae (Ward, 1917) agrupados em uma reamostragem de bootstrap de 100%. Echinorhynchidae Cobbold, 1876 e Polymorphidae Meyer de 1931 aparecem formando um clado com suporte estatístico de 100% (Figura 12).

Para gene parcial 28S rDNA, o resultado do BLAST indicou uma identidade de 89% com cobertura de 100% e uma pontuação máxima de 917 para *Oncicola* sp. (AY210467). Nossa sequência da LSU foi alinhada com outras 14 sequências de acantocéfalo. O melhor modelo de substituição para LSU no nosso conjunto de dados foi Hasegawa-Kishino-Yano, com distribuição gama (+G), e a probabilidade máxima inferida rendeu uma árvore com -ln de -4147,816. A árvore MV mostrou a Oligacanthorhynchidae (91% suporte), Gigantorhynchidae (91%), Echinorhynchidae (100%), Polymorphidae (100%), Neoechinorhynchidae (100%) e Polyacanthorhynchidae Golvan, 1956 como um clado basal. O clado Oligacanthorhynchidae compreendeu duas sequências diferentes de *Oncicola*, *Macracanthorhynchus ingens*, *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Leidy, 1850) e nossa sequência de *O. venezuelensis* está em uma posição basal com 91% de valor de *bootstrap*. Semelhante a árvore MV ITS1, 5.8S e ITS2, Gigantorhynchidae formou um clado aninhado à Oligacanthorhynchidae (91% suportada), bem separada do clado de Echinorhynchidae (100%) (Figura 13).

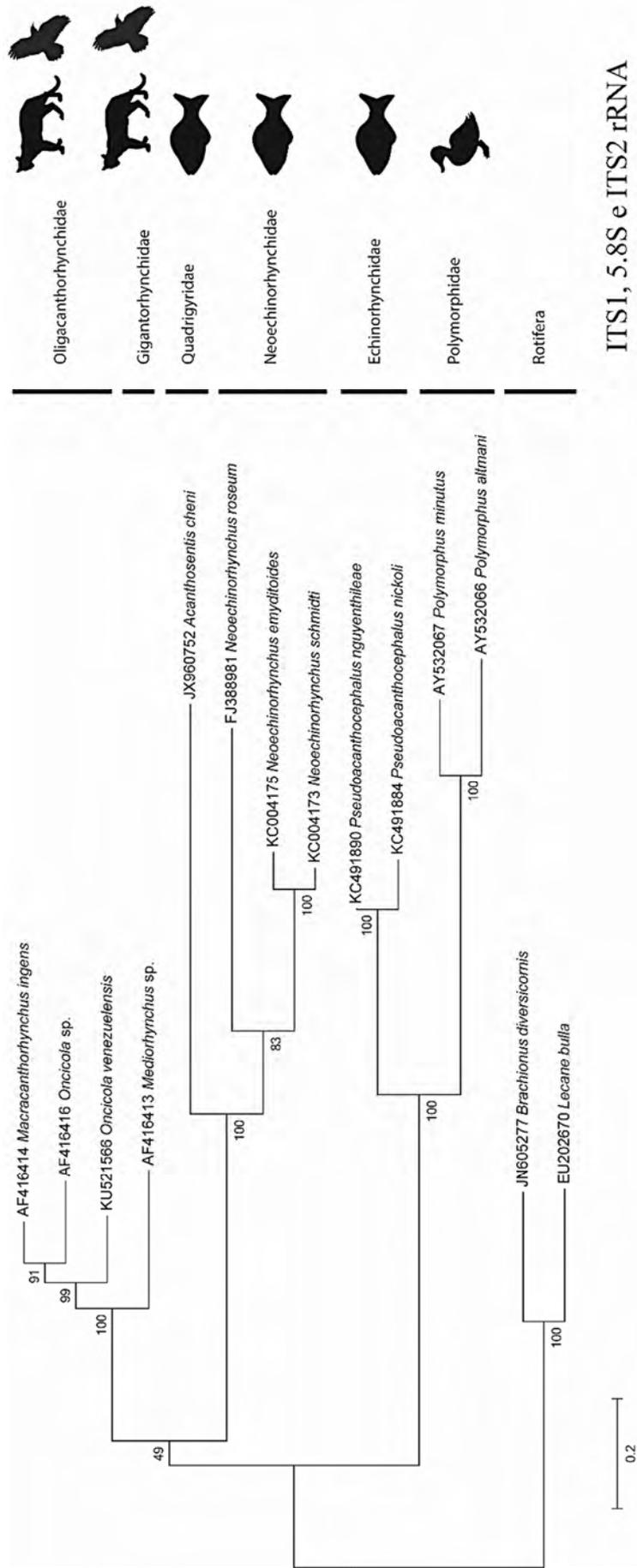


Figura 12. Máxima verossimilhança de *Oncicola venezuelensis* baseada com ITS1, 5.8S e ITS2 mostrando o relacionamento com outras espécies de acantocéfala. Números (%) nos braços indicam 5.000 de reamostragem de *bootstrap*. Os animais representam hospedeiros definitivos dos grupos. Os números de acesso do GenBank estão mostrados e a barra de escala indica a mutação de nucleotídeos por sítios.

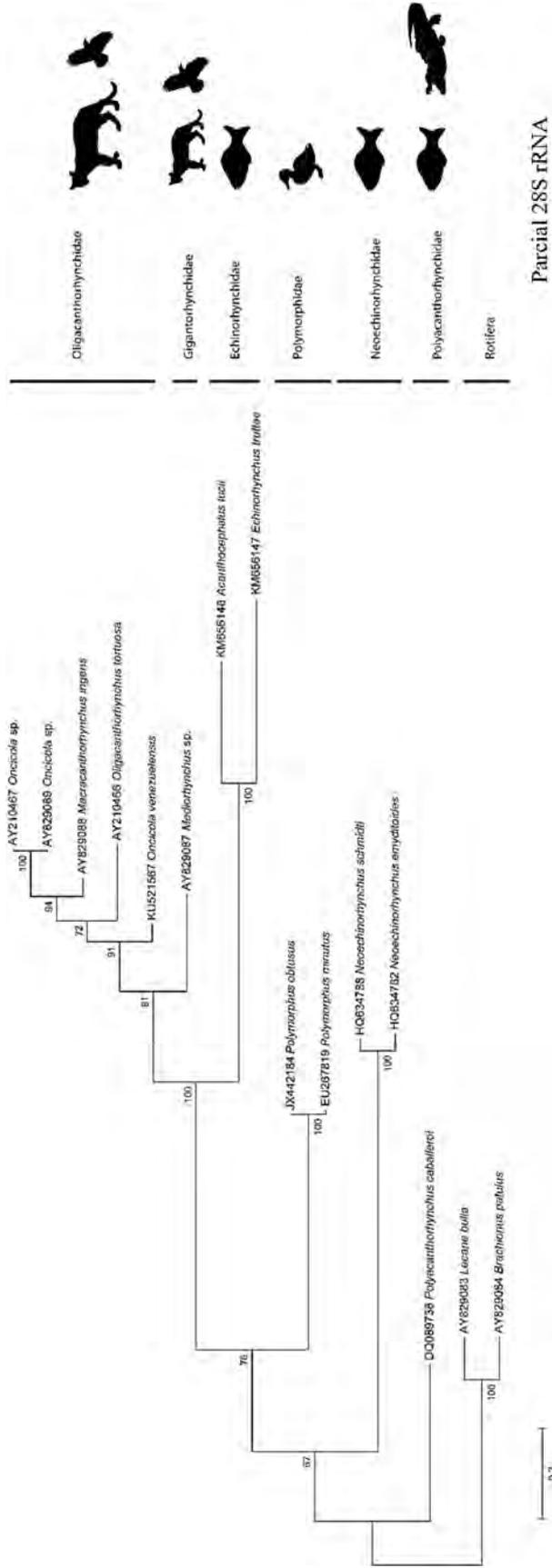


Figura 13. Máxima verossimilhança de *Oncicola venezuelensis* baseada no gene 28S rDNA mostrando o relacionamento com outras espécies de acantocéfala. Números (%) nos braços indicam 5.000 de reamostragem de *bootstrap*. Os animais representam hospedeiros definitivos dos grupos. Os números de acesso do GenBank estão mostrados e a barra de escala indica a mutação de nucleotídeos por sítios.

Um gráfico de correlação de *Oncicola* spp. demonstra os diferentes hospedeiros mamíferos carnívoros no Brasil e mostra que *L. pardalis* é um hospedeiro com maior diversidade de espécies, e *O. venezuelensis* é a quinta espécie do gênero agora relatada neste hospedeiro no país (Figura 14).

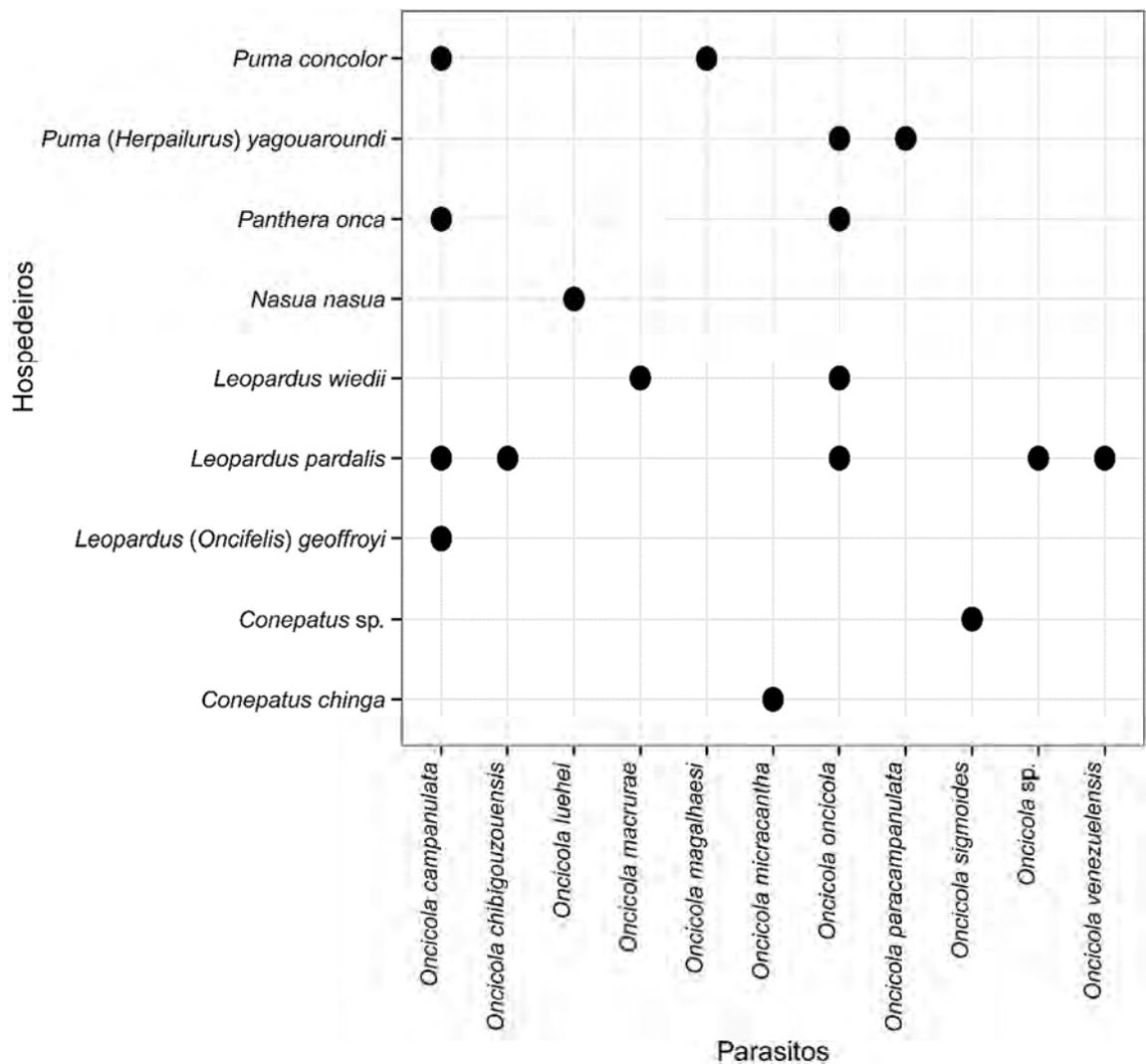


Figura 14. Distribuição parasito-hospedeiro de espécies de *Oncicola* no Brasil.

4 DISCUSSÃO

O Parque Nacional Serra da Capivara apresenta uma fauna de mamíferos diversificada mas não haviam estudos prévios de helmintos adultos provenientes de mamíferos na região. Os hospedeiros estudados estavam congelados e nas necropsias, os parasitos coletados nem sempre estavam em bom estado de conservação. Mesmo assim, foi possível realizar estudos morfológicos, ultraestruturais e genéticos como anteriormente descritos.

Cerdocyon thous estava parasitado por seis espécies de helmintos: *Toxocara canis*, *Molineus* sp., *Ancylostoma buckleyi*, *Oncicola canis* e mais dois Nematoda gen. sp. não identificados. Embora os estudos moleculares tenham sido conduzidos com todos os parasitos encontrados (com exceção daqueles em que havia apenas um espécime), somente foram obtidos resultados para *T. canis*. As características de *T. canis* incluem a presença de uma asa cervical na região anterior, vulva no quarto anterior do corpo e ovos subglobulares ou globulares com superfície ornamentada. Apenas quatro fêmeas de *T. canis* foram encontradas e para auxiliar na diagnose específica, as regiões do *cox1* do mtDNA e ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA foram sequenciadas, permitindo a identificação específica devido à alta similaridade com sequências de *T. canis* depositadas no GenBank.

A mesma espécie de *Molineus* sp. foi encontrada em *C. thous* e em *L. pardalis*, não se assemelhando com nenhuma das espécies do gênero que ocorrem no Brasil, principalmente devido a uma vesícula cefálica pouco desenvolvida, o quarto raio mais desenvolvido e a ornamentação e comprimento dos espículos. Há pelo menos sete espécies deste gênero no Brasil dentre elas: *Molineus barbaris* Cameron, 1936, *M. brachiurus* Costa e Freitas, 1967, *M. elegans* (Travassos, 1921) *M. felineus* Cameron, 1923, *M. major* Cameron, 1936, *M. nasuae* Lent e Freitas, 1938 e *M. paraensis* Travassos, 1937 (VIEIRA et al., 2008; LENT; FREITAS, 1938). *Molineus* sp. agora encontrado está sendo estudado detalhadamente, sendo aqui registrada a primeira ocorrência do gênero em *L. pardalis*.

No Brasil existem atualmente seis espécies de *Ancylostoma* parasitando carnívoros silvestres: *Ancylostoma bidens* Molin, 1861, *A. braziliense* Gomes de Faria, 1910, *A. buckleyi*, *A. caninum* (Ercolani, 1859), *A. conepati* Solanet, 1911 e *A. pluridentatum* Alessandrini, 1905 (VIEIRA et al., 2008). São espécies relativamente similares, mas *A. buckleyi* pode ser diferenciada das demais principalmente por possuir um par de dentes dorso-laterais na capsula bucal.

Oncicola canis foi referida parasitando *C. thous* no Espírito Santo, tendo os autores relatado ter encontrado 14 amostras positivas para *O. canis* de um total de 19 cachorros-do-mato examinados (RODRIGUES et al. 2006). Em São Paulo, Griese (2007) encontrou de nove em *C. thous* analisados, apenas um espécime fêmea. Ainda não há publicações em revistas indexadas desta infecção já que dos dois trabalhos citados acima são respectivamente, um trabalho de congresso e uma tese. Em nosso estudo apenas quatro espécimes machos foram encontrados parasitando um cachorro-do-mato no Estado do Piauí, reforçando a idéia da baixa prevalência deste parasito em *C. thous*.

Leopardus pardalis ocorre do Texas até o Norte da Argentina e noroeste do Uruguai (OLIVEIRA, 1994; MURRAY; GARDNER, 1997). Esta espécie de hospedeiro tem uma ampla distribuição no Brasil, mas a população tem diminuído devido ao desmatamento (OLIVEIRA et al., 2013). Portanto, o PNSC desempenha um papel importante na preservação desta espécie. A helmintofauna de *L. pardalis* da região do PNSC aqui estudada, além de *Molineus* sp., incluiu *Physaloptera* sp. e *Oncicola venezuelensis*. *Physaloptera* sp. já foi referido parasitando jaguatiricas mas como foi encontrada apenas uma fêmea sem ovos, não foi possível uma identificação específica. *Oncicola venezuelensis* foi descrito originalmente em *L. pardalis* na Venezuela (Marteau, 1977), mas recentemente também foi referido no gato doméstico, *Felis catus* Linnaeus, 1758 nas Ilhas Virgens dos EUA (FULLER; NICKOL, 2011).

Estudos paleoparasitológicos realizados no PNSC relataram a ocorrência de ovos de *Oncicola* sp. em coprólitos de felinos em escavações que datam 9.000 anos e seu tamanho era compatível com a espécie *O. campanulata* (60 × 43 µm) que foram encontrados como sendo parasitos de *Leopardus geoffroyi* (d'Orbigny e Gervais), *L. pardalis*, *P. onca* (Linnaeus) e *P. concolor* (Linnaeus) no Brasil (SIANTO et al., 2014). A nova ocorrência de *O. venezuelensis* nesta área do nordeste do Brasil mostra uma interação da distribuição geográfica hospedeiro-parasito. No Brasil, o hospedeiro intermediário de *O. venezuelensis* é desconhecido. Cistacantos foram recuperados e descritos em cupins do Caribe *Nasutitermes acajutlae* (Holmgren), em nódulos subcutâneos de lagartos *Anolis cristatellus* Duméril e Bibron, e *Anolis stratulus* Cope, em mangustos indianos *Herpestes auropunctatus* (Hodgson) e 'Pearly-eyed Thrashers' *Margarops fuscatus* (Vieillot) obtido em St. Thomas nas Ilhas Virgens dos EUA (NICKOL et al., 2006).

As espécies de *Oncicola* spp. parasitando *L. pardalis* no Brasil incluem *O. oncicola*, *O. campanulata*, *O. chibigouzensis*, *Oncicola* sp. e agora *O. venezuelensis* (VIEIRA et al., 2008; FUGASSA, 2015). *Oncicola venezuelensis* difere destas espécies por ter lemniscos que podem se estender até perto dos testículos e glândulas de cimento, além do tamanho significativamente menor de ganchos da probóscide e ovos. Os longos lemniscos às vezes permanecem enovelados na área entre os testículos e o receptáculo da probóscide. Esta primeira análise por microscopia eletrônica de varredura de *O. venezuelensis* revelou a ultraestrutura da forma e distribuição de ganchos das probóscide, bem como a posição subterminal do poro genital feminino.

A análise da sequência ITS1 rDNA de *O. venezuelensis* não mostrou similaridade significativa com sequências depositadas no GenBank, assim como ocorreu na região do ITS2. Estes resultados para os espaçadores internos transcritos (1 e 2) são, provavelmente, devido ao nível elevado de variação para estas regiões associadas ao número reduzido de sequências deste grupo para comparação.

Para estudos filogenéticos, a hipótese de que o gene 5.8S rDNA representaria melhor a filogenia das famílias de acantocéfalos foi testada. Embora o gene 5.8S rDNA tenha menor variação em relação às regiões ITS1 e ITS2, e também conhecida por ser conservado como o gene 18S e 28S rDNA (SCHLÖTTERER et al., 1994), o resultado não foi conclusivo para separar Oligacanthorhynchidae de Gigantorhynchidae e Moliniformidae, embora fosse capaz de separar outras famílias.

Amin et al. (2016) analisaram as sequências do gene 18S rDNA de representantes dessas famílias e relatou que Moniliformidae é grupo irmão de Oligacanthorhynchidae, afirmando que a ordem dos gêneros dentro do Oligacanthorhynchidae não está bem resolvida. Em nossa análise realizada utilizando a região ITS1, 5.8S e ITS2, separadamente ou completa, e a inclusão de *M. moniliformis*, que teve a maior similaridade com a nossa sequência, induziu um suporte muito baixo nos nós internos oferecendo dados inconsistentes para separar espécies e famílias. Quando *M. moniliformis* foi excluído, os valores de *bootstrap* aumentaram, mostrando clados bem sustentados que separam as famílias. Nossa sequência de ITS1, 5.8S e ITS2 de *O. venezuelensis* aparece aninhada com os representantes de Oligacanthorhynchidae, e *Macracanthorhynchus* Travassos, 1917 como um gênero irmão. Oligacanthorhynchidae aparece agrupado com Gigantorhynchidae. Ambas as famílias são conhecidas por parasitar mamíferos e aves (AMIN, 1987; BOLETTE, 2007). Na reconstrução filogenética, *Acanthosentis* Verma e Datta, 1929 (Quadrigyridae) foi considerada grupo irmão para *Neoechinorhynchus* Stiles e Hassall, 1905 (Neoechinorhynchidae), que aparece aninhada dentro da Quadrigyridae com alto valor de suporte estatístico (100%). Neoechinorhynchidae normalmente utilizam peixes de água doce e marinhos, bem como tartarugas como hospedeiros definitivos, e Quadrigyridae geralmente utilizam peixes (AMIN, 1987; BARGER, 2005). Representantes de ambas as famílias são pequenos, um receptáculo da

probóscide com uma parede simples e ganchos na dispostos em seis linhas distintas, com três ganchos em cada um. Quadrigyridae pode ser diferenciada por ter um tronco total ou anteriormente com espinhos, enquanto Neoechinorhynchidae tem um tronco sem espinhos (AMIN, 1987). Echinorhynchidae teve um alto suporte como um clado separado de Polymorphidae (100%). Os primeiros são parasitos típicos de peixes de água doce e marinhos, mas também são capazes de parasitar anfíbios e répteis, e os últimos são encontrados em mamíferos marinhos, e aves aquáticas ou aves piscívoras (GARCÍA-VARELA et al., 2013).

Em relação ao BLAST, para o gene parcial 28S rDNA, *O. venezuelensis* e *Oncicola* sp. (AY210467), embora apresentasse uma elevada cobertura (100%), apresentou uma baixa identidade (89%) para este gene considerado conservado, sugerindo ser de fato espécies diferentes. Análise de MV para 28S rDNA mostrou resultados semelhantes ao ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA, em que Oligacanthorhynchidae forma um clado com suporte elevado de reamostragem de *bootstrap* (91%) e Gigantorhynchidae como grupo irmão (100% suportado). A visão geral da árvore 28S rDNA mostrou que a Oligacanthorhynchidae, Gigantorhynchidae e Echinorhynchidae formam um clado filogeneticamente relacionado com valor de suporte alto (100%). Polymorphidae, Neoechinorhynchidae e Polyacanthorhynchidae formam clad independentes com baixo suporte estatístico (<70%).

Estes novos dados ultraestruturais e genéticos com nova sequência parcial do gene 28S rDNA (LSU), além de sequências de ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA de *Oncicola venezuelensis* parasitos de *L. pardalis* a partir de uma nova localidade geográfica contribuem para melhor compreender a diversidade e distribuição das espécies de *Oncicola*. No mesmo hospedeiro, a nova distribuição geográfica para *Physoloptera* sp. e *Molineus* sp., este último referido em novo hospedeiro adicionam novos dados sobre a biodiversidade local. Os parasitos de cachorro-do-mato, *T. canis*, *A. buckleyi*, *Molineus* sp. e *O. canis* também representam novos dados de distribuição geográfica.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS OVOS DE HELMINTOS DE *Mazama gouazoubira*, *Cerdocyon thous*, *Leopardus pardalis*, *Didelphis albiventris* E *Dasypus novemcinctus* DO PARQUE NACIONAL SERRA DA CAPIVARA, PIAUÌ, BRASIL

RESUMO

O diagnóstico de ovos de helmintos é realizado rotineiramente nas áreas de parasitologia veterinária e humana, pois fornece um exame rápido e de baixo custo para o tratamento das parasitoses. No Parque Nacional Serra da Capivara (PNSC), Piauí, Brasil, os sítios arqueológicos têm revelado ovos de helmintos obtidos em coprólitos que datam de milhares de anos. A identificação específica dos ovos é difícil sem que os parasitos adultos sejam devidamente identificados. O objetivo deste trabalho foi estudar a biodiversidade de ovos de helmintos de mamíferos silvestres do PNSC após a identificação dos parasitos adultos. Sete espécies de mamíferos silvestres de um total de 16 espécimes encontrados mortos foram examinados: Veado-catigueiro, Porco-selvagem, Cutia, Jaguatirica, Cachorro-do-mato, Gambá e Tatu-verdadeiro. Os parasitos coletados do conteúdo gastrointestinal foram identificados por morfologia e genética. Os ovos obtidos a partir de fêmeas adultas foram medidos e fotografados. Um total de doze espécies de helmintos com ovos foram encontrados, sendo uma espécie de Acanthocephala e 11 espécies de Nematoda. No filo Acanthocephala foi encontrado *Oncicola venezuelensis* e dentre os Nematoda, quatro espécies de Aspidoderidae (*Aspidodera raillieti*, *A. subulata*, *A. binansata* e *A. vazi*), dois Trichostrongyloidea (*Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus colubriformis*), dois Molineidae (*Molineus* sp. e *Hadrostrongylus speciosum*), um Toxocaridae (*Toxocara canis*) e ainda mais dois Nematoda gen. sp. não identificado foram notificados. Nossos dados quando comparados com os ovos obtidos em fezes recentes corroboram com a presença de membros de Aspidoderidae e Trichostrongyloidea em mamíferos silvestres na região do parque. Quando comparados com ovos obtidos em coprólitos, os gêneros *Toxocara* e *Oncicola*, aparecem na fauna ancestral e atual de carnívoros, e é provável que espécies dentro deste gênero possam estar mantendo seus ciclos de vida há milênios no parque. Adicionalmente, uma chave de identificação para as espécies encontradas neste estudo foi elaborada para servir de auxílio no diagnóstico das espécies. Estes dados tornam-se importantes porque podem servir de base comparativa para os estudos com fauna de helmintos atual e ancestral realizados no parque.

Palavras-chave: diagnóstico, morfometria, chave de identificação, imagens.

ABSTRACT

The diagnosis of helminth eggs is routinely performed in the areas of human and veterinary parasitology as it provides a quick and low cost result for the treatment of parasitic diseases. In the Serra da Capivara National Park (PNSC), Piauí, Brazil, archaeological sites have revealed helminth eggs obtained in coprolites dating back thousands of years. Specific identification of eggs is difficult without the adult parasites being properly identified. The objective of this work was to study the biodiversity of helminth eggs of wild mammals from the PNSC, after identification of adult parasites. Seven species of wild mammals from a total of 16 specimens found dead were examined: deer, wild pig, agouti, ocelot, dog-eating fox, opossum and armadillo. The parasites collected from the gastrointestinal contents were identified by morphology and genetics. The eggs obtained from female adults were measured and photographed. A total of 12 species of helminth and their eggs were found, being 1 Acanthocephala and 11 Nematoda species. In the phylum Acanthocephala, *Oncicola venezuelensis* was found and among the Nematoda, four species of Aspidoderidae (*Aspidodera raillieti*, *A. subulata*, *A. binansata* and *A. vazi*), two Trichostrongyloidea (*Haemonchus* sp. and *Trichostrongylus colubriiformis*), two Molineidae (*Molineus* sp. and *Hadrostrongylus speciosum*), a Toxocaridae (*Toxocara canis*) and two Nematoda gen. sp. unidentified were reported. Our data compared with the eggs obtained from fresh faeces corroborate the presence of Aspidoderidae and Trichostrongyloidea members in wild mammals in the park area. When compared to eggs obtained in coprolites, the genera *Toxocara* and *Oncicola* appear in the ancestral and current fauna of carnivores, and is likely that species within this genus may be keeping their lifecycles for millennia in the park. In addition, an identification key to the species found in this study was designed to serve as an aid in the diagnosis of species. These data become important because they can serve as a comparative basis for the studies of current and ancestral fauna of helminths occurring in the park.

Key words: diagnosis, morphometry, key of identification, images.

1 INTRODUÇÃO

Nas escavações em sítios arqueológicos de populações pré-históricas por todo o mundo, diferentes ovos de parasitos têm sido encontrados em coprólitos de animais ou seres humanos (BELTRAME et al 2014; SIANTO et al., 2014). Estes achados forneceram informações que têm ajudado a compreender melhor o estilo de vida, a origem e evolução dos parasitos, além de acrescentar informações importantes sobre as relações entre os hospedeiros e seu ambiente (BELTRAME et al. 2014). Tais estudos, especialmente com ovos de helmintos encontrados em coprólitos de animais, tem crescido muito ao longo das últimas décadas, revelando infecções em vários grupos zoológicos, bem como datações que vão de milhões de anos (SIANTO et al. 2014). Além disso, os avanços no conhecimento dos ovos ou larvas de helmintos intestinais foi intensificado com os estudos paleoparasitológicos, cujo material é obtido na maioria das vezes em coprólitos (ARAÚJO; FERREIRA, 2000).

O diagnóstico de helmintos realizado através da caracterização dos ovos é feito rotineiramente na parasitologia veterinária e humana, pois fornece um resultado rápido e de baixo custo para as parasitoses (BRANDÃO et al., 2009). Por outro lado, a ausência de informações mais precisas sobre as características dos ovos, tais como tamanho, número de ovos medidos e análise de dispersão, em conjunto com imagens de alta qualidade não possibilita identificações confiáveis (BRANDÃO et al., 2009). É evidente que estes estudos com base na caracterização dos ovos ou larvas tem tornado um desafio principalmente devido a semelhanças entre ovos e escassez na descrição encontrada na literatura. De fato, o diagnóstico mais apropriado é alcançado através da descrição do parasito adulto e de seus ovos encontrados diretamente de seus respectivos hospedeiros.

O objetivo deste capítulo é estudar a biodiversidade de ovos de helmintos gastrointestinais de mamíferos silvestres do Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trato gastrointestinal de 16 mamíferos silvestres encontrados mortos no PNSC foi doado pela Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM) para o Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental - FIOCRUZ. As espécies incluíram: Veado-catingueiro (n=4) (4♀), Cachorro do mato (n=2) (1♀1♂), Jaguatirica (n=2) (1♀1♂), Gambá-de-orelha-branca (n=3) (1♀2♂); Tatu-verdadeiro (n=2) (2♂); Cutia (n=2) (1♀1♂) e Porco selvagem (n=1) (1♀). Os parasitos encontrados foram lavados em soro fisiológico e mantidos em álcool 70%. Os Nematoda foram diafanizados em glicerina e os Acantocephala foram corados com Carmalumen de Mayer para os estudos morfológicos. Alguns espécimes foram submetidos a análise genética para a caracterização genética de regiões do DNA ribossomal (rDNA) e mitocondrial (mtDNA) tais como: citocromo c-oxidase 1 (*cox1*) mtDNA, espaçador interno transcrito (ITS) 1 e 2, e 5.8S rDNA, 18S rDNA, 28S rDNA e 16S rDNA como auxílio no diagnóstico, conforme descrito nos capítulos I e II.

Ovos de fêmeas maduras foram medidos através do microscópio Olympus (Carl Zeiss) que possuía uma câmera acoplada AxioCam ERc5s (10MB). A microfotografia foi obtida utilizando o programa AV LE (AxioVision Limited Edition). As fêmeas foram seccionadas (quando possível) para obtenção dos ovos. As medidas do comprimento e largura dos ovos são dados em µm.

3 RESULTADOS

Os mamíferos estudados foram *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814) (Veado-catingueiro), *Cercopithecus thous* Linnaeus, 1766 (Cachorro do mato), *Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758 (Jaguatirica), *Didelphis albiventris* (Lund 1840) (Gambá-de-orelha-branca), *Dasyurus novemcinctus* Linnaeus 1758 (Tatu-verdadeiro), *Dasyprocta nigriclunis* Osgood, 1916 (Cutia), e *Tayassu tajacu* (Linnaeus 1789) (Porco selvagem). Dos 16 espécimes analisados, dois *D. nigriclunis*, um *T. tajacu* e dois *M. gouazoubira* não estavam parasitados por helmintos gastrointestinais. Levando em conta os hospedeiros parasitados, 12 fêmeas maduras foram encontradas, sendo 11 espécies pertencentes ao filo Nematoda e 1 espécie do filo Acanthocephala. A lista nominal dos mamíferos e seus respectivos parasitos estudados, assim como as medidas dos ovos são apresentados na Tabela 1. Adicionalmente, foi elaborada uma chave dicotômica para auxiliar na identificação dos ovos referentes às espécies encontradas neste estudo (Tabela 2).

Quatro espécimes de *Toxocara canis* foram encontrados no intestino delgado *C. thous*. Seus ovos são arredondados, podendo ser sub-globulares ou globulares. Apresentam casca espessa e ornamentada (Figura 1 A). Espécimes de *T. canis* de *C. thous* foram geneticamente caracterizados no capítulo II para as regiões citocromo c-oxidase subunidade1 (*cox1*) e ITS1, 5.8 e ITS2 rDNA. As sequências obtidas de *T. canis* neste estudo foram similares às da mesma espécie depositada no GenBank com nº de acesso JN593098, indicando 95% de similaridade no BLAST para o gene *cox1* e 99% para a região ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA com nº LM055644.

Tabela 1. Medida de ovos de parasitos gastrointestinais de mamíferos silvestres do Parque Nacional Serra da Capivara.

Hospedeiro	Parasitos	N° de parasitos	N° de ovos medidos	Amplitude de medida						Média			Desvio Padrão		
				Comprimento		Largura		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura		
				Mín	Máx	Mín	Máx								
Cervidae															
<i>Mazama gouazoubira</i>	<i>Haemonchus</i> sp.	1	10	80,3	91,5	43,1	54,4	85,7	48,2	3,9	3,0				
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	56	20	61,5	75,3	31,0	42,4	70,2	37,4	5,0	4,4				
Canidae															
<i>Cerdocyon thous</i>	<i>Molineus</i> sp.	20	18	40,0	55,0	25,0	42,5	49,7	33,8	4,0	4,9				
	<i>Toxocara canis</i>	4	20	60,0	70,0	60,0	65,0	64,0	61,0	2,5	2,0				
	Nematoda tipo 1	1	20	35,0	40,0	25,0	30,0	37,8	27,9	1,3	1,8				
	Nematoda tipo 2	1	20	45,0	55,0	22,5	35,0	49,9	27,4	2,5	3,2				
Felidae															
<i>Leopardus pardalis</i>	<i>Molineus</i> sp.	28	20	45,0	57,5	27,5	45,0	52,0	35,4	3,7	5,0				
	<i>Oncicola venezuelensis</i>	52	20	30,0	50,0	22,5	25,0	43,3	23,0	5,5	1,0				
Didelphidae															
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>Aspidodera raitllieri</i>	98	20	50,0	72,5	42,5	47,5	63,9	45,0	5,8	1,8				
	<i>Aspidodera subulata</i>	1	20	62,5	72,5	42,5	50,0	67,0	45,8	3,5	2,3				
Dasypodidae															
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	<i>Aspidoreta binansata</i>	26	20	57,5	70,0	42,5	50,0	64,3	45,6	2,9	2,1				
	<i>Aspidoreta vazi</i>	25	20	62,5	67,5	40,0	45,0	66,3	43,3	1,7	1,8				
	<i>Hadrostrongylus speciosum</i>	37	20	50,0	57,5	27,5	32,5	54,0	31,1	1,8	1,7				

Os ovos do *Acanthocephala Oncicola venezuelensis* do intestino delgado de *L. pardalis* são transparentes e elípticos com casca espessa com quatro camadas, sendo a mais externa fina e membranosa (Figura 1 B). As sequências genéticas destes adultos com ovos estão depositadas no GenBank para as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA, nº KU521566 e da região parcial 28S rDNA nº KU521567.

O Nematoda gen. sp. Tipo 1 foi encontrado parasitando o intestino grosso de *C. thous*. Seus ovos são pequenos, elípticos, com casca espessa e lisa, podendo ter uma larva (Figura 1 C). Devido ao alto grau de degradação principalmente na região anterior, não foi possível estudá-la por morfologia, no entanto seus ovos contidos no útero estavam claros e bem visíveis possibilitando seu estudo.

Um total de quatro espécies de *Aspidodera* foram encontradas no ceco e no intestino grosso dos hospedeiros. Os ovos das espécies são muito similares, tanto no formato quanto nas medidas. São elípticos com casca lisa e espessa. As espécies identificadas foram: *A. raillieti* (Figura 1 D) e *Aspidodera subulata* (Figura 1 E), parasitos de *D. albiventris*. Sequências de *A. raillieti* foram obtidas e depositadas no GenBank com nº KX954128 (parcial 18S rDNA), KX954129 (ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA), KX954130 (parcial 28S rDNA), KX954131 (parcial 16S rDNA) e KX962175 (*cox1*). Em *D. novemcinctus* foram encontrados os parasitos *A. binansata* (Figura 1 F) e *Aspidodera vazi* (Figura 1 G) depositada no GenBank com nº KX951458 (parcial 16S rDNA).

O Nematoda gen. sp. Tipo 2 (Figura 1 H) foi encontrado parasitando o intestino delgado de *C. thous*. Os ovos elípticos de casca fina não apresentando espaço hialino entre o embrião e a casca.

As espécies de Molineidae incluem *Molineus* sp. (Figura 1 I) parasito do intestino delgado de *C. thous* e *L. pardalis*, e *Hadrostrongylus speciosum* (Figura 1 J), parasito de *D. novemcinctus*, encontrados no ceco e no intestino grosso de seus hospedeiros. Estas espécies possuem ovos elípticos com casca fina e morulados. Seus ovos também apresentam um espaço hialino entre o embrião e a casca.

Haemonchus sp. (Figura 1 K) e *Trichonstrongylus colubriformis* (Figura 1 L) foram encontrados no intestino delgado de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira*. Pertencem a superfamília Trichostrongyloidea e seu ovos são relativamente similares; elípticos ou ovais, de casca fina, transparente e lisa. No entanto, podem ser diferenciados principalmente pelo tamanho que é relativamente maior em *Haemonchus* sp.

As fotomicrografias dos ovos são apresentadas na Figura 1.

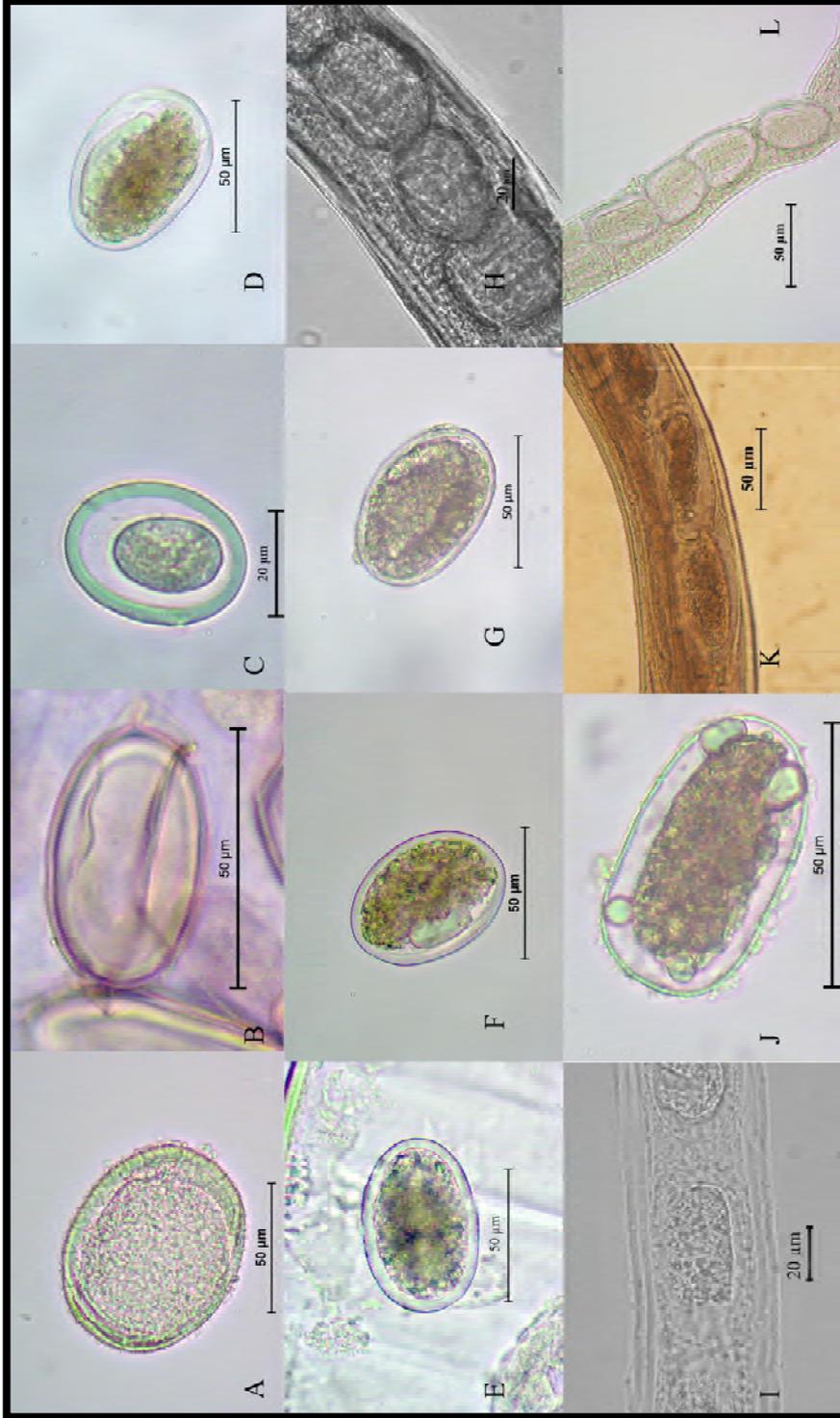


Figura 1. A. *Toxocara canis*; B. *Oncicola venezuelensis*; C. *Nematoda* gen. sp. Tipo 1; D. *Aspidodera raillieti*; E. *Aspidodera subulata*; F. *Aspidodera binansata*; G. *Aspidodera vazi*; H. *Nematoda* gen. sp. Tipo 2.; I. *Molineus* sp.; J. *Hadrostrongylus speciosum*; K. *Haemunchus* sp; L. *Trichostrongylus colubriformis*

1. Ovos globulares ou subglobulares, com casca espessa ornamentada, 60-70 x 60-65 ... *Toxocara canis* de *Cerdocyon thous*. Figura 1A.
Ovos elípticos sem as características acima2
2. Ovos com quatro envoltórios, sendo o externo membranoso, 30-50 x 22-25 *Oncicola venezuelensis* de *Leopardus pardalis*. Figura 1B.
Ovos sem as características acima3
3. Ovos com casca espessa4
Ovos sem casca espessa6
4. Ovos pequenos, morulados ou com larva, 35-40 x 25-30 Nematoda gen. sp. Tipo 1. Figura C.
Ovos maiores com comprimento mínimo de 42 µm5
5. Parasitos de *Didelphis albiventris*, ovos 50-72 x 42-50 *Aspidodera raillietii* Figura 1D, ou *Aspidodera subulata*. Figura 1E.
Parasitos de *Dasyfus novemcinctus*, ovos 57-70 x 40-50 *Aspidodera binansata*. Figura 1F, ou *Aspidodera vazii* Figura 1G.
6. Ovos com espaço hialino entre o embrião e a casca fina7
Ovos sem a característica acima. Comprimento 45-55 x 22-35 de largura Nematoda gen. sp. Tipo 2 de *Cerdocyon thous*. Figura 1H.
7. Ovos relativamente pequenos. Comprimento máximo não é superior 57 µm8
Ovos relativamente grandes. Comprimento mínimo igual ou superior a 61 µm9
8. Parasitos de *Cerdocyon thous* e *Leopardus pardalis*, ovos 42-55 x 25-42 *Molineus* sp. Figura 1I.
Parasitos de *Dasyfus novemcinctus*, ovos 50-57 x 27-32 *Hadrostrongylus speciosus*. Figura 1J.
9. Ovos com comprimento 80-91 x 43-54 *Haemonchus* sp. de *Mazama gouazoubira*. Figura 1K.
Ovos com comprimento 61-75 x 31-42 *Trichostrongylus colubriformis* de *Mazama gouazoubira*. Figura 1L.

Figura 2. Chave dicotômica de identificação elaborada para o diagnóstico das espécies encontradas no PNSC baseadas nas características morfológicas dos ovos.

4 DISCUSSÃO

No PNSC, mesma região deste estudo, Brandão et al. (2009) estudaram a fauna de helmintos em mamíferos silvestres e encontraram ovos nas fezes recentes de *Dasytus novemcinctus*, nomeado como "Aspidoderidae 1", com 55 (50-60) μm de comprimento e 38,7 (28-48) μm de largura, descrito pelos autores como tendo forma "elíptica, casca fina e irregular". Embora sejam ligeiramente menores, estas características são semelhantes à *Aspidodera binansata* encontrada em nosso estudo, isto é, 64,3 (57,5-70) μm de comprimento e 45,6 (42,5-50) μm de largura. No entanto, o morfotipo de ovos nomeado como "Aspidoderidae 2" com 41 (38-44) μm de comprimento e 24,6 (22-28) μm de largura mencionado no mesmo trabalho, não é compatível com qualquer medida de *Aspidodera* spp. encontrada em nosso estudo.

O diagnóstico de *H. speciosum* está de acordo com Hoppe e Nascimento (2007), espécie encontrada parasitando *D. novemcinctus* e tatu-peba *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758) no Mato Grosso do Sul (HOPPE et al., 2006). Há apenas duas espécies deste gênero, *H. speciosum* e *H. ransomi* (sin. *Delicata ransomi* (Travassos, 1935)). A última é uma espécie similar, mas pode ser facilmente diferenciada por possuir um raio dorsal simétrico, espículos de igual tamanho e estruturas secundárias na sínlofe (HOPPE et al., 2009). No trabalho de Brandão et al. (2009), ovos identificados como "Trichostrongyloidea 3" com 59,1 (48-64) μm de comprimento e 34,5 (32-36) de largura, morfologicamente descritos com "casca fina e dupla, extremidades arredondas e com uma das extremidades mais afilada que a outra" tem comprimento e largura compatível à *Hadrostrongylus* spp. (i.e., *H. speciosum* 54 (50-57,5) de comprimento e 31,1 (27,5-32,5) de largura e *H. ransomi* 63 de comprimento e 35-38 de largura). Por possuírem ovos morfometricamente similares, torna-se difícil um diagnóstico comparativo mais preciso.

Estudos paleoparasitológicos realizados na região, revelaram a presença de ovos de *Toxocara cati* e *Oncicola* sp. em coprólitos de felídeos em sítos arqueológicos próximos ao parque (SIANTO et al., 2014). Em nosso estudo, *T. canis* foi encontrado em *C. thous* (Canídeo) e *O. venezuelensis* encontrado em *L. pardalis* (Felídeo). A ocorrência de *Toxocara* e *Oncicola* spp. encontradas na fauna ancestral e agora na fauna atual na mesma região do parque sugere que estes gêneros possam estar mantendo seus ciclos de vida a um longo período no parque. O tamanho dos ovos de *T. cati* encontrado nos coprólitos e *T. canis* encontrados neste estudo são similares e se sobrepõem, 60-70 \times 60-65 μm vs 53-72,5 \times 37,5-61,9 μm , respectivamente. Segundo Sianto et al., (2014), *T. cati* pode ser diferenciado por possuir uma fenda grande e poligonal em sua superfície, mas esta característica não foi observada neste estudo. Tanto nos estudos morfológicos quanto nos dados genéticos, nós confirmamos a presença de *T. canis* parasitando *C. thous*.

Oncicola sp. encontrado em coprólitos por Sianto et al. (2014) parece não ser a espécie *O. venezuelensis* por possuir o tamanho dos ovos significativamente maior ao das espécies do nosso estudo (67,1 \times 47,6 μm vs 30-50 \times 22,5-25 μm). No entanto, o conjunto dos dados reforça a teoria de que dentro deste gênero possa existir espécies que estejam mantendo seus ciclos de vida até os momentos atuais. Além disso, os dados genéticos fornecidos por este estudo podem servir de base comparativa para espécies de *Oncicola* futuramente coletadas.

Nossos dados quando comparados com os ovos obtidos em fezes recentes corroboram com a presença de membros de Aspidoderidae e Trichostrongyloidea em mamíferos silvestres na região. Quando comparados com ovos obtidos em coprólitos encontramos evidências de que *Toxocara* e *Oncicola* spp. possam estar mantendo seus ciclos de vida há milênios no parque. Estes dados morfométricos e genéticos tornam-se importantes porque podem servir de base comparativa para os estudos com helmintos da fauna atual e ancestral do Parque.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- As espécies *A. raillieti* e *A. subulata* de *Didelphis albiventris*, *A. binansata*, *A. vazi* e *H. speciosum* de *Dasypus novemcinctus* são referidas em nova distribuição geográfica.
 - Este é o primeiro estudo ultraestrutural de *A. binansata* e *A. vazi*.
 - Esta é a primeira sequência de 16S rDNA para *A. vazi*
 - Os novos oligonucleotídeos iniciadores Asp 18SF, Asp_ITS_F, Asp_ITS_R, Asp_28SF, Asp_28SR foram desenhados para *A. raillieti*.
 - São apresentadas as primeiras sequências parciais de 18S rDNA e 28S rDNA de *A. raillieti*.
 - Foi feita a primeira análise filogenética com base no gene parcial 28S rDNA incluindo os Aspidoderidae
 - As espécies *Toxocara canis*, *Ancylostoma buckleyi*, *Oncicola canis*, *O. venezuelensis*, *Physaloptera* sp. e *Molineus* sp. são referidas em nova distribuição geográfica.
 - *Molineus* sp. é referida em novo hospedeiro, *Leopardus pardalis*.
 - A espécie *Oncicola venezuelensis* é descrita pela primeira vez no Brasil.
 - Novos dados ultraestruturais e genéticos, com sequências de ITS1, 5.8S e ITS2, e parcial do 28S rDNA são relatados para *O. venezuelensis*.
 - É apresentado um estudo filogenético das famílias de Acanthocephala.
 - A identificação dos ovos provenientes de fêmeas adultas de helmintos estudados, corrobora com os achados de ovos obtidos de fezes recentes confirmando a presença de Aspidoderidae e Trichostrongyloidea em mamíferos silvestres na região.
 - Adultos de *Toxocara canis* e *Oncicola venezuelensis* agora referidos e ovos de *Toxocara cati* e *Oncicola* sp. obtidos em coprólitos, indicam que espécies destes gêneros podem estar mantendo seus ciclos de vida há milênios no Parque.
 - A proposta de uma chave de identificação de helmintos baseada na morfometria e imagens dos ovos obtidos de fêmeas adultas, em conjunto com os dados genéticos, pode facilitar o diagnóstico dos ovos de helmintos de mamíferos silvestres do PNSC.
 - A fauna de helmintos de mamíferos silvestres encontrada neste estudo contém 14 espécies de parasitos estudados de cinco espécies de mamíferos. Destaca-se *Cerdocyon thous* (6 espécies de helmintos) por possuir a maior diversidade de parasitos dentre os hospedeiros estudados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. M. C. Avaliação físico-química e energética da madeira das espécies *Piptadenia stipulacea* (benth.) Ducke e *Amburana cearensis* (Allemao) AC Smith de ocorrência no semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Florestal**, 25.1: 165–173, 2015.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215 (3), 403–410, 1990.
- AMIN, O. M.; HECKMANN, R. A.; MOHAMMED, O.; EVANS, R. P. Morphological and molecular descriptions of *Moniliformis saudi* sp. n. (Acanthocephala: Moniliformidae) from the desert hedgehog, *Paraechinus aethiopicus* (Ehrenberg) in Saudi Arabia, with a key to species and notes on histopathology. **Folia Parasitologia**, 63, 014, 2016. doi: 10.14411/fp.2016.014.
- AMIN, O. M. Key to the families and subfamilies of Acanthocephala, with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida). **Journal of Parasitology**, 73, 1216–1219, 1987.
- ARAÚJO, A. J. G.; PESSIS, A. A.-M.; GUÉRIN, C.; DIAS, C. M. M.; ALVES, C.; La SALVIA, E. S. **Parque Nacional Serra da Capivara**. São Paulo, Tylaser Desenvolvimento Ed. Ltda., 94p, 1998.
- ARAÚJO, A.; FERREIRA, L. F. Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationships. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95, 89–93, 2000.
- BARGER, M. A New Species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from Turtles in Florida, U.S.A. **Comparative Parasitology**, 72, 6–9, 2005.
- BEISIEGEL, B. M.; LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; QUEIROLO, D.; JORGE, R. S. P. Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, 3(1), 138–145, 2013.
- BELTRAME, M. O.; de SOUZA, M. V.; ARAÚJO, A.; SARDELLA, N. H. Review of the rodent paleoparasitological knowledge from South America. **Quaternary International**, 352, 68–74, 2014.
- BIANCHI, R. D.; MENDES, S. L. Ocelot (*Leopardus pardalis*) predation on primates in Caratinga Biological Station, Southeast Brazil 421. **American Journal of Primatology**, 69: 1173–1178, 2007.
- BOLETTE, D. P. A new oligacanthorhynchid acanthocephalan described from the great horned owl, *Bubo virginianus* (Strigidae), and red-tailed hawk, *Buteo jamaicensis* (Accipitridae), from central Arizona, USA. **Journal of Parasitology**, 93, 120–128, 2007.
- BRANDÃO, M. L.; CHAME, M.; CORDEIRO, J. L. P.; CHAVES, S. D. M. Diversidade de helmintos intestinais em mamíferos silvestres e domésticos na Caatinga do Parque Nacional Serra da Capivara, Sudeste do Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 18(S1), 19–28, 2009.
- BLOUIN, M. S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. **International Journal of Parasitology**, 32 (5), 527–531.
- BLOUIN, M. S.; YOWELL, C. A.; COURTNEY, C. H.; DAME, J. B. Substitution Bias, Rapid Saturation, and the use of mtDNA for Nematode Systematics. **Molecular Biology and Evolution**, 15 (12):1719–1727, 1998.
- BREECE, G. A.; DUSI, J. L. Food habits and home range of the common long-nosed armadillo *Dasypus novemcinctus* in Alabama. Pp. 419-427. In: Montgomery, G.G. (ed.). *The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths, and Vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington & London. 451p, 1985.

- BROOKS, D. R.; HOBERG, E. P. Triage for the Biosphere: The Need and Rationale for Taxonomic Inventories and Phylogenetic Studies of Parasites. **Comparative Parasitology**, 67(1), 1–25, 2000.
- CHAGAS-MOUTINHO, V. A.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; CÁRDENAS, M. Q.; LANFREDI, R. M. Further description of *Aspidodera raillieti* (Nematoda: Aspidoderidae) from *Didelphis marsupialis* (Mammalia: Didelphidae) by light and scanning electron microscopy. **Parasitology Research**, 101(5), 1331–1336, 2007.
- CHAGAS-MOUTINHO, V. A.; SANT'ANNA, V.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; de SOUZA, W. New Aspidoderidae species parasite of *Didelphis aurita* (Mammalia: Didelphidae): A light and scanning electron microscopy approach. **Acta Tropica**, 130: 162–166, 2014.
- CHAME, M. 1988. **Estudo comparativo das fezes e coprólitos não humanos da região arqueológica de São Raimundo Nonato, Sudeste do Piauí** [Dissertação]. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1988.
- CHAME, M. 2007. **Reservatórios de água e implicações na distribuição de mamíferos cinegéticos no semi-árido: contribuições à conservação do Parque Nacional Serra da Capivara, Sudeste do Piauí, Brasil**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- CHEN, M. X.; ZHANG, L. Q.; WEN, C. G.; SUN, J.; GAO, Q. Phylogenetic relationship of species in the genus *Aspidogaster* (Aspidogastridae, Aspidogastrinae) in China as inferred from its rDNA sequences. **Acta Hydrobiologica Sinica**, 34 (2), 312–316, 2010.
- CHISHOLM, L. A.; MORGAN, J. A.; ADLARD, R. D.; WHITTINGTON, I. D. Phylogenetic analysis of the Monocotyliidae (Monogenea) inferred from 28S rDNA sequences. **International Journal of Parasitology**, 31, 1537–1547, 2001.
- COSTA, L.; ASTÚA de MORAES, D.; BRITO, D.; SORIANO, P.; LEW, D.; DELGADO, C. *Didelphis albiventris*. IUCN Red List of Threatened Species version 2011.1, 2008.
- COURTENAY, O.; MAFFEI, L. Crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766). pp. 32–38. In: Sillero-Zubiri, C.; Hoffmann, M. & Macdonald, D.W. (eds.). **Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan**. IUCN, 2004.
- CRUZ, M.A.O.M.; BORGES, D.M.; Langguth, A.N.S.; MARCOS, L.A.M.; SILVA, L.M.R.M.; LEITE, F.M.V.; PRADO, K.C.S.; VERISSIMO; B.L.C. MORAES. **Diversidade de mamíferos em áreas prioritárias para conservação da Caatinga**. In: (F.S. Araújo, M.J. Rodal e M.R.V. Barbosa, eds.), *Análise das variações da Biodiversidade do Bioma Caatinga: Suporte a estratégias regionais de conservação*. Brasília: MMA, pp. 183–203, 2005.
- CUÉLLAR, E. Biology and ecology of armadillos in the Bolivian Chaco. Pp. 306–312. In: Vizcaíno, S.F. & Loughry, W.J. (eds.). *The Biology of the Xenarthra*. University Press of Florida, Gainesville. 370p, 2008.
- D'AMELIO, S., GASSER, R., PALM, H., GEORGE-NASCIMENTO, M., ZHU, X. Q.; PAGGI, L. SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA, 615–623, 2002.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution** 17 (6), 368–376, 1981.
- FUGASSA, M. H. Checklist of helminths found in Patagonian wild mammals. **Zootaxa** 4012, 271–328, 2015.
- FUJITA, O.; ABE, N.; OKU, Y.; SANABRIA, L.; INCHAUSTTI, A.; KAMIYA, M. Nematodes of armadillos in Paraguay: a description of a new species *Aspidodera esperanzae* (Nematoda: Aspidoderidae). **The Journal of Parasitology** 936–941, 1995
- FULLER, C. A.; NICKOL, B. B. A Description of Mature *Oncicola venezuelensis* (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae) From a Feral House Cat in the US Virgin Islands. **Journal of Parasitology** 97, 1099–1100, 2011.

- FUMDHAM - FUNDAÇÃO MUSEU DO HOMEM AMERICANO, 2016. Disponível em: <<http://www.fumdham.org.br/#>>. Acesso em: 31, Maio, 2016.
- GARCÍA-VARELA, M.; de LEÓN, G. P. P.; AZNAR, F. J.; NADLER, S. A. Phylogenetic relationship among genera of Polymorphidae (Acanthocephala), inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 68 (2), 176–184, 2013.
- GARDNER, A. L. Mammals of South America v.1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats. The University of Chicago Press, Chicago, 690 pp, 2008.
- GEORGE, S., KALIAPPAN, S. P., KATTULA, D., ROY, S., GELDHOF, P., KANG, G., LEVECKE, B. Identification of Ancylostoma ceylanicum in children from a tribal community in Tamil Nadu, India using a semi-nested PCR-RFLP tool. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 109(4), 283-285, 2015.
- GOMES, A. P. N. 2013. Análise morfológica e ecológica de helmintos parasitos gastrointestinais de cachorro-mato (*Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766) do Pantanal do Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado pela Biodiversidade e Saude – FIOCRUZ. 2013
- GOMES, D. C.; CRUZ, R. P. D.; VICENTE, J. J.; PINTO, R. M. Nematode parasites of marsupials and small rodents from the Brazilian Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 20(4), 699-707, 2003.
- GOMES, S. N.; PESENTI, T. C.; MULLER, G. Parasitism of *Mathevotaenia* sp. (Cestoda: Anoplocephalidae) and *Centrorhynchus* sp. (Acanthocephala: Centrorhynchidae) in *Dasypus novemcinctus* (Mammalia: Xenarthra) in Brazil. **Neotropical Helminthology**, 6 (2): 287–290, 2012.
- GOMES, D. C.; VICENTE, J. J.. Helmintos parasitos de *Nectomys squamipes* (Brants) do Município de Sumidouro, RJ. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 79 (1), 67-73, 1984.
- GRIESE, J. 2007. **Helmintofauna de vertebrados atropelados em rodovias da região de Botucatu, São Paulo**. 2007.
- GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, C.; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; MONTES-BORREGO, M.; PALOMARES-RIUS, J. E.; CASTILLO, P. Molecular phylogeny of the nematode genus *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) with description of three new species. **Zoological Journal of the Linnean Society** 167, 473–500, 2013.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; de WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 270, 313–321, 2003.
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **PNAS**, 101, 14812–14817, 2004.
- HOPPE, E. G. L.; PEREIRA, L. M.; SOUTO, L. S. C.; TEBALDI, J. H.; NASCIMENTO, A. A. Nematódeos gastrintestinais de tatus-peba *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758) provenientes do Pantanal Sul-Matogrossense, sub-região de Aquidauana, com registro de novo hospedeiro para *Hadrostrongylus speciosum* (Hoppe and Nascimento, 2006). **Biologico** 68 (2): 29–321, 2006.
- HOPPE, E. G. L.; NASCIMENTO, A. A. Natural infection of gastrointestinal nematodes in long-nosed armadillos *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 from Pantanal wetlands, Aquidauana sub-region, Mato Grosso do Sul State, with the description of *Hadrostrongylus speciosum* n. gen. et n. sp. (Molineidae: Anoplostrongylinae). **Veterinary Parasitology** 144 (1–2): 87–92, 2007.

- JIMENEZ-RUIZ, F. A.; GARDNER, S. L.; NAVONE, G. T. Four Events of Host Switching in Aspidoderidae (Nematoda) Involve Convergent Lineages of Mammals. **Journal of Parasitology** 98 (6):1166–1175, 2012.
- JIMÉNEZ, F. A., PERALTA-RODRÍGUEZ, J. L., CASPETA-MANDUJANO, J., RAMÍREZ-DÍAZ, S. E.. *Macuahuitloides inexpectans* n. gen., n. sp. (Molineidae: Anoplostrongylineae) from *Mormoops megalophylla* (Chiroptera: Mormoopidae). **The Journal of parasitology** 100 (5): 646-650, 2014.
- LAFFERTY, K. D. Biodiversity loss decreases parasite diversity: theory and patterns. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 367 (1604), 2814–2827, 2012.
- LENT, H.; FREITAS, J. F. T. Pesquisas helminthológicas realizadas no Estado do Pará. IV. Trichostrongylideos de mamíferos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 33(3): 363–380, 1938.
- LUDLOW, M. E.; SUNQUIST, M. E. Ecology and behavior of ocelots in Venezuela. **National Geographic Research** 3: 447–461, 1987.
- MANGIA, R. H. R.; Lima, V. S.; CARREIRA, J. C. Trypanosoma cruzi: Correlations of Biological Aspects of the Life Cycle in Mice and Triatomines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94 (3), 397–402, 1999
- MARTEAU, M. *Oncicola venezuelensis* n. sp. (Archiacanthocephala: Oligacanthorhynchidae) parasite de l'ocelot (*Felis pardalis* L.). **Annales de Parasitologie** 52, 25–33, 1977.
- MORENO, R. S., KAYS, R.W.; SAMUDIO, Jr., R. Competitive release in diets of ocelot (*Leopardus pardalis*) and puma (*Puma concolor*) after jaguar (*Panthera onca*) decline. **Journal of Mammalogy** 87: 808–816, 2006.
- MURRAY, J. L.; GARDNER, G. L. *Leopardus pardalis*. **Mammalian Species** 548, 1–10, 1997.
- MULLER, G.; BRUM, J. G. W.; LANGONE, P. Q.; MICHELS, G. H.; SINKOC, A. L.; RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. *Didelphis albiventris* Lund, 1841, parasitado por *Ixodes loticatus* (Neumann, 1899), e *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) Acari: Ixodidae no Rio Grande do Sul. **Arquívus do Instituto de Biologia de São Paulo** 72 (3), 319-324, 2005.
- NADLER, S. A.; CARRENO, R. A.; MEJÍA-MADRID, H.; ULLBERG, J.; PAGAN, C.; HOUSTON, R.; HUGOT, J.-P. Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. **Parasitology** 134, 1421–1442, 2007.
- NADLER, S. A.; HUDSPETH, D. S. S. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematode: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. **Journal of Parasitology** 86, 380–93, 2000.
- NICKOL, B. B.; FULLER, C. A.; ROCK, P. Cystacanths of *Oncicola venezuelensis* (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae) in Caribbean termites and various paratenic hosts in the U.S. Virgin Islands. **Journal of Parasitology** 92, 539–542, 2006.
- NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. **Program distributed by the author**. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.
- OLIVEIRA, T. G. **Neotropical cats: ecology and conservation**. 220 pp, São Luís, Editora da Universidade Federal do Maranhão, EDUFMA, 1994.
- OLIVEIRA, J. A. **Diversidade de mamíferos e o estabelecimento de áreas prioritárias para a conservação do bioma Caatinga**. In: SILVA J. M. C. da.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (Orgs). Biodiversidade da Caatinga: Área e Ações Prioritárias para a Conservação. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, p. 263-282, 2004.
- OLIVEIRA, T. G.; ALMEIDA, L. B.; CAMPOS, C. B. Avaliação do risco de extinção da jaguatirica *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira** 3, 66–75, 2013.

- OLIVEIRA, J. A.; GONÇALVES, P. R.; BONVICINO, C. R. **Mamíferos da caatinga**. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. da (Org.) *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Recife: Ed Universitária da UFPE. p. 275–336, 2003.
- PEIXOTO, P. V. Raiva bovina e linhas de conduta. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 18(1), 1998.
- PINTO, R. M.; KNOFF, M.; GOMES, D. C.; NORONHA, D. Nematodes from mammals in Brazil: an updating. *Neotropical Helminthology*, 5 (2), 139-183, 2011.
- PINTO, R. M.; KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M.; Mello, D. A. Nematodes of rodents in Brazil, with description of *Aspidodera vicentei* n. sp. **Systematic Parasitology** 4 (3), 263-267, 1982.
- POULIN, R.; MORAND, S. The diversity of parasites. *Quarterly Review of Biology*, 277–293, 2000.
- POULIN, R.; MORAND, S. **Parasite Biodiversity**. Smithsonian Institution Books, Washington D.C., 2004 pp. 216, 2004. ISBN 1 58834 170 4.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** 25, 1253–1256, 2008.
- PROENÇA, M. C. Revisão do genero *Aspidodera* Railliet & Henry, 1912:(Nematoda: Subuluroidea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 32 (3), 427-438, 1937.
- PROSSER, S. W.; VELARDE-AGUILAR, M. G.; LEÓN-RÈGAGNON, V.; HEBERT, P. D. Advancing nematode barcoding: a primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. **Molecular Ecology Resources** 13 (6), 1108–1115, 2013.
- RODRIGUES, S. S.; BORGIO, P. F., TAVARES, L. E. R.; Souza, T. D. 2006 **Análise qualitativa e quantitativa de helmintos gastrintestinais de *Cercopithecus thomasi* Linnaeus, 1766 (Carnívora: Canidae) encontrados atropelados na rodovia ES 060, Vila Velha – Guarapari, Espírito Santo, Brasil**. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ribeirão Preto, Brasil, 3-6 setembro, p 297, 2006
- REDFORD, K. H. **The empty forest**. *Bioscience*, v. 42, p. 412–423, 1992.
- SIANTO, L. 2009. **Parasitismo em populações Pré-Colombianas: helmintos de animais em coprólitos de origem humana do Parque Nacional Serra da Capivara, PI, Brasil** [Tese de Doutorado]. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. 2009.
- SIANTO, L., de SOUZA, M. V., CHAME, M., da LUZ, M. D. F., GUIDON, N., PESSIS, A. M.; ARAÚJO, A. Helminths in feline coprolites up to 9000 years in the Brazilian Northeast. **Parasitology international** 63(6), 851–857, 2014.
- SANTOS, C. P.; LENT, H.; GOMES, D. C. The genus *Aspidodera* Railliet and Henry, 1912 (Nematoda: Heterakoidea): revision, new synonyms and key of species. **Revista Brasileira de Biologia** 50: 1017–1031, 1990.
- SIANTO, L.; de SOUZA, M. V.; CHAME, M.; da LUZ, M. D. F.; GUIDON, N.; PESSIS, A. M.; ARAÚJO, A. Helminths in feline coprolites up to 9000 years in the Brazilian Northeast. **Parasitology International** 63(6), 851-857, 2014.
- FARIA-CORRÊA, M. A.; Silva, K. F. M. Avaliação do Risco de Extinção de *Dasyurus novemcinctus* Linnaeus, 1758 no Brasil. Avaliação do Risco de Extinção dos Xenartros Brasileiros, p. 173, 2012.
- SCHALLIG, H. D. F. H.; SILVA, E. S.; Van Der MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J., GONTIJO, C. M. F. (2007). *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A Potential Reservoir Host for Zoonotic Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector Borne Zoonotic Disease** 7 (3), 387–393, 2007.
- SCHLÖTTERER, C.; HAUSER, M.T.; von HAESELER, A.; TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution** 11, 513–522, 1994.

- SCHOBHENHAUS, C., SILVA, C. R. O papel indutor do Serviço Geológico do Brasil na criação de Geoparques. CPRM–Serviço Geológico do Brasil, 2010.
- SOUZA, M. V. D.; SIANTO, L.; CHAME, M.; FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. *Syphacia* sp. (Nematoda: Oxyuridae) in coprolites of *Kerodon rupestris* Wied, 1820 (Rodentia: Caviidae) from 5,300 years BP in northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 107(4), 539–542, 2012.
- SUBBOTIN, S. A.; STANLEY, J. D.; PLOEG, A. T.; MAAFI, Z. T.; EMMANUEL, A. T.; CHITAMBAR, J. J.; PALOMARES-RIUS, J. E.; CASTILLO, P.; INSERRA, R. N. Characterization of populations of *Longidorus orientalis* Loof, 1982 (Nematoda: Dorylaimida) from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the USA and other countries and incongruence of phylogenies inferred from ITS1 rRNA and *coxI* genes. **Nematology** 17, 459–477, 2015.
- SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4.0 edn, Sinauer, Sunderland, MA, 2002.
- SUNQUIST, M. E. **Ocelot ecology and its effect on the small-felid guild in the lowland neotropics**. In: Macdonald, D.W. & Loveridge, A.J. (Eds.), *Biology and conservation of the wild felids*. Oxford University Press, Oxford, New York, pp. 559–580, 2010.
- SZABÓ, M. P. J.; MARTINS-OLEGÁRIO, M. M.; QUAGLIATTO-SANTOS, A. L. Tick fauna from two locations in the Brazilian Savannah. **Experimental and Applied Acarology**, 43, 73-84, 2007.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30 (12), 2725–2729, 2013.
- TAYLOR, R. C.; SHACLETTE, M. H. Naturally acquired histoplasmosis in the mammals of the Panama Canal Zone. **American Journal Tropical Medicine Hygiene** 11: 796-799, 1962.
- TRAVASSOS, L. Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira. VI. Revisão dos acantocéfalos brasileiros. Parte 1. Fam. Gigantorhynchidae Hamann, 1892. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 9: 5–62, 1917.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22(22), 4673-4680, 1994.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25(24), 4876–4882, 1997.
- UNESCO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA, 2016. Disponível em: <<http://www.unesco.org/new/pt/brasilia/>>. Acesso em: 6, Out, 2016.
- VICENTE, J. J. Revisão da subfamília Aspidoderidae Skrjabi & Shikhobalova, 1947 (Nematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 64, 131–161, 1966.
- VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R. M. Nematóides do Brasil. Parte V. Nematóides de mamíferos. **Revista Brasileira de Biologia** 14 (1), 452pp, 1997.
- VIEIRA, F. M.; LUQUE, J. L.; MUNIZ-PEREIRA, L. C. Checklist of helminth parasites in wild carnivore mammals from Brazil. **Zootaxa** 1721, 1–23, 2008.
- WILSON, D. E.; REEDER, D. A. M. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3rd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 743 pp, 2005.

ANEXOS