

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

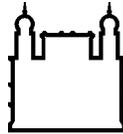
Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**TAXONOMIA MORFOLÓGICA E FILOGENIA MOLECULAR DE
PHYSALOPTERA (NEMATODA: SPIRURIDA)**

JULIANA SÃO LUIZ DE BARROS

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

JULIANA SÃO LUIZ DE BARROS

TAXONOMIA MORFOLÓGICA E FILOGENIA MOLECULAR DE *PHYSALOPTERA* (NEMATODA: SPIRURIDA)

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós- Graduação em Biodiversidade e Saúde (PGBS), do Departamento de Ensino do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Junior

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B277 Barros, Juliana São Luiz de

Taxonomia morfológica e filogenia molecular de *Physaloptera*
(Nematoda: spirurida) / Juliana São Luiz de Barros. – Rio de Janeiro,
2015.

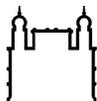
xii, 85 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biodiversidade e Saúde, 2015.

Bibliografia: f. 71-79

1. Nematoda. 2. *Physaloptera*. 3. Estômago. 4. Taxonomia
morfológica. 5. Filogenia molecular. I. Título.

CDD 592.57



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

JULIANA SÃO LUIZ DE BARROS

TAXONOMIA MORFOLÓGICA E FILOGENIA MOLECULAR DE *PHYSALOPTERA* (NEMATODA: SPIRURIDA)

Orientador (es): Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Junior

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luís Claudio Muniz Pereira (FIOCRUZ/ RJ) - Revisor/ Presidente

Prof. Dr. José Roberto Machado Silva (UERJ)

Prof. Dra. Débora Henrique da Silva Anjos (UFRJ)

Prof. Dra. Claudia Portes (FIOCRUZ/ RJ) - Suplente

Prof. Dra. Ester Maria Mota (FIOCRUZ/ RJ) - Suplente

Rio de Janeiro, 21 de Dezembro de 2015.

• A DEUS

Pela existência, ser essencial em minha vida como autor do meu destino e possibilidade de concretizar este trabalho

• Aos meus pais, Almiro e Jurema,

A minha eterna gratidão pelo incansável incentivo, apoio e amor.

• Ao meu esposo Eduardo Henrique

Agradeço pelo amor intenso e sereno que é compartilhado, e pela cumplicidade de todos os momentos vividos.

• Aos meus filhos, Maria Eduarda e João Henrique

Fontes de inspiração, força e fé da minha vida, amores incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Dr. Arnaldo Maldonado Junior** pela confiança, amizade, dedicação e paciência nos momentos de "Stress" durante a elaboração deste trabalho.

Ao **Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR)** por me dar todo apoio e logística para realização desta tese, e aos seus pesquisadores pelo acolhimento.

À **Dra. Raquel Oliveira Simões** por toda ajuda que me prestou no LABPMR durante o desenvolvimento deste trabalho, e acima de tudo por sua amizade que muito ajudou a superar as adversidades.

À **Dra. Rosana Gentile** pela revisão e ajuda na construção da minha tese.

À **Dra. Ester Maria Mota** pela sua amizade e logo prontamente aceitou ajudar na execução da metodologia histológica e redação.

Ao **Dr. Roberto Vilela** por ensinar e ajudar na metodologia molecular , análises filogenéticas e redação do primeiro manuscrito.

Ao meu irmão **Felipe São Luiz de Barros** pela amizade, carinho e lealdade durante todos os momentos.

Aos meus "**Best friends**" **Ana paula Nascimento Gomes, Tainá Carneiro de Castro Monte, Fernanda Leite Marinho e Thiago Cardoso**, pelo apoio, motivação e cumplicidade durante a execução deste trabalho.

Ao **Dr. Eduardo Torres** em colaborar com as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Serviço de Multimeios da FIOCRUZ Imagens, que colaborou com a criação de ilustrações feitas a nanquin pelo desenhista Marcelo.

À **Dra. Helene dos Santos Barbosa, Laboratório de Biologia estrutural e à técnica Sandra Maria de Oliveira Souza**, pelo ajuda na preparação e uso da plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth.

Ao **Dr. Francisco Tiago Melo** em auxiliar no uso do programa para montagem das inferências filogenéticas.

Ao **Departamento de Patologia - IOC/ FIOCRUZ**, pela utilização do seu laboratório para preparação das lâminas histológicas e utilização da sua plataforma para leitura das mesmas.

À **Plataforma Genômica - sequenciamento de DNA – PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A)**, a Dra. Aline dos Santos Moreira, Beatriz de Lima Alessio Müller e Renata Almeida de Sá.

Aos meus queridos amigos-irmãos de coração incansáveis e todas as horas **Márcia Cristina Brito e Luciana Motta** pela ajuda incansável em todas as horas incentivando e motivando.

Aos meus queridos amigos do LABPMR: **Camila Lúcio, Alexander Maia, Michele Maria, Sócrates Neto, Leila Monnerat, Joyce Souza, Bruna Marcenes, Jeiel Carvalhaes, Jonathan Gonçalves, Márcio Sales, Camila Bello Nemer, Luana Delfoente e Raquel Gonzales.**

Aos meus sogros, **Elizabeth e Eduardo**, que sempre me ajudaram a cuidar dos meus filhos com total dedicação, amor e carinho.

Agradeço à **Pós Graduação em Biodiversidade e Saúde (PGBS)**, pelo suporte e excelentes disciplinas que forneceu.

Entrega o teu caminho ao Senhor,
confia nele, e o mais Ele fará.
(Salmo 37: 5)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TAXONOMIA MORFOLÓGICA E FILOGENIA MOLECULAR DE *PHYSALOPTERA* (NEMATODA: SPIRURIDA)

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Juliana São Luiz de Barros

Os nematoídeos pertencentes ao gênero *Physaloptera* estão incluídos na ordem Spirurida e caracterizam-se por possuir a extremidade anterior com simetria bilateral. O gênero *Physaloptera* tem como espécie tipo *P. clausa* parasito de *Erinaceus europeus*. No Brasil, Vaz e Pereira (1935) encontrou *Physaloptera bispiculata* no estômago de um roedor selvagem *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (rato d'água) no estado de São Paulo, Brasil. Esta espécie foi posteriormente relatada parasitando *Sigmodon hispidus*, *Cynomys ludovicianus* e *Ondatra zibethicus*. As limitações das características morfológicas para identificação taxonômica, as dificuldades em analisar o ciclo de vida completo e seus hospedeiros alternativos, tem suscitado o uso de técnicas moleculares como instrumento de auxílio na taxonomia. Neste trabalho foi descrita uma nova espécie de *Physaloptera* coletada parasitando o estômago do roedor *Cerradomys subflavus* (Cricetidae: Sigmodontinae) coletado Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil (20°13'28.30"S; 46°30'39.20"O). A espécie foi caracterizada através das técnicas morfológicas (ML e MEV) e histológicas. Além disso, a filogenia foi estudada do gênero através de sequências moleculares do gene 18S rRNA e MT-COI 1 produzindo sequências para as espécies *P. bispiculata* parasita do roedor *Nectomys squamipes*, *P. turgida* 1 parasita do marsupial *Didelphis aurita*, *P. mirandai* 1 e 2 parasita do marsupial *Metachirus nudicaudatus*, *P. galvaoi* parasita do roedor *Cerradomys subflavus*, *P. retusa* parasita do réptil *Tupinambis teguixin*, *Protospirura numidica* 1 parasita do roedor *Oxymycterus dasythricthus*, *P. numidica* 2 parasita do roedor *Oxymycterus delator*, *Physocephalus lassancei* parasita do roedor *Thrichomys fosteri*, *Pterigodermatites jagerskioldi* parasito de *Thylamys macrurus* e *Gnatostoma turgidum* parasito de *Philander opossum*. Todos os nematoídeos utilizados foram coletados do estômago e identificados por ML. As análises morfológicas por ML e MEV revelaram a presença de dimorfismo sexual com as exemplares fêmeas maiores que os macho, extremidade cefálica com abertura bucal com dois grandes pseudolábios laterais, cada um com dente tripartite semicircular de pontas desiguais (dois arredondados e um pontiagudo) e um único grande dente triangular, um par pseudodentes na borda externa lateral de cada lábio e duas papilas em cada lábio. As análises filogenéticas dentro do gênero *Physaloptera* revelaram um monofiletismo sugerindo uma rápida e simultânea diversificação de espécies. As observações histológicas contribuíram também com novas informações da constituição celular/ tecidual e da biologia dos nematódeos. Sendo assim, a combinação dos métodos morfológicos, moleculares e histológicos apresentaram resultados satisfatórios para descrição de espécies, caracterização do gênero *Physaloptera*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MORPHOLOGY TAXONOMIA AND MOLECULAR PHYLOGENY OF *PHYSALOPTERA* (NEMATODA: SPIRURIDA)

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSITY AND HEALTH

Juliana São Luiz de Barros

Nematodes belonging to the genus *Physaloptera* are included in the order Spirurida, and are characterized by having anterior end provided with bilateral symmetry. The genus *Physaloptera* present as type species *P. clausa* parasite of *Erinaceus europeus*. In Brazil, Vaz and Pereira (1935) found *Physaloptera bispiculata* in the stomach of the rodent *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (water rat) in São Paulo, Brazil. Later, this species was reported parasitizing *Sigmodon hispidus*, *Cynomys ludovicianus* and *Ondatra zibethicus*. The limitations of the morphological features for taxonomic identification, the difficulties to study the complete life cycle and their alternatives hosts, has favored the use of molecular techniques as a tool for solving these questions. This present study describes a new species of *Physaloptera* of stomach from the rodent *Cerradomys subflavus* (Cricetidae: Sigmodontinae) collected from Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil (20°13'28.30"S; 46°30'39.20"O). The species was characterized by morphological techniques (ML and SEM) and histological. Furthermore, phylogeny of the genus was performed through molecular sequences of region 18S rRNA and MT-CO 1 producing sequences for the species *P. bispiculata* rodent parasite of *Nectomys squamipes*, *P. turgida* parasite of marsupial *Didelphis aurita*, *P. mirandai* 1 and 2 parasite of marsupial *Metachirus nudicaudatus*, *P. galvaoi* parasite of the rodent *Cerradomys subflavus*, *P. retusa* parasite of reptile *Tupinambis teguixin*, *Protospirura numidica* 1 parasite of rodent *Oxymycterus dasythricthus*, *P. numidica* 2 parasite of rodent *Oxymycterus delator*, *Physocephalus lassancei* parasite of rodent *Thrichomys fosteri*, *Pterigodermatites jagerskioldi* parasite of *Thylamys macrurus* and *Gnatostoma turgidum* parasite of *Philander opossum*. All nematodes used were collected from the stomach and identified by ML. Morphological analysis by ML and SEM revealed the presence of sexual dimorphism presenting females larger than the male cephalic end. Oral opening with two large lateral, semicircular pseudolabia, each bearing three internal lateral teeth, forming a tripartite structure and single large external lateral triangulate tooth. Phylogenetic analyzes within the *Physaloptera* genus revealed a monophyletism suggesting a rapid and simultaneous species diversification. The histological observations also contribute to new information of cell / tissue formation and biology of nematodes. So the combination of morphological, molecular and histological methods showed satisfactory results for describing species, characterization of the *Physaloptera* genus.

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais do Filo Nematoda.....	1
1.2. Morfologia dos nematoides.....	2
1.3. Taxonomia da ordem Spirurida Chitwood, 1933	7
1.3.1. Características morfológicas da ordem Spirurida	7
1.3.2. Ciclo evolutivo do gênero <i>Physaloptera</i>	9
1.4. Distribuição geográfica das espécies do gênero <i>Physaloptera</i>	11
1.5. Relações filogenéticas da ordem Spirurida baseado em marcadores moleculares.....	15
1.6. Taxonomia integrativa.....	16
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivos gerais.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Captura e necropsias dos hospedeiros	21
4.2. Coleta e fixação dos nematoides.....	24
4.3. Análise morfológica por microscopia de luz (ML)	26
4.4. Análise morfológica por microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	26
4.5.1. Análises Filogenéticas	32
4.6. Análise histológica.....	32

5. RESULTADOS	33
5.1. Descrição morfológica.....	33
5.2. Análises moleculares.....	48
5.3. Descrição histológica de <i>P. galvaoi</i>	56
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. APÊNDICES E/OU ANEXOS	80
9.1. Apêndice A - Lista de figuras	80
9.2. Apêndice B - Lista de tabelas.....	84
9.3. Apêndice C - Lista de siglas e abreviaturas.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do Filo Nematoda

Os nematoides são o grupo de metazoários mais abundante na biosfera, representando aproximadamente cerca de 80% de todos os metazoários, incluindo muitas formas parasitas de plantas e animais, inclusive do homem (Bongers & Bongers, 1988).

O Filo Nematoda é representado por organismos não segmentados, de corpo cilíndrico, alongado, cutícula resistente e estruturas bucais com arranjo trirradial, com aproximadamente 27.000 espécies. Destas, cerca de 10700 espécies são de vida livre (solo, água doce e mar) e aproximadamente 16300 espécies parasitas de invertebrados, vertebrados e plantas. Os nematoides possuem ampla distribuição podendo ser considerados um grupo taxonômico generalista quanto ao habitat (Hodda, 2004).

Apresentam corpo triploblástico com simetria bilateral, não-segmentados e blastocelomados; corpo com uma cutícula espessa e sem cílios, cilíndrico e afilado (secção transversal redonda/ forma tubular) formado por dois tubos, um dentro do outro, e o espaço entre eles está o pseudoceloma, onde se localizam os órgãos reprodutores e um líquido que preenchem a cavidade denominado líquido celomático. Tal líquido tem a função de favorecer a distribuição de nutrientes pelo intestino, atua na excreção e funciona como esqueleto hidrostático (Figura 2). A parede do corpo tem apenas músculos longitudinais (sem músculos circulares) que favorecem a flexão e sem estruturas especiais para circulação ou troca de gases. Possuem intestino completo; boca envolvida por lábios com órgãos sensoriais (frequentemente reduzidos a três lábios, ou a um simples anel) (Figura 1). As excretas são liberadas por canais longitudinais que formam um poro excretor único. Apresentam órgãos sensitivos cefálicos exclusivos chamados anfídios e órgãos sensoriais caudais chamados fasmídios. São organismos dióicos com fecundação interna, desenvolvimento indireto, na maioria. Machos frequentemente com um par de espículas copulatórias posteriores. O desenvolvimento dos jovens até forma adulta muitas vezes envolve mudas (Smyth, 1994).

1.2. Morfologia dos nematoides

Os nematoides são estruturalmente organismos simples, caracteristicamente pseudocelomados, cobertos por uma cutícula protéica. O mesênquima se reduz quase completamente, de modo que o espaço entre o intestino e a camada muscular subepitelial está ocupado pela cavidade primária limitada por uma membrana (blastoceloma). O desenvolvimento é direto, só nos parasitas aparecem larvas secundárias. Mostram uma forte tendência à constância no número de células nos diversos tecidos (eutelia), consequência que resulta na capacidade de regeneração limitada a partes de células ou zonas histológicas anucleadas, faltando completamente a reprodução assexuada. Sem sistema de vasos sanguíneos nem celoma.

O corpo segue o modelo arquitetônico saco músculo-cutâneo limitado pelo blastoceloma, que contém o aparato digestivo e o reprodutor. O tubo externo é a parede corporal e o tubo interno formado pelo tubo digestivo. A parede corporal e o tubo digestivo proveem vários caracteres úteis na identificação juntamente com o sistema nervoso, excretor e reprodutivo. O corpo fica coberto por uma cutícula resistente, delgada e quitinosa que frequentemente em forma de anéis. As expansões cuticulares (asas), podem se encontrar ao longo do corpo, na região cervical ou caudal do macho (em alguns se encontra uma expansão formada por três lóbulos, com função copuladora).

A cutícula é um produto elástico das células epidérmicas subjacentes, criando um suporte resistente, onde predominam proteínas similares ao colágeno. A camada externa contém queratinas, coberta por uma camada lipídica. A cutícula consta de três regiões: camada basal (estriada, laminada ou com fibras helicoidais), camada mediana (que varia entre uma estrutura granular uniforme até bastonetes, fibrilas ou canais, e às vezes ausente) e camada cuticular externa, cortical ou córtex (frequentemente anelada e dividida em partes externa e interna). A camada externa está limitada por uma epicutícula delgada, que pode apresentar uma cobertura de quinona. A cutícula da superfície corporal geralmente apresenta ornamentações.

Sob a cutícula existe uma hipoderme, geralmente celular, ainda que em parasitas as vezes é sincicial. Esta secreta a cutícula, mantém reservas de nutrientes, contém fibras de ancoragem que unem a musculatura à cutícula e em algumas espécies endoparasitas é uma importante superfície de absorção de nutrientes.

O sistema muscular está constituído por células mioepiteliais e fusiformes que formam uma camada muscular, que corresponde à musculatura somática geral, e músculos especializados. Muitos nematoides têm só entre dois e cinco músculos em cada campo (meromiaris), outros têm muitas células musculares em cada campo (polimiaris). As fibras podem ser compridas e planas, ou bem altas e estreitas, segundo a espécie. As células musculares dos nematoides são as únicas que têm extensões nervosas, cada fibra muscular possui um braço delgado que vai até o cordão nervoso longitudinal, dorsal ou ventral, onde se produz a inervação. Os músculos especializados são utilizados para o movimento de partes especiais do corpo, por exemplo, os músculos labiais para a captura do alimento, músculos faríngeos para engolir, músculos retais para a defecação e músculos copuladores, associados aos órgãos reprodutores, espículas ou vulva.

O blastoceloma ou pseudocèle é uma cavidade derivada do blastocèle, localizada entre as vísceras e a parede corporal, não está coberta por peritônio e possui líquido perivisceral em seu interior. A cavidade se estende desde a musculatura até o tubo digestivo, e rodeia os órgãos reprodutores. Sua alta pressão hidrostática (forte turgescência), juntamente com a cutícula, atua como antagonista elástico (hidroesqueleto) da camada longitudinal muscular, que se correlaciona funcionalmente com a ausência de músculos circulares. O líquido perivisceral contém metabólitos orgânicos, incluindo hemoglobina em algumas espécies. Nas paredes do blastoceloma existem células fagocitárias fixas, importantes na defesa interna.

O sistema de canais excretores, sem cílios, se encontra dentro de uma célula, a maior célula do corpo do animal, que geralmente tem forma de H. Os dois canais compridos se situam nos cordões epidérmicos laterais e se unem por um ou vários canais situados na barra transversal.

O sistema nervoso é intraepitelial, localizado na epiderme, a faringe e no aparelho digestivo posterior. Existe um ganglio anterior em forma de um anel nervoso circum-entérico, com gânglios dorsais, ventrais e laterais associados, que rodeia o intestino anterior e sobre o qual as células nervosas se distribuem geralmente em forma difusa, e vários cordões longitudinais.

Os órgãos sensoriais estão concentrados na região anterior. Os anfídios, variam desde um simples poro até uma complexa estrutura tortuosa e espiralada. Os órgãos sensoriais levam a um dendrito ciliado englobado em uma parte especializada da parede corporal. Nas papilas, cerdas e anfídios existe um deirídio com um cílio distal (Travassos, 1920).

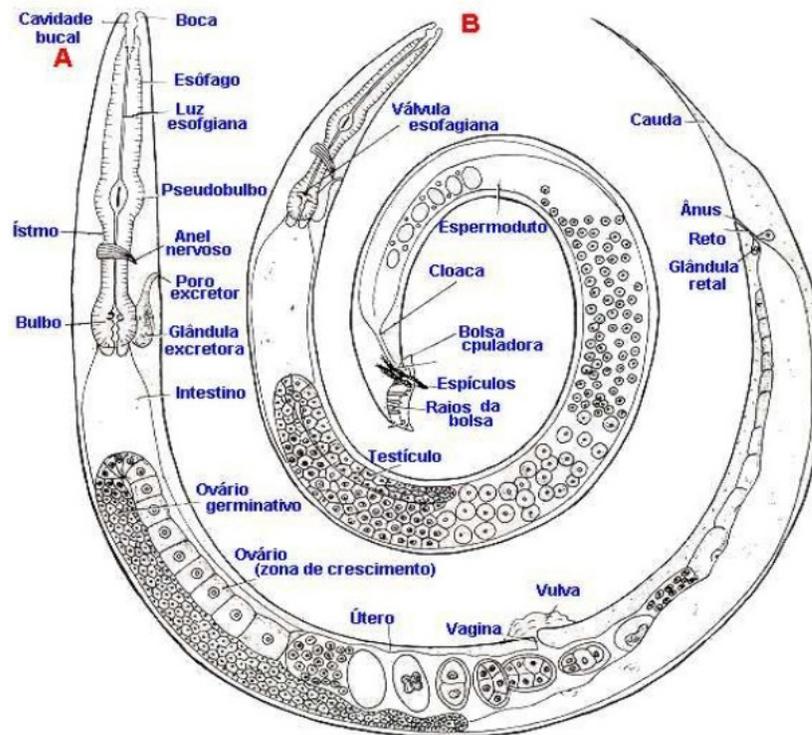


Figura 1. Morfologia geral externa e interna dos nematóides. A. Fêmea. B. Macho. (Fonte: Hirschmann, 1960).

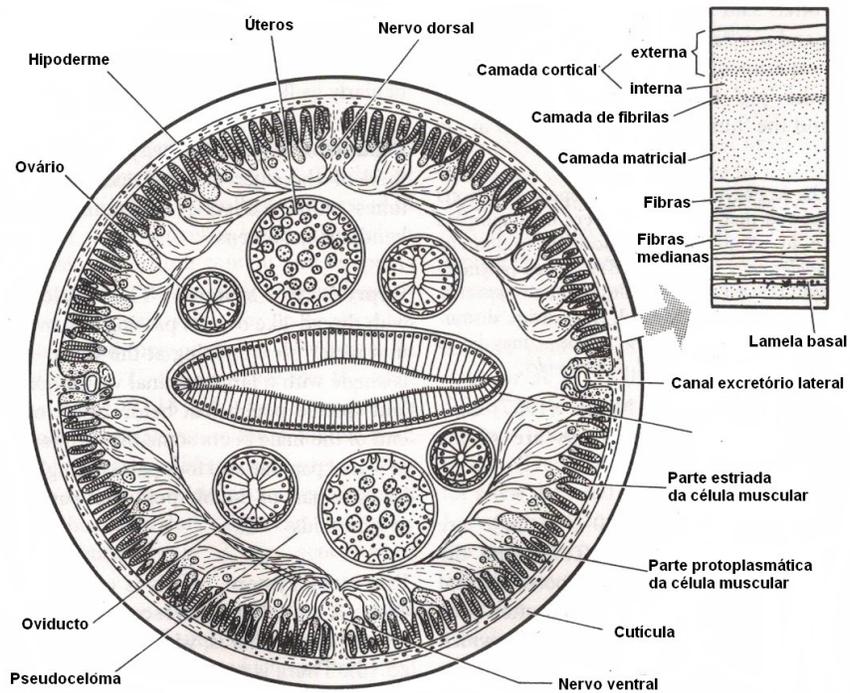


Figura 2. Secção transversal mostrando morfologia geral dos nematoideos: cavidade do corpo triblástico, pseudocelomático, protostomado com simetria bilateral. O esquema do lado superior direito representa um corte ampliado da cutícula. (Fonte: Smyth, 1994).

1.3. Taxonomia da ordem Spirurida Chitwood, 1933

O sistema de classificação dos nematoides foi baseado inicialmente em características morfológicas dos espécimes. Vários sistemas de classificação foram propostos para os nematoides. A classificação tradicional do Filo Nematoda (Rudolphi, 1808) proposta por Chitwood & Chitwood em 1950 divide os nematoides em duas classes: Adenophorea (= Aphasmdida) e Secernentea (= Phasmida). Chitwood (1933) estabeleceu a ordem Spirurida como parte da subclasse Secernentea. Esta ordem é composta por duas subordens, Camallanina e Spirurina. A primeira possui apenas duas superfamílias Camallanoidea e Dracunculoidea, enquanto a subordem Spirurina é formada por sete superfamílias: Acuarioidea, Aproctoidea, Habronematoidea, **Physalopteroidea**, Rictularioidea, Spiruroidea, Thelazioidea (Chabaud, 1975; Gibbons, 2010). Segundo Anderson et al., 2009, a ordem Spirurida é composta pelas seguintes Superfamílias: Acuarioidea, Aproctoidea, Habronematoidea, **Physalopteroidea**, Rictularioidea, Spiruroidea, Thelazioidea, Camallanoidea, Dracunculoidea e Diplotriaenoidea.

1.3.1. Características morfológicas da ordem Spirurida

Cavidade bucal pouco desenvolvida com boca e lábios pequenos. Boca com dois ou mais lábios ou sem lábios e pseudolábios presente ou ausente. Estes nematoides são relativamente longos e finos, com nítido dimorfismo sexual. Esôfago muscular-glandular com porção anterior curta e muscular e a posterior longa e glandular. Fêmeas com vulva em posição variável apresentando extremidade posterior em ponta romba sendo até quatro vezes maiores que os machos. Os machos possuem cauda (extremidade posterior) fortemente enrolada, com dois espículos diferentes em forma e tamanho, com asas caudas e papilas pedunculadas e sésseis, intestino simples e/ou atrofiado. Ciclo heteroxênico, sendo que mosquitos, pulgas e carrapatos desempenham o papel de hospedeiros intermediários.

Reino Animalia

Filo Nematoda

Classe Secernentea

Ordem Spirurida

Superfamília Physalopteroidea

Família Physalopteridae

Subfamília Physalopterinae

Gênero *Physaloptera*

Espécie *Physaloptera* spp.

Superfamília ► Physalopteroidea Sobolev, 1949

Boca com lábios triangulares com um ou mais dentes. Sua extremidade anterior com cutícula dobrando em forma de um colar, corpo com ou sem espinhos. Machos com asas caudais bem desenvolvidas e sustentadas por papilas pedunculadas desenvolvidas, papilas sésseis presentes. Nas fêmeas, a vulva localiza-se na porção mediana do corpo.

Família ► Physalopteridae Leiper, 1908

Boca com lábios triangulares, com um ou mais dentes; extremidade anterior sem ornamentações, porém em geral cutícula com dobra em forma de colar. Macho com asas caudais desenvolvidas e sustentadas por papilas pedunculadas desenvolvidas, papilas sésseis presentes. Fêmea com vulva na porção mediana do corpo.

Subfamília ► Physalopterinae Railliet, 1893

Cavidade bucal pequena e extremidade anterior com a cutícula voltada sobre os lábios formando um colar cefálico. Macho com as asas caudais unidas na superfície ventral.

Gênero ► *Physaloptera* Rudolphi, 1819

Dois grandes lábios laterais simples, triangulares e providos de número variado de dentes e externamente com papilas. Cutícula geralmente dobrada sobre os lábios formando um grande colarete cefálico. Papilas cervicais posteriores ao anel nervoso. Cavidade bucal curta ou ausente; esôfago formado de uma parte anterior muscular e uma posterior glandular. Macho com asas caudais largas, unindo ventralmente anterior ao ânus; três a sete pares de grandes papilas na região cloacal e um número variável de papilas ventrais sésseis, das quais algumas estão ao redor da abertura cloacal e as outras distribuídas aos pares na cauda. Espículos iguais ou desiguais. Fêmeas com abertura vulvar anterior ou posterior ao meio do corpo. Úteros em números de dois, quatro ou mais, ovíparas. Ovos ovais com casca espessa, embrionados quando da postura (Vicente *et al.*, 1997).

Espécie tipo ► *Physaloptera clausa* Rudolphi, 1819**1.3.2. Ciclo evolutivo do gênero *Physaloptera***

No ciclo evolutivo das espécies do gênero *Physaloptera*, os ovos larvados são eliminados com as fezes do hospedeiro definitivo e ingeridos pelos hospedeiros intermediários. No intestino ocorre a eclosão das larvas L1 que ao atravessar o intestino, encistam e em sua parede externa, mudam para larva L2 após 11 a 16 dias da infecção, e depois de 12 dias mudam para L3 infectante. Na fase adulta, machos e fêmeas são parasitos obrigatórios de vertebrados podendo infectar um ou mais hospedeiros intermediários (Stunkard, 1953). Tais formas adultas maduras evoluem no hospedeiro definitivo em 56 a 85 dias após terem ingerido o hospedeiro intermediário infectado. Os adultos são hematófagos e vivem aderidos à mucosa gástrica provocando erosões, levando a gastrite catarral ou hemorrágica e anemia (Urquhart *et al.*, 1998; Fortes, 2004). Dentre outros problemas observados nos hospedeiros vertebrados causados pelo parasitismo podem-se ter: infecção, inapetência, vômitos, anemia e emagrecimento.

A reprodução é sexuada e os machos são menores que as fêmeas. Durante a cópula, um ou mais espículos são movidos para fora da cloaca onde

os espermatozoides deslocam-se ao longo dos espículos, para serem inseridos na vulva das fêmeas (Schell, 1950).

Os hospedeiros intermediários são invertebrados como insetos, grilos, gafanhotos, baratas e besouros (Gray & Anderson, 1982). Cawthorn & Anderson (1976) testaram grilos selvagens no desenvolvimento do ciclo de *P. maxilaris*. Schell (1952) infectou experimentalmente *S. hispidus* e estabeleceu o ciclo de vida completo para os *P. hispida*.

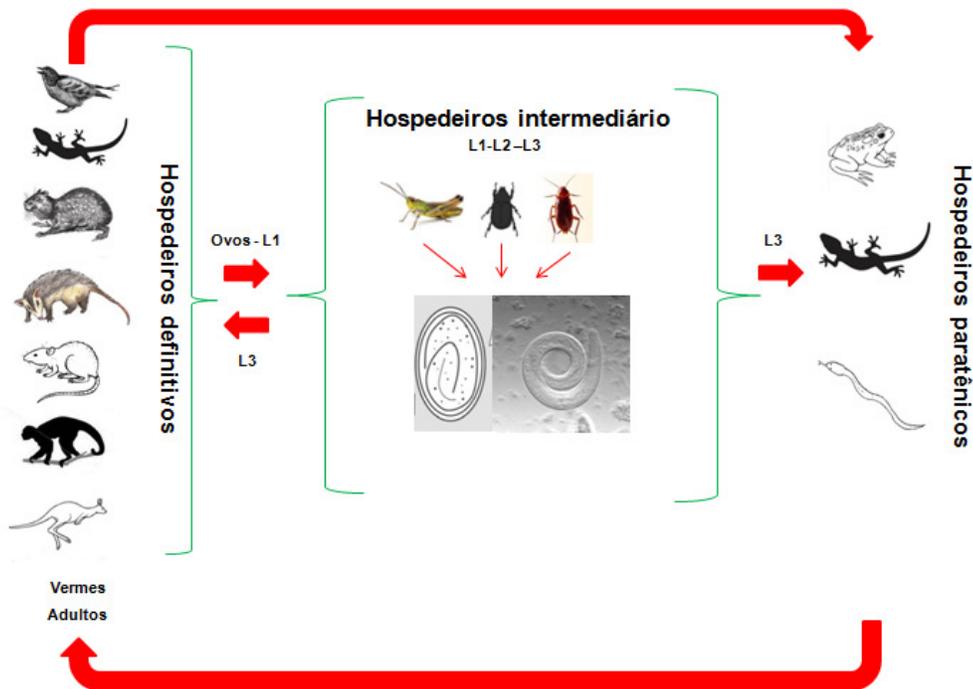


Figura 3. Ciclo biológico das espécies do gênero *Physaloptera* com alguns representantes de hospedeiros (Fonte: São Luiz, 2015)

1.4. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Physaloptera*

Physaloptera spp. são parasitos encontrados em várias espécies de animais domésticos (cão, gato, ovinos, bovinos, eqüino, suíno e aves), além de animais silvestres (gambá, raposa, guaxinin, felinos silvestres, Lhamas, ratitas, cobras e lagartos) e primatas.

Atualmente, são consideradas cerca de 100 espécies pertencentes ao gênero *Physaloptera*: sendo duas de anfíbios, nove de répteis, 24 de aves e 67 de mamíferos (Pereira *et al.*, 2012). Dentre essas espécies, oito são parasitos de roedores: *Physaloptera getula* foi descrita por Seurat (1917) parasitando o estômago de *Mus rattus* L. no Marroccos, África, embora ele não tenha publicado nenhum desenho de suas características morfológicas. Seurat (1937) identificou ainda *P. getula* em *Meriones shawi* Durvernoy, 1842 na África. No Brasil, Vaz e Pereira (1935) encontraram *Physaloptera bispiculata* no estômago de um roedor silvestre, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (rato d'água), no estado de São Paulo, Brasil. Esta espécie foi posteriormente relatada parasitando *Sigmodon hispidus*, *Cynomys ludovicianus* e *Ondatra zibethicus* (Morgan, 1941). Kinsella (1974) descreveu *Physaloptera hispida* compondo a helmintofauna do rato do algodão *Sigmodon hispidus* no sudeste dos Estados Unidos. Baylis (1945) no sul dos Estados Unidos, Harkema e Kartman (1948) na Geórgia e Carolina do Norte e Huggins (1951) no Texas já vinham explorando os helmintos deste hospedeiro. Quentin (1969) coletou um helminto do estômago de um roedor Echymyidae, *Thrichomys apereoides* (*Cercomys cunicularis*), no estado de Pernambuco - Brasil, e o nomeou como *Physaloptera longispicula* por apresentar como principal diferença morfológica em relação as demais espécies a presença de espículos extremante robustos.

Espécies não nomeadas do gênero *Physaloptera* foram relatadas em roedores da família Muridae no sudeste Asiático (Venciana *et al.*, 2013). Nesta mesma região, *Physaloptera funambuli* foi coletada de *Funambulus pennanti* (Rodentia:Sciuridae) e teve sua morfologia detalhada (Parihar & Nama, 1978); e *Physaloptera ngoci* foi descrita como a única espécie dos Physalopterídeos conhecida como parasita dos roedores murídeos (*Rattus novergicus*, *Mus* sp. e *Rattus* sp) no Vietnam.

Na América do Sul, *Physaloptera calnuensis* foi coletada do estômago de um roedor cricetídeo na Argentina e sua morfologia detalhada (Sutton 1989). Dentre os roedores das famílias Dasyproctidae (*Dasyprocta fuliginosa* e *D. leporina*) e Cuniculidae (*Agouti paca*) do estado do Amazonas, Gonçalves et al., 2006 redescrivem morfometricamente *Physaloptera torresi* entre os nematóides e cestódeos coletados.

Em primatas, foram encontrados ovos das espécies do gênero *Physaloptera* sp. em *Cercopithecus aethiops sabaesus* em Barbados, América do Norte (Mutani et al. 2003). Na África, Liang-Sheng (1957) descreve toda morfologia de machos e fêmeas de *Physaloptera lumsdeni* coletados de *Galago crassicaudatus agisymbanus*, popularmente conhecido como primata de arbusto. Primatas símios da África e América do Sul têm sido encontrados infectados por *Physaloptera tumefascianis* e *Physaloptera dilitata*. *Physaloptera caucasia* e *Physaloptera poikilometra* foram relatados nos primatas símios no sudeste da Europa, sudoeste da África e da Ásia. Não existem relatos de infecções em humanos com este parasito.

Em lagartos da América do Sul, foram descritas quatro espécies de *Physaloptera* (*Physaloptera liophis*, *Physaloptera obtusissima*, *Physaloptera lutzi* e *Physaloptera retusa*), todas baseadas na identificação morfológica da cauda e espículos dos machos. Vermes adultos machos e fêmeas de *Physaloptera lutzi*, foram encontrados em três necrópsias de lagartos do gênero *Liolaemus* do noroeste argentino, *L. quilmes*, *L. ornatus* e *L. alticor* (Ramallo & Díaz 1998). Outros países onde foram encontrados registros na classe dos répteis são: Bolívia, Argentina, Peru, Suriname, Paraguai, Uruguai, Guiana, Venezuela e Colômbia. No continente africano, Walton (1932) descreve *Physaloptera polydentata* encontrada em *Hemidactylus mabouia* lagartixa doméstica tropical. Hill (1941) encontrou *Physaloptera terrapenis* no estômago de tartarugas do estado Norte Americano.

Seis espécies de répteis brasileiros foram relatadas parasitadas por *P. lutzi* (Cristofaro, Guimarães e Rodrigues, 1976) e *P. retusa* (Rudolphi, 1819). Os estados brasileiros onde foram encontrados registros de *Physaloptera* spp. na classe dos répteis são: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato

Grosso, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo. Albuquerque et al (2012) encontraram pela primeira vez no estado do Acre lagartos das espécies *Anolis fuscoauratus* e *A. trachyderma* parasitados com *P. retusa* e *Arthrosaura reticulata* com *P. lutzi*. Pereira et al. (2012) descreveram uma nova espécie denominada *Physaloptera tupinambae* de lagartos *Tupinambis merianae* do sudeste do Brasil. E no estado de Minas Gerais, Juiz de fora, Pereira et al. (2014) coletaram do estômago de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae) *Physaloptera baina* que foi identificado e diferenciado pela combinação das seguintes características morfológicas: o número (23) e padrão de papilas caudais, tamanho dos espículos, posição vulvar (no primeiro terço do corpo), e devido os espécimes apresentarem particularmente grandes e robustas.

Dentro do grupo dos carnívoros, *Physaloptera praeputialis* e *Physaloptera rara* são de distribuição mundial, e ocorrem no estômago dos cães e gatos domésticos, e felinos selvagens. Na cidade de Goiânia, Campos et al. (1974) encontraram em 37 gatos necropsiados *P. praeputialis* dentre outros parasitos. No Rio de Janeiro Labarthe et al. (2004), durante o período de um ano, avaliaram os helmintos gastrointestinais dos gatos selvagens de rua e de abrigos onde encontraram *P. praeputialis*. Em 2012 Santos et al., verificando a helmintofauna de Canídeos silvestres do Parque Nacional da Serra do Cipó do Estado de Minas Gerais (Brasil), encontraram 6.7% da sua amostragem total parasitada por *Physaloptera* sp.. Em Santa Catarina, Quadros et al. (2014) encontraram e descreveram *Physaloptera praeputialis* pela primeira vez em *Puma yagouaroundi*. Soulsby (1982) descreve várias espécies de *Physaloptera* em diferentes hospedeiros canívoros e locais, tais como: *Physaloptera rara* nos EUA, *P. canis* na África do Sul e *P. pseudopraeputialis* nas Filipinas e EUA.

Em aves Norte Americanas, Morgan (1941, 1942) descreve *Physaloptera acuticauda*, *Physaloptera alata* e *Physaloptera mexicana*. Outras oito espécies foram relatadas em aves de outras partes do mundo: *Physaloptera brachycerca*, *Physaloptera croisi*, *Physaloptera galinieri*, *Physaloptera hieracidaeae*, *Physaloptera lossensi*, *Physaloptera rapacis*, *Physaloptera reevisi* e *P. subulata* (Morgan, 1943). Na China as aves da família Accipitridae são hospedeiras da espécie de *P. alata* (Li, 1934). Morgan (1948) coletou e

descreveu *P. buteonis* morfologicamente do ventrículo de um falcão vermelho oriental (*Buteo jamaicensis borealis*) da Colômbia.

A primeira descrição de *Physaloptera* em marsupiais australianos foi feita por Ortlepp (1922) de *Parameles nasuta*. Para identificação de *Physaloptera peramelis*, *Physaloptera peragale* e *Physaloptera thalacomys* foram considerados o carácter taxonômico das papilas caudais dos machos, assim como para *Physaloptera trougtoni* e *Physaloptera banfieldi* dos roedores nativos. Barton & McEwan (1993) relataram também *Physaloptera preaputialis* como parasito comum dos carnívoros domésticos e selvagens no norte do território australiano. Torres et al. (2009) identificando nematoides gastrointestinais coletados de *Gracilinanus agilis* na região do Pantanal descreveram pela primeira vez *Physaloptera herthameyerae*, uma espécie do gênero *Physaloptera* ainda não encontrada neste hospedeiro.

1.5. Relações filogenéticas da ordem Spirurida baseado em marcadores moleculares

Chitwood (1937) propôs uma filogenética bipartida e um sistema taxonômico com base na presença e ausência de fasmídeos. Este sistema foi melhor elaborado posteriormente por Maggenti (1963, 1983) com base na estrutura da faringe e sistema excretor. Contudo, devido à ausência de caracteres homólogos e de registros fósseis, e a uma grande evolução convergente, tem sido extremamente difícil obter-se uma análise estrutural compatível entre a filogenia e a taxonomia do filo Nematoda utilizando-se caracteres morfológicos e ecológicos em conjunto (Inglis, 1983; Blaxter et al., 1998).

No final da década de 1990, a primeira análise extensa da filogenia molecular destes parasitos foi publicada por Blaxter et al. (1998), colocando os nematóides spirurídeos em um ramo distinto designado como "clado III". Mais tarde, De Ley & Blaxter (2002; 2004) revisaram este sistema de classificação com base na interpretação das árvores filogenéticas de SSU (18S) rDNA utilizando as ordens tradicionais do clado III.

De acordo com De Ley e Blaxter (2004), Spirurina inclui 21 superfamílias, das quais nove são parasitas de peixes (Moravec, 2007). No entanto, a continuação dos estudos sugere que o arranjo dentro deste grupo será maior, à medida que aumentar o número de dados moleculares (Wijová et al. 2006, Nadler et al. 2007).

Os últimos estudos moleculares incluíram um grande número de espécies e revelaram numerosos grupos parafiléticos dentro da subordem Spirurina após a classificação proposta por De Ley e Blaxter (2004) e sua posição dentro "clado III" (Nadler et al. 2007). Este resultado não é surpreendente e, como Wijová et al. (2006) e Nadler et al. (2007) observaram, a solução de inter-relações filogenéticas neste grupo requer significativamente mais espécies examinadas, bem como o sequenciamento de genes adicionais para obter-se estatisticamente melhor suporte nas conclusões.

1.6. Taxonomia integrativa

Os nematoides são considerados um dos grupos de organismos mais difíceis de serem identificados, seja pelo tamanho diminuto ou pela dificuldade de observação de características chave para o diagnóstico em microscopia de luz convencional. As diferenças morfológicas e morfométricas são relativamente pequenas e exigem considerável conhecimento em taxonomia para uma segura determinação das espécies. Com isso, a integração entre dados morfológicos e informações moleculares criou o conceito de taxonomia integrativa.

A taxonomia integrativa é uma ferramenta que engloba marcadores moleculares, caracteres ecológicos e caracteres morfológicos, a fim de auxiliar na identificação da biodiversidade global (Seberg *et al.* 2003; Dayrat 2005). De acordo com Dayrat (2005) a taxonomia integrativa pode ser a melhor abordagem para o conhecimento da diversidade.

Taxonomia integrativa tem sido eficientemente introduzida para alguns grupos de vertebrados (Wiens & Penkrot, 2002; Malhotra & Thorpe, 2004) e invertebrados (Wahlberg *et al.*, 2005), entretanto ainda tem sido muito pouco utilizada para os nematóides (De Ley *et al.*, 2005; Bhadury *et al.* 2007).

Desta forma o método de Linnaeus, conhecido como nomenclatura binomial, consiste em ordenar as espécies em uma série ascendente de grupos, formando um sistema hierárquico de classificação. Embora esse método seja bastante eficiente para nomear e organizar taxa, ainda hoje pode ser difícil, em um sentido taxonômico, delimitar uma espécie, especialmente porque o conceito de espécie vem sofrendo grandes mudanças nos últimos 200 anos. Atualmente, é possível destacar quatro tipos principais de conceito de espécie: (1) conceito tipológico ou morfológico, (2) conceito biológico, (3) conceito evolutivo e (4) conceito filogenético. Apesar da ampla discussão a respeito da validade dos diferentes conceitos de espécie, dados genéticos recentes parecem favorecer o conceito filogenético de espécie. Este conceito filogenético de espécie baseia-se na monofilia, isto é, o menor conjunto de organismos que compartilham um ancestral comum e podem ser distinguidos

de outros grupos de organismos. Tal conceito vem conquistando cada vez mais espaço na comunidade científica, principalmente por ser menos restritivo que o conceito biológico de espécie e permitir o teste de hipóteses filogenéticas contribuindo, dessa forma, para estudos sobre a evolução de espécies (Cracraft, 1989; De Queiroz & Donoghue, 1989).

Contudo, a introdução da teoria evolutiva o papel da biologia tem sido investigar e buscar compreender as relações filogenéticas entre as espécies. Tal papel é de grande importância por que todas as diferenças existentes entre as espécies na morfologia, fisiologia, ecologia, comportamento e até na distribuição geográfica evoluem das próprias espécies no decurso de filogênese (Henning, 1966). Desta forma, após o advento da teoria evolutiva o papel da taxonomia animal foi modificado passando a organizar e ordenar o conhecimento taxonômico. Segundo os fundamentos da teoria evolutiva, as espécies se encontram em constante mudança e, por essa razão, a natureza estática do método classificatório tornou-se antiquada para a taxonomia de organismos vivos. Essa lacuna foi preenchida com o surgimento da sistemática filogenética (Bueno-Silva, 2012).

O entomologista alemão Willi Hennig em meados da década de 1960 propôs a sistemática filogenética. Nesse contexto ele define a sistemática filogenética como um método objetivo para a reconstrução da história evolutiva dos grupos (relação ancestral-descendente) através de uma análise diferenciada das características do grupo em estudo. Isto é, com o método sistemático uma espécie representa um conjunto de indivíduos que possuem uma descendência evolutiva comum. Essa visão de espécie tem fornecido subsídios para a realização de estudos em diversas áreas da biologia, tais como taxonomia, filogeografia e biogeografia. Assim como observado para a taxonomia, o uso de marcadores moleculares de DNA abriu caminho para outra importante linha de pesquisa em biologia: a sistemática molecular ou filogenia molecular. Assim aumentando o ganho de informações sobre as relações evolutivas de um determinado organismo que pode ser expressa através de uma árvore filogenética (Bueno-Silva, 2012).

O relacionamento filogenético de espécies é, essencialmente, inferido com base na comparação de caracteres morfológicos. No entanto, a crescente viabilidade de informações genéticas tem estimulado o uso de marcadores moleculares de DNA, em conjunto com dados morfológicos, para inferir o relacionamento filogenético de diversos táxons. Basicamente, reconstruções filogenéticas baseadas em dados moleculares são inferidas a partir da análise comparativa de sequências homólogas de DNA ou proteína (Lemey et al., 2009).

Em resumo, o uso de técnicas moleculares vem crescendo no mundo todo, especialmente nos últimos 20 anos, alcançando diversas áreas da biologia, como botânica, zoologia, ecologia, taxonomia, biologia da conservação, biotecnologia e sistemática filogenética. É inegável que a genética molecular tem contribuído imensamente para o desenvolvimento das ciências em diferentes áreas, porém o uso de técnicas moleculares não deve ser considerado a única fonte de evidência para estudos de taxonomia e sistemática filogenética. Alguns taxonomistas moleculares já admitem e defendem o uso integrado de morfologia e genética para caracterizar e delimitar espécies com maior precisão. Ou seja, as técnicas moleculares não devem ser consideradas de maneira isolada, mas como ferramenta de auxílio para uma segura e correta identificação da espécie, de acordo com o conceito proposto de taxonomia integrativa (Bueno-Silva, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A partir do contexto acima apresentado, nota-se a necessidade de se aprofundar na taxonomia dentro do gênero *Physaloptera*, haja vista que os caracteres morfológicos empregados para o diagnóstico das espécies baseiam-se apenas em discretas diferenças morfométricas e morfológicas, dentre as quais muitas vezes se sobrepõem. A utilização da microscopia de luz (ML) empregada para a descrição das espécies, tem recentemente recebido subsídios a partir da utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), entretanto ainda são poucas as espécies estudadas através dessa técnica.

Nesse sentido, o uso de abordagens moleculares direcionadas vem buscando auxiliar o entendimento das famílias da ordem Spirurida (De Ley *et al.* 2005; Meldal *et al.* 2007). A utilização de métodos moleculares, particularmente o sequenciamento de segmentos de DNA ribossomal e mitocondrial, tem permitido a inferência filogenética para a família *Physalopteridae* e revelado inconsistência quando da utilização do grupo de hospedeiro e a distribuição geográfica dos parasitos como parâmetros auxiliares para a classificação das espécies. Entretanto, o pequeno número de espécies com sequência disponível nos bancos de sequências tem tornado os estudos inconclusivos.

Além dessas contribuições, visando agregar informações, foram realizadas análises histológicas para auxiliar na identificação de importantes estruturas de caracteres taxonômicos. Uma vez que, existe um enorme lacuna de informações histológicas dos nematodeos spirurideos, Além de ampliar o conhecimento da composição celular/ tecidual desse grupo produzindo mais uma ferramenta de esclarecimento sobre o grupo.

Em virtude da complexidade das questões levantadas, foram propostas abordagens variadas, compreendendo estudos taxonômicos morfológicos e moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Estudar a diversidade taxonômica do gênero *Physaloptera* através da taxonomia integrativa, baseado em características morfológicas, moleculares e histológicas.

3.2. Objetivos Específicos

- Descrever uma nova espécie do gênero *Physaloptera* através de características morfológicas e moleculares.
- Comparar e descrever aspectos histológicos da nova espécie identificada, visando auxiliar na identificação das estruturas através do conhecimento da composição celular/ tecidual e parte da sua fisiologia, produzindo mais uma ferramenta para esclarecimento taxonômico.
- Comparar morfológicamente espécies do gênero *Physaloptera* em diferentes hospedeiros através de literatura específica e/ou espécimes depositadas na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC)
- Produzir sequências de espécimes da ordem Spirurida representantes da superfamília Physalopteroidea, Spiruroidea, Rictularoidea e Gnathostomatoidea utilizando 18S rRNA e COI como marcadores moleculares e depositar as novas sequências no GenBank.
- Analisar filogeneticamente de espécies do gênero *Physaloptera*

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os helmintos utilizados neste trabalho foram coletados em excursões durante o período de Maio/2010 à Março/2015 nos estados do brasileiros (Acre, Mato Grosso do Sul, Bahia, Santa Catarina, Minas Gerais e rio de Janeiro), fazendo parte do acervo do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatório.

4.1. Captura e necropsias dos hospedeiros

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética de uso de animais da Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ (CEUA L-0015/07). Os animais foram coletados conforme o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade-SISBIO/MMA (Ministério do Meio Ambiente) - Licença número 13373-1.

Nas áreas escolhidas, foram estabelecidos transectos lineares com 20 estações de captura em cada. Todos os transectos foram geo-referenciados utilizando-se um GPS. Nestas estações, foram dispostas armadilhas do tipo live-trap, modelos Tomahawk (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm) e do tipo Sherman (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm), apropriadas para a captura de pequenos mamíferos vivos com até 3Kg. Cada coleta teve duração de cinco dias. Em cada armadilha foi colocado uma isca composta de uma mistura de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim.

Os transectos eram percorridos diariamente pela manhã para checagem das armadilhas quanto à presença de animais. As armadilhas contendo os animais foram transportadas, imediatamente após sua remoção dos transectos, para uma base laboratorial de campo, aonde os animais foram necropsiados utilizando uma câmara de CO₂. As amostras foram coletadas segundo normas estritas de biossegurança, com toda a equipe paramentada com equipamentos individuais de proteção de nível 3 (filtros motorizados, máscaras com pressão positiva, e demais acessórios), e segundo normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde (FNS, 1998; Lemos & D'Andrea, 2006) que garantem a segurança dos membros da equipe de campo contra zoonoses de transmissão por aerossóis.

Hospedeiros estudados:

Mammalia: Rodentia

Familia Cricetidae ► *Nectomys squamipes*, *Oxymycterus dasythrichus*,
Oxymycterus delator e *Cerradomys subflavus*

Familia Echimididae ► *Thrichomys fosteri*

Mammalia: Didelphimorphia

Familia Didelphidae ► *Philander frenatus*, *Metachirus nudicaudatus*, *Thylamys macrurus*, *Didelphis aurita*

Reptilia: Squamata

Familia Teiidae ► *Tupinambis teguixin*

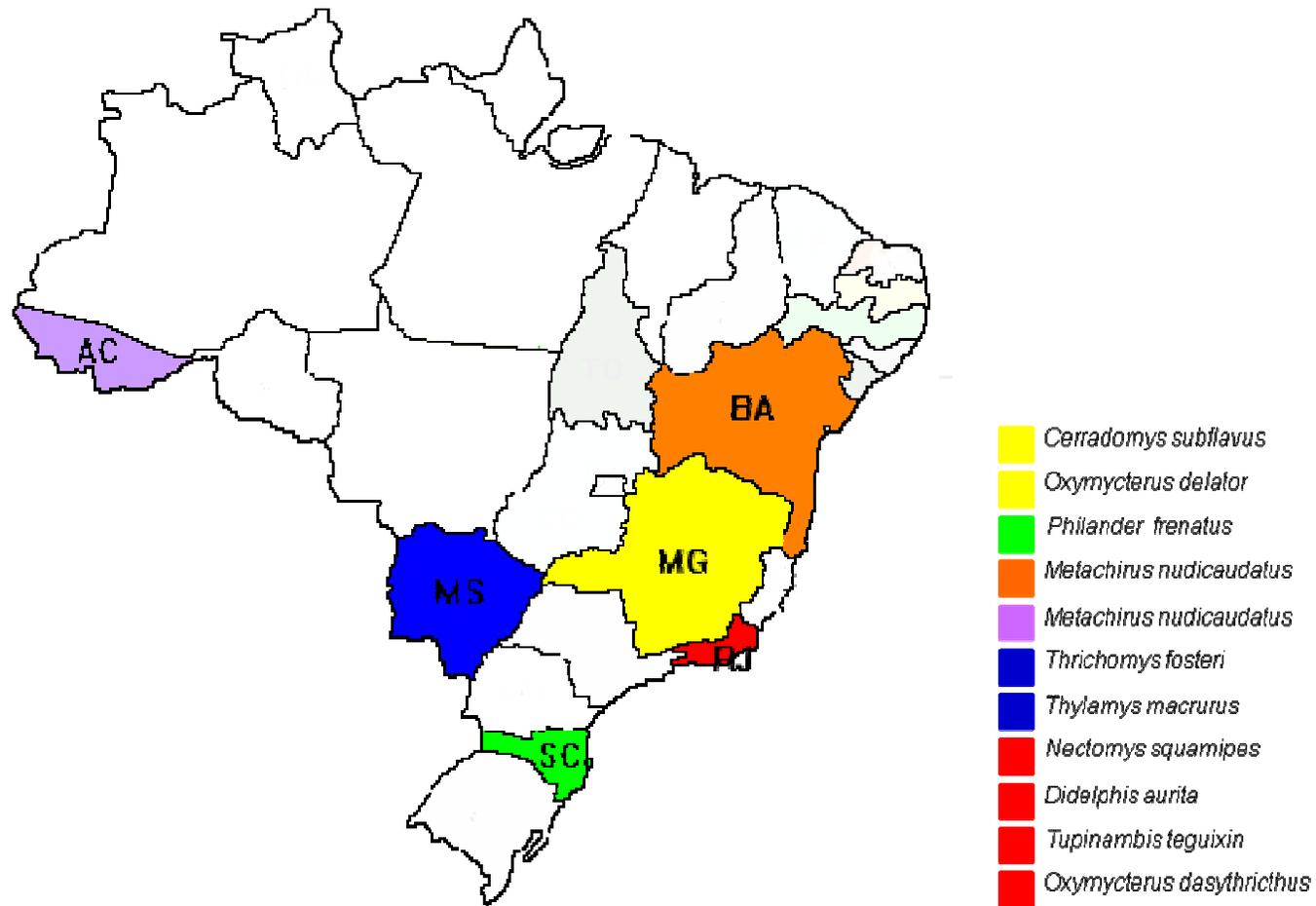


Figura 4. Regiões biogeográficas de captura dos hospedeiros.

4.2. Coleta e fixação dos nematoides

Os hospedeiros tiveram o estômago como sítio de infecção analisado. Os nematoides foram coletados, colocados em placas de Petri, lavados em solução salina (NaCl a 0,85%) com auxílio de microscópio estereoscópico. Todos os nematoides encontrados foram contados, fixados (conforme Tabela 1) e acondicionados em frascos devidamente identificados (número LBCE, data, órgão e fixador) e transportados ao LABPMR .



Figura 5. A. Helminths coletados em solução salina. B. Frascos com fixadores e rótulo de identificação.

Tabela 1. Fixadores, composição química e tipos de análises.

Tipos de fixadores	Composição	Tipo de análise
Álcool 70%	etanol 95-100% , água destilada	Análise morfológica (ML) Análise molecular
AFA	etanol 95-100%, formaldeído 0,4%, ácido acético glacial 100%	Análise morfológica (MEV)
Nitrogênio líquido (N₂)	azoto líquido (concentração > 99,998%)	Análise molecular
Milloning 10% (pH 7,4)	formaldeído 0,4%, água destilada, fosfato de sódio monobásico, hidróxido de sódio	Análise histológica

4.3. Análise morfológica por microscopia de luz (ML)

Os espécimes de helmintos foram analisados utilizando microscópio modelo Olympus BX-51. Para ML, os exemplares foram clarificados em fenol 80% e montados entre lâminas e lamínulas temporárias e desenhados com auxílio de uma câmara clara acoplada ao microscópio. Imagens foram capturadas com auxílio de uma câmera digital Olympus DP-12 acoplada ao microscópio. Todos dados morfométricos foram apresentados em milímetros expressados com valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão. A identificação das espécies seguiu de acordo com Travassos *et al.* (1937), Yamaguti (1961), Vicente *et al.* (1997) e Anderson *et al.* (2009).

As espécies representativas foram depositadas na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz - CHIOC.

4.4. Análise morfológica por microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Para MEV, os nematoides fixados em AFA foram lavados em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2), pós-fixados por 2h em OsO₄ a 1% e 0,8% K₃Fe (CN)₆, desidratado em série alcoólica (30-100%) por 2h cada banho, seco em ponto crítico usando CO₂ e metalizados com uma camada de ouro de 20nm segundo Mafra & Lanfredi, (1998). Depois da preparação, as bases foram mantidas em uma caixa com gel de sílica para mantê-los secos. Os espécimes foram analisados em microscópio eletrônico de varredura em 15kV modelo JEOL JSM-6390 segundo Mafra & Lanfredi, (1998).

4.5. Análises moleculares: extração, PCR, purificação e sequenciamento

Os helmintos fixados em etanol 70% foram lavados em água bidestilada por 12 horas. Os espécimes em nitrogênio líquido foram lavados por apenas três horas. Após a lavagem dos exemplares, foram realizadas as extrações dos DNA (ADN) utilizando o Kit QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN Biotecnologia) em que os espécimes eram maceradas com auxílio de um pistilo e em seguida digeridos com proteinase K (600mAU/ml) em tampão ATL e incubado por 3

horas a 56°C. Em seguida incubado novamente com tampão AL a 70°C por 10 minutos e seguido pela precipitação por etanol (96-100%). As amostras de DNA foram obtidas através das eluições em uma coluna Qiamp Mini spin e estocado a 4°C até sua utilização.

O DNA estocado foi quantificado pelo nanodrop em 230 nm (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 Uniscience) obtendo os valores da quantificação em nano gramas por microlitros (ng/μl).

A primeira amplificação do DNA foi feita através de reação em cadeia da polimerase (PCR) de uma região parcial do gene 18S rRNA utilizando um primers construídos que anelam a região conservada em ambas partes finais do gene: PHYSA_F 5'GCGAACGGCTCATTATAA3' e PHYSA_R 5'AATTTACCTCTCAGCA3' (Gomes et al. 2015) . Para esta reação de PCR, foi usado um período inicial de desnaturação por 3 minutos a 95 °C, pareamento 57°C por 3 minutos e extensão 72 °C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto com a mesma temperatura de desnaturação, pareamento e extensão. O produto de PCR foi avaliado pelo método de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com azul de bromofenol diluído na amostra e visualizado no trasiluminador sob luz ultravioleta (Tabelas 2 e 3).

As amplificações do gene parcial mitocondrial (COI) foram com citocromo C oxidase subunidade 1 através de um coquetel de primers de acordo com Prosser et al. (2013). Estas amplificações foram feitas de acordo com o seguinte protocolo de ciclagem: um volume final das reações de 50 μL, contendo: 1 pmol/μL de cada oligonucleotídeo iniciador, 5 μL de tampão de reação a 10 X (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂, 2mM de dNTPs, 1,5U de Taq DNA polimerase e 20-30 ng de DNA. As amostras foram colocadas em termociclador (Mastercycler – Eppendorf Termociclador) e submetidas às seguintes condições de amplificação: pré-aquecimento a 94°C por 1 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação 94°C por 40 segundos, 45°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto. Seguidos de 35 ciclos de pareamento com 94°C por 40 segundos, 51 °C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto. E por último, extensão final a 72°C por 5 minutos (Tabelas 4 e 5).

A purificação do produto da reação de PCR foi realizada através do Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN Biotecnologia), usando o protocolo do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) pela Plataforma de Sequenciamento (PDTIS/FIOCRUZ).

Todas as sequências obtidas foram depositadas na banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit/>) com seus respectivos números de acesso indicados na Tabela 10, incluindo da nova espécie.

Tabela 2: Lista de iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento genes rRNA 18S para todos táxons, discriminando a sequência dos iniciadores senso (F de *foward*) e anti senso (R de *reverse*).

Iniciador	Sequência (5'-3')	Referência
Physa_F	GCGAACGGCTCATTATAACA	Gomes <i>et al.</i> , 2015
Physa_R	AATTTACCTCTCACGCA	Gomes <i>et al.</i> , 2015

Tabela 3: Ciclagem utilizada para as reações de sequenciamento do gene rRNA 18S para todos táxons.

Desnaturação inicial	Amplificação (39 ciclos)			Extensão final
	Desnaturação	Pareamento	Extensão	
95°C 1min.	95°C 2 min.	57°C 30 seg.	72°C 1 min.	72°C 7 min.

Tabela 4. Lista do coquetel de iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *citocromo C oxidase* para todos táxons, discriminando a sequência dos iniciadores senso (F de *foward*) e anti senso (R de *reverse*).

Iniciador	Sequência (5'-3')	Referência
NemF1	TGTAAAACGACGGCCAGTCRACWGTWAATCAYAARAATATTGG	Prosser <i>et al.</i> (2013)
NemF2	TGTAAAACGACGGCCAGTARAGATCTAATCATAAAGATATYGG	Prosser <i>et al.</i> (2013)
NemF3	TGTAAAACGACGGCCAGTARAGTTCTAATCATAARGATATTGG	Prosser <i>et al.</i> (2013)
NemR1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCWGGRTGACCAAAAAATCA	Prosser <i>et al.</i> (2013)
NemR2	CAGGAAACAGCTATGACTAWACYTCWGGRTGMCCAAAAAYCA	Prosser <i>et al.</i> (2013)
NemR3	CAGGAAACAGCTATGACTAACCTCWGGATGACCAAAAAATCA	Prosser <i>et al.</i> (2013)

Tabela 5. Ciclagem utilizada para as reações de sequenciamento do gene citocromo C oxidase para todos táxons.

Desnaturação inicial	Amplificação (35 ciclos)			Extensão final
	Desnaturação	Pareamento	Extensão	
94°C 1min.	94°C 40 seg. 45°C 40 seg. 72°C 1 min.	94°C 40 seg. 51°C 40 seg. 72°C 1 min.	72°C 5 min.	72°C 5 min.

4.5.1. Análises Filogenéticas

O edição e alinhamento das sequências foram feitos através da análise de Clustal W no programa MEGA versão 5 (Thompson *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 2011). Para realização das inferências Bayesianas foi usado MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). As sequências alinhadas foram submetidas à análise Verossimilhança também utilizando-se o programa MEGA versão 5 (Ronquist *et al.*, 2012).

4.6. Análise histológica

Os nematoides fixados em formalina Millonig de Carson 10% foram lavados em água no interior de cassete plástico, e desidratados sucessivamente por 45 minutos em etanol 70%, 95%, 100% duas vezes cada (desidratação), seguido por incubação durante 45 minutos com Xilol duas vezes cada (diafanização) e incluídos em parafina líquida (60°C) segundo a metodologia descrita por Tolosa et al (2003). Posteriormente, os blocos foram submetidos a cortes seriados de 5µm de espessura em micrótomo Leica RM2125 e montados entre lâmina e lamínula.

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para posterior análise histológica, e os procedimentos para as colorações utilizados de acordo com Tolosa et al. (2003). Os cortes histológicos foram visualizados através do microscópio de luz Observer Z1 Zeiss® e as imagens captadas por meio da câmera Axio Cam HRc Zeiss e processadas com o programa Axio Vision Rel.4. Toda rotina histológica foi realizada no Laboratório de Patologia-IOC/FIOCRUZ.

5. RESULTADOS

O táxon descrito neste trabalho inclui uma nova espécie de *Physaloptera* coletada parasitando o estômago do roedor *C. subflavus* (Cricetidae: Sigmodontinae) capturado no bioma Cerrado (Serra da Canastra). Esta nova espécie (*P. galvai*) foi descrita através das técnicas morfológicas (ML e MEV), molecular e histológica. Adicionalmente foi estudada a filogenia de algumas espécies representantes da família Physalopteridae, Spiruridae, Gnathostomatidae, Rictulariidae e Spirocercidae através de sequências moleculares da região 18S do RNA ribossomal e citocromo C oxidase subunidade 1 mitocondrial, produzindo-se sequências para as espécies: *P. bispiculata*, parasita do roedor *Nectomys squamipes*; *P. turgida*, parasita do marsupial *Didelphis aurita*; *P. mirandai* 1 e 2, parasito do marsupial *Metachirus nudicaudatus*; *P. retusa*, parasito do réptil *Tupinambis teguixin*; *Protospirura numidica* 1, parasita do roedor *Oxymycterus dasythricthus*; *P. numidica* 2, parasita do roedor *Oxymycterus delator*; *Physocephalus lassancei*, parasita do roedor *Thrichomys fosteri*; *Pterigodermatites jagerskioldi*, parasito de *Thylamys macrurus*; e *Gnatostoma turgidum*, parasito de *Philander opossum*.

5.1. Descrição morfológica

5.1.1. Physalopteridae Leiper, 1908

Physaloptera Rudolphi, 1819

Physaloptera galvai

Figuras (6-27)

Descrição geral ► corpo robusto, alongado com finas estriações cuticulares que afinam gradualmente na extremidade anterior. Fêmeas são mais robustas do que os machos. A cutícula cervical se estende às margens posteriores dos lábios e formam um colar em torno deles (Figuras 8 e 18). A abertura bucal apresenta dois grandes pseudolábios laterais, cada um com dente tripartite semicircular na margem interna e um único grande dente triangular na dobra externa (Figuras 19, 20 e 21). O dente tripartite é composto de três pontas

desiguais com dois arredondados e um pontiagudo (Figura 21). O único dente externo é grande e com formato triangular (Figura 21). Presença de um par de pseudodentes laterais na borda externa lateral de cada lábio, totalizando quatro pares de pseudodentes. Três poros ficam situados internamente na base do dente tripartite (Figuras 18 e 21). Ainda na região anterior pode ser observada em cada lábio duas papilas situadas em uma cavidade e um anfídio central (Figuras 18, 19, 20 e 21). Ornamentando cada um destes lábios, existem três áreas porosas cuticulares diferindo da cutícula adjacente (Figura 18 e 19). A cutícula que cobre o corpo tem estrias transversais profundas de larguras variáveis, e umas mais finas podem ser vistas entre essas. (Figura 23). Esôfago longo dividido em duas partes: muscular, que fica na porção anterior, e glandular, na parte posterior (Figuras 7 e 12). Apresenta anel nervoso circular a porção final do esôfago muscular (Figura 7).

Machos► (holótipo e 6 parátipos): 12,4 [23/10 (15,5)] de comprimento e 0,64 [0,8-0,9 (0,8)] de largura no meio-corpo. Comprimento do esôfago muscular 0,5 [0,46-0,58 (0,5)] e do esôfago glandular 2,62 [3,0-3,74 (3,4)] (Figura 12). Deirídios opostos e ligeiramente assimétricos (Figura 29). Anel nervoso e poro excretor 0,3 [0,2-0,4 (0,4)] e 0,5 [0,52-0,95 (0,8)] (Tabela 6), respectivamente. Extremidade posterior dos machos com cauda alada não afunilada como nas fêmeas (Figuras 10, 13A, 13B e 23). A abertura cloacal (local onde os testículos se juntam ao reto formando um canal único) é em forma crescente, com uma margem da borda extensa e cutícula interna ligeiramente dobrada (Figuras 14 e 15). Vinte e uma papilas caudais (Figura 10), distribuídas em: quatro pares de papilas pedunculadas, três papilas sésseis pré-cloacais organizadas de forma linear (Figura 14, Tabela 6) e dois pares de papilas sésseis imediatamente após a cloaca (Figura 22). Além destes, há três pares de papilas relativamente equidistantes na extremidade posterior: os dois primeiros pares são assimétricos com as papilas inclinadas da esquerda para direita e o terceiro par simétrico, com uma suposta papila entre elas. (Figuras 6 - padrão III, 13A, 13B, 25, 26). Os espículos são desiguais apresentando formato e tamanhos diferentes (Figura 11). Espículo esquerdo lanceolado com 0,26 [0,23-0,28 (0,26)] de comprimento, o direito robusto e ligeiramente

curvado na ponta com 0,21 [0,19-0,23 (0,21)] de comprimento, representando 1,57% e 1,27% do comprimento do corpo (CE/ CC), respectivamente (Tabela 6). Nas figuras 31 e 32, um único espículo pode ser visto projetado na abertura cloacal.

Tabela 6. Morfometria, hospedeiros e localidades de machos *Physaloptera* spp. parasitos de roedores nas Américas.

	<i>P. murisbrasilensis</i> Diesing, 1861	<i>P. bispiculata</i> Mafra & Lanfredi, 1998	<i>P. bispiculata</i> Vaz & Pereira, 1935	<i>P. hispida</i> Schell, 1950	<i>P. longispicula</i> Quentin, 1968	<i>P. calnuensis</i> Suton, 1989	<i>P. galvaoi</i> Presente estudo
Comprimento	22-28	27.0-31.0	25.0	30-42	34.4	17.1	10-23
Largura	0.87-0.95	0.88-1.02	0.8	0.9-1.4	1.4	0.61	0.8-0.9
Esôfago glandular	-	4.2-4.88	3.2	4.2-5.3	5.3	2.99	3.0-3.74
Esôfago muscular	-	0.51-0.64	0.5	0.56-0.73	0.6	0.33	0.58-0.46
Anel nervoso*	-	0.33-0.55	-	0.55-0.7	0.5	0.34	0.20-0.43
Poros excretor	-	0.93-1.42	-	0.87-1.2	0.83	0.80	0.52-0.95
Deirídio	-	-	-	0.67-0.91	0.7	0.95	-
Cauda**	-	0.8-1.1	0.87	-	1.9	0.58	0.28-0.61
Espículo direito	0.40	0.37-0.45	0.40	0.39-0.55	0.71	0.31	0.19-0.23
C.D./ C.C.	1.6%	1.38%	1.6%	1.29%	2.06%	1.81%	2.4%
Espículo esquerdo	0.40	0.42-0.52	0.46	0.34-0.48	0.85	0.42	0.23-0.28
C.E./ C.C.	1.6%	1.6%	1.84%	1.13%	2.47%	2.45%	2.96%
Papila caudal δ	22	21	21	21	21	21	21
Bumpt papila	a	p	P	p	np	p	p
Hospedeiro	<i>Mus brasiliensis</i> (= <i>Holochilus brasiliensis</i>)	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>Sigmodon hispidus</i>	<i>Trichomys apereoides</i> (= <i>Cercomys cunicularius</i>)	<i>Calomys laucha</i>	<i>Cerrdomys subflavus</i>
Local de infecção	Estômago	Estômago	Estômago	Estômago	Estômago	Estômago	Estômago
Localidade	Brasil	Brasil	Brasil	EUA	Brasil	Argentina	Brasil

Todos as medidas estão em milímetros

a= ausente; p = presente; np = não descrito pelos autores; C.E./C.C.: comprimento do espículo/ comprimento total do corpo ;

* Distância a partir da extremidade anterior; ** Distância a partir da cloaca para a ponta da cauda; δ Número de papilas caudais

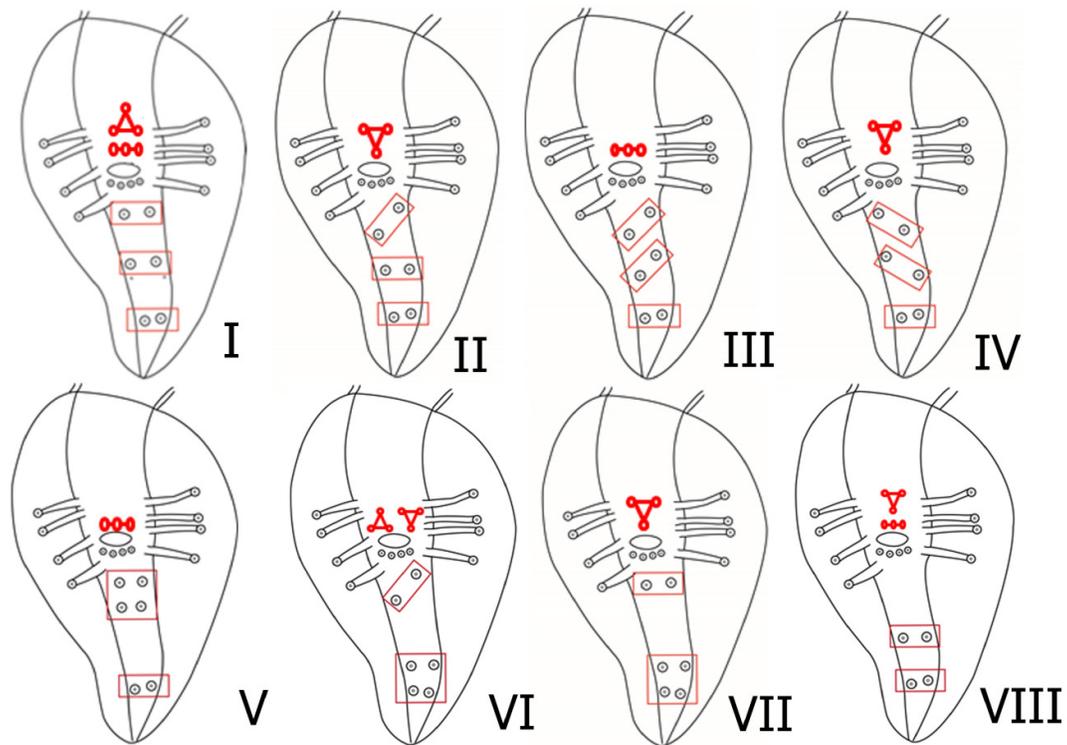


Figura 6. Representação esquemática da vista ventral das bolsas dos machos de *Physaloptera* spp. mostrando variações nos arranjos dos pares de papilas sésseis pré e pós cloacais (3º, 4º e 5º). Padrão I: pré-cloacais com formato triangular para cima ou linear, 3º, 4º e 5º pares equidistantes sem inclinação; Padrão II: pré-cloacais com formato triangular para baixo, 3º, 4º e 5º pares equidistantes com inclinação para a esquerda no 3º par; Padrão III: pré-cloacais lineares, 3º, 4º e 5º pares equidistantes com inclinação para a esquerda para 3º e 4º; Padrão IV: pré-cloacais com formato triangular para baixo, 3º, 4º e 5º pares equidistantes com inclinação para a direita dos 3º e 4º pares; Padrão V: pré-cloacais com formato linear, 3º e 4º pares agrupados sem inclinação e 5º par no final da cauda sem inclinação. Padrão VI: pré-cloacais com formato triangular para baixo e para cima, 3º par com inclinação esquerda, 4º e 5º pares agrupados na extremidade da cauda sem inclinação; Padrão VII: pré-cloacais com formato triangular para baixo, 3º par sem inclinação e 4º e 5º pares agrupadas na extremidade da cauda sem inclinação. Padrão VIII: pré-cloacais com formato triangular para baixo ou linear, 3º par ausente, 4º e 5º pares equidistantes sem inclinação (Fonte: São Luiz, 2015).

Fêmeas► (alótipo e 8 parátipos): Comprimento 11,58 [16,41-31,3 (23,38)]; largura 1,06 [1,10-3,18 (1,44)] (Tabela 7). Comprimento do esôfago muscular 0,49 [0,42-0,71 (0,56)] e esôfago glandular 1,44 [1,27-4,14 (2,70)] (Figura 7, Tabela 7). Anel nervoso e poro excretor 0,20 [0,20-,28 (0,19)], 0,7 [0,68-1,66 (1,17)] desde a extremidade anterior, respectivamente (Figuras 7, 22 e 23). Útero variando de 4-5 ramos uterinos (Figuras 9 e 16, Tabela 7). Abertura vulvar 9.0 [6,42-11,14 (8,78)] a partir da extremidade anterior (Figura 7, Tabela 7). Fasmídios laterais arredondados entre o ânus e a ponta da cauda cônica (Figura 24). Ovos elípticos 0,04 [0,04-0,05 (0,05)] de comprimento e 0,03 [0,02-0,03 (0,03)] de largura. Abertura do ânus 0,5 [0,43-0,50 (0,46)] a partir da extremidade posterior (Figuras 17 e 24).

Tabela 7. Morfometria, hospedeiros e localidades de fêmeas *Physaloptera* spp. parasitos de roedores nas Américas.

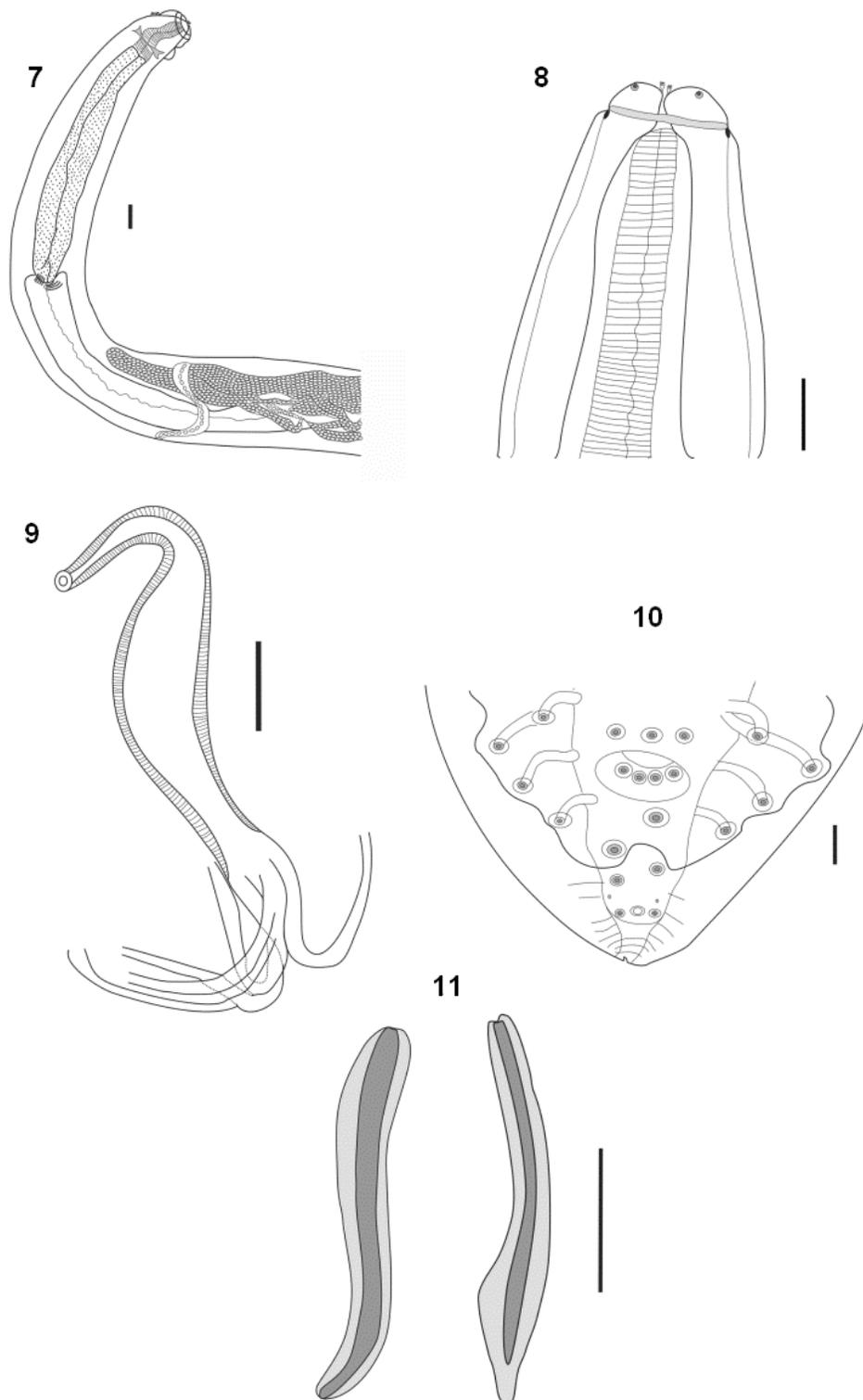
	<i>P. murisbrasilensis</i> Diesing, 1860	<i>P. bispiculata</i> Mafra & Lanfredi, 1998	<i>P. bispiculata</i> Vaz & Pereira, 1935	<i>P. hispida</i> Schell, 1950	<i>P. calnuensis</i> Suton, 1989	<i>P. galvaoi</i> Presente estudo
Comprimento	35-43	0.48-54.7	27-55	53-64	28.07	9.3-1.42
Largura	1.1-1.75	1.34-1.62	1.0-1.9	1.9-2.0	0.99	0.045-0.21
Esôfago glandular	-	5.5-6.88	3.8-5.4	5.0-7.0	3.32	1.27-4.14
Esôfago muscular	-	0.72-0.78	0.54-0.7	0.64-0.69	0.39	0.42-0.71
Anel nervoso *	-	0.58-0.64	-	0.71-0.74	0.38	0.20-0.28
Poros excretor	-	1.13-1.28	1.2	0.84-1.08	0.78	0.68-1.66
Deiridio	-	-	-	0.67-0.91	0.77	-
Vulva	-	10.2-13.2	0.46	11-16	12.28	0.43-0.50
Cauda **	-	0.64-0.82	-	-	0.52	0.28-0.61
Ovos ♂	0.045 x 0.026	0.05 x 0.036	0.05 x 0.036	0.040-0.052 x 0.023-0.030	0.039 x 0.019	0.043-0.50x 0.26-0.030
Ramos uterinos	2	-	2	2	-	4-5
Hospedeiros	<i>Holochilus brasiliensis</i> (= <i>Mus brasiliensis</i>)	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>Sigmodon hispidus</i>	<i>Calomys laucha</i>	<i>Cerrdomys subflavus</i>
Loca de infecção	Estômago	Estômago	Estômago	Estômago	Estômago	Estômago
Localidade	Brasil	Brasil	Brasil	EUA	Argentina	Brasil

Todos as medidas estão em milímetros

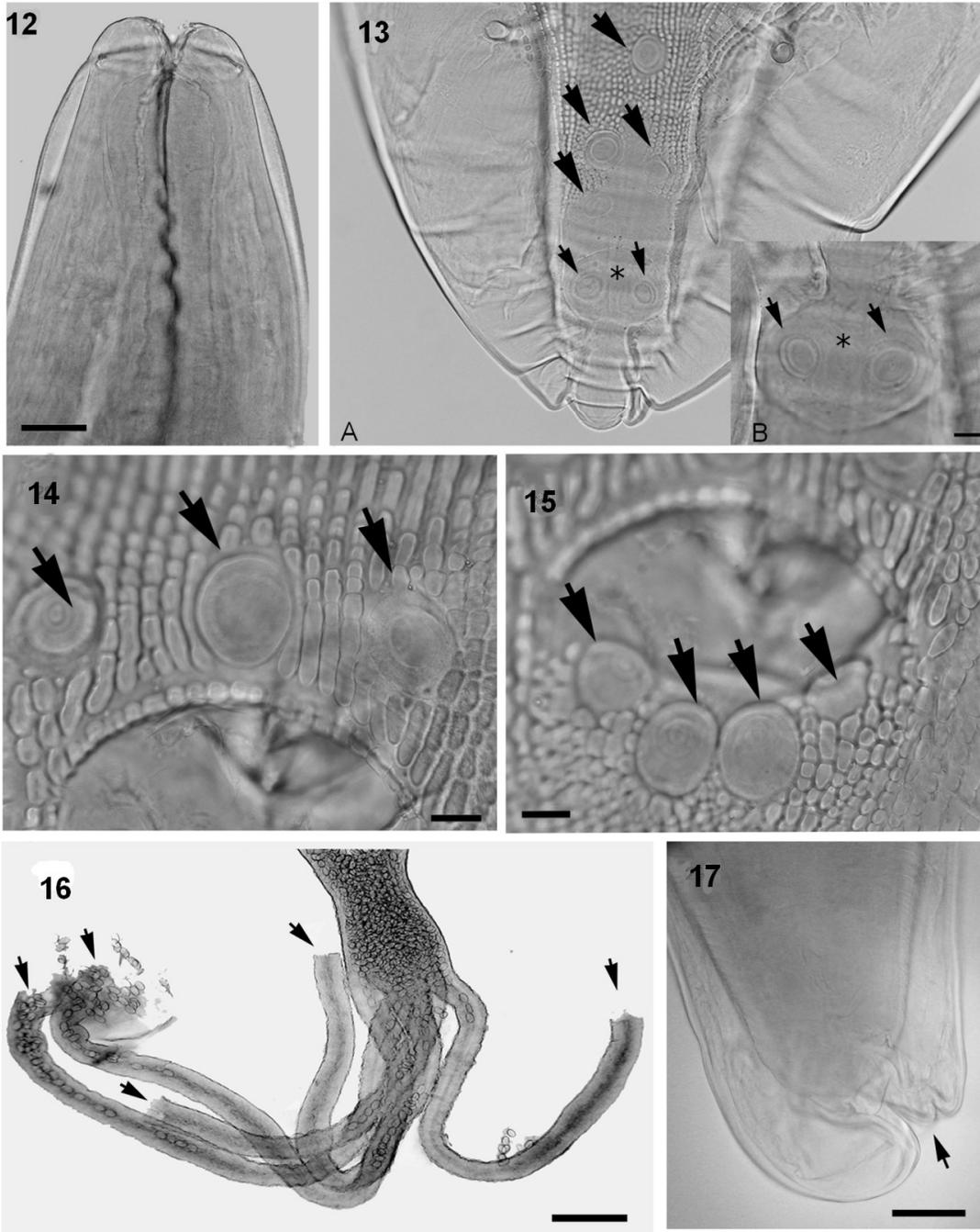
* Distância a partir da extremidade anterior; ** Distância a partir da ânus para a ponta da cauda; ♂ Comprimento X largura

Resumo taxonômico

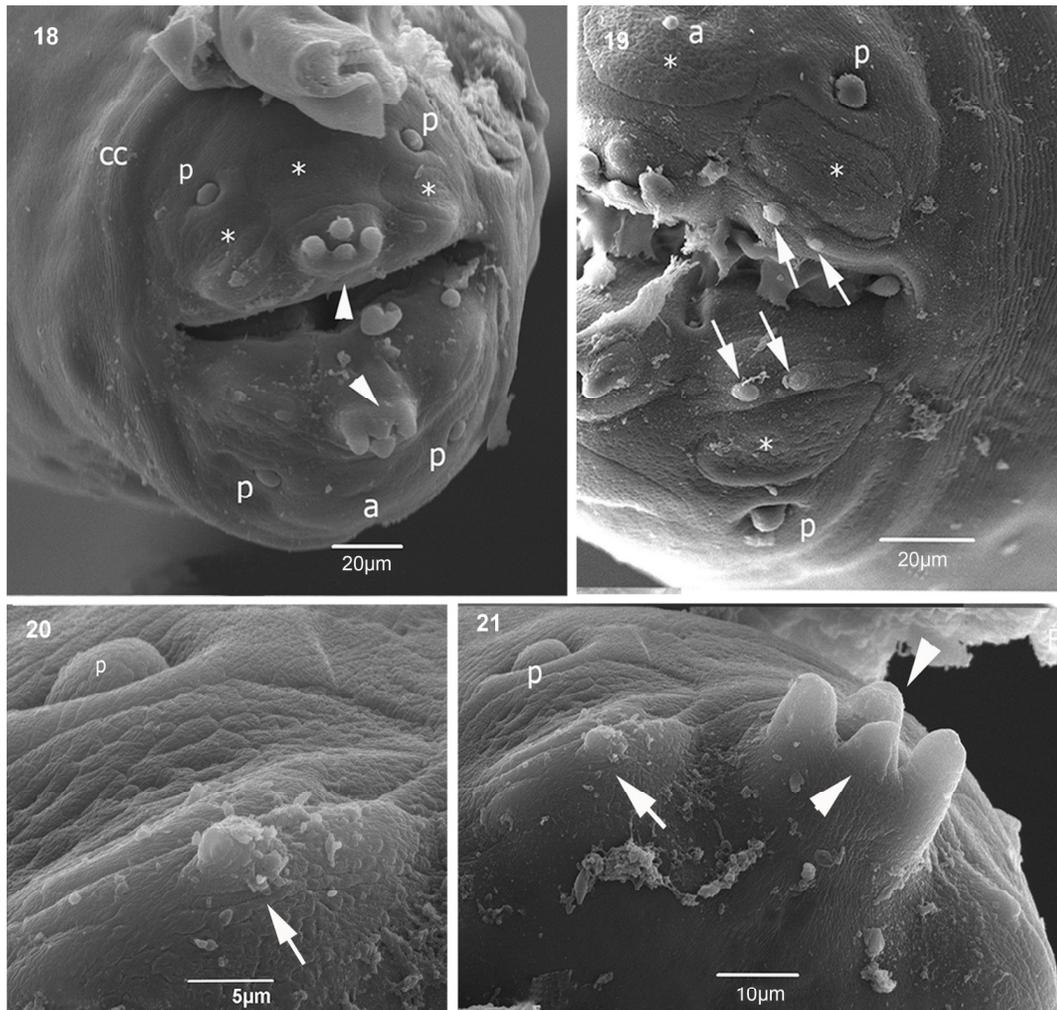
- ▶ **Hospedeiro tipo:** *Cerradomys subflavus* Wagner, 1842 (Rodentia: Cricetidae)
- ▶ **Sítio de infecção:** Estômago.
- ▶ **Localidade tipo:** Município São Roque de Minas, Serra da Canastra, MG, Brasil (20°13'28.30"S; 46°30'39.20"O)
- ▶ **Prevalência da infecção:** 43% (3 roedores infectados/ 7 roedores capturados).
- ▶ **Espécimes depositados:** holótipo e alótipo e parátipos foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC 36758 a, b)
- ▶ **Sequências DNA depositadas no GenBank:** KT894818 (18S); KT894807 (COI)



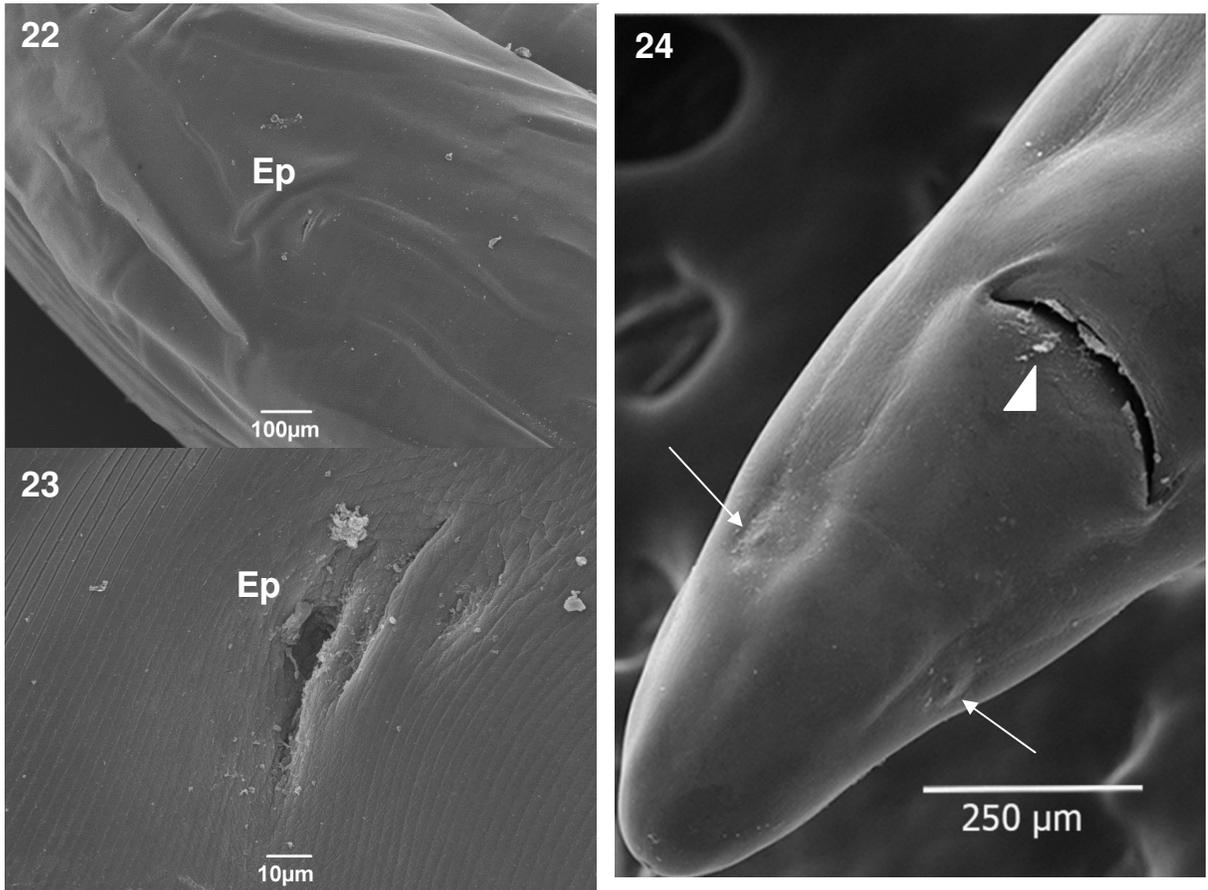
Figuras 7-11. *P. galvai* n. sp. 6. Extremidade anterior da fêmea mostrando esôfago muscular e glandular, anel nervoso, abertura vulvar e junção esôfago-intestinal. Barra de escala: 100 μ m. 7. Extremidade anterior do macho mostrando dente tripartite, papilas cefálicas e colarete cefálico. Barra de escala: 100 μ m. 8. Útero com cinco ramos uterinos. Barra de escala: 500 μ m. 9. Extremidade posterior do macho com 4 pares de papilas pedunculadas e treze papilas sésseis, 1 elevação tipo papila e abertura cloacal. Barra de escala: 100 μ m. 10. Espículos esquerdo (Ee) e direito (Ed). Barra de escala: 100 μ m. 11.



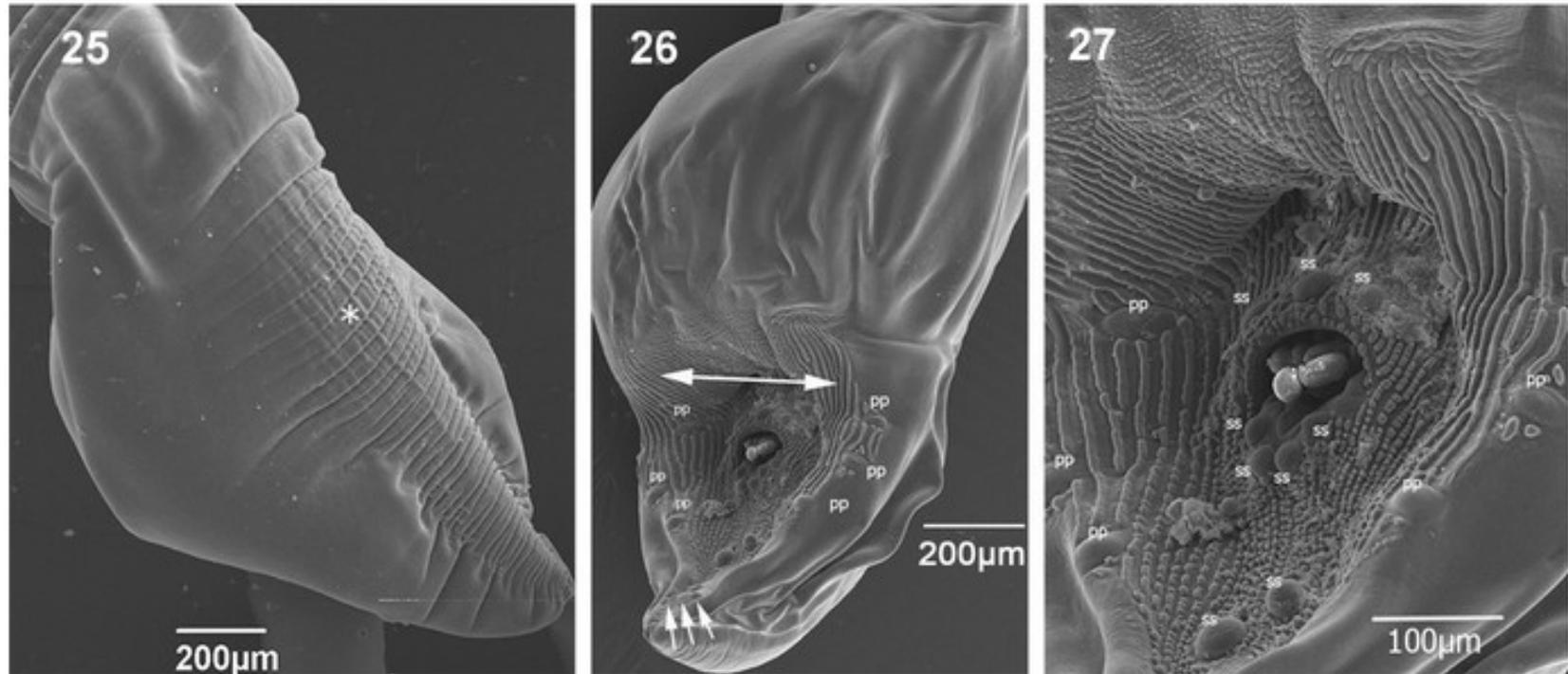
Figuras 12-17. Fotografias em microscopia de luz do holótipo *P. galvai* n. sp. 18. 12. Extremidade anterior do macho, vista lateral. Barra de escala: 100µm. 13. (A) Vista ventral da extremidade posterior do macho mostrando papilas pedunculadas e papilas sésseis. (B) Detalhe do 5º par de papilas sésseis como um botão. Barra de escala: 100µm. 14. Vista ventral das papilas pré-cloacais. Barra de escala: 500µm. 15. Vista ventral das papilas pós-cloacais. Barra de escala: 500µm. 16. Útero com os cinco ramos uterinos. Barra de escala: 100µm. 17. Extremidade posterior da fêmea mostrando ânus. Barra de escala: 100µm.



Figuras 18-21. Microscopia eletrônica de varredura de *P. galvai* n. sp. 18. Extremidade anterior da fêmea mostrando lábios com duas papilas cefálicas (P), dentes tripartites e externos (cabeça de seta), região cervical (cc), anfídios (a) e áreas porosas (*). 19. Detalhes mostrando dois pares de pequenos dentes laterais em cada pseudolábio (setas), papilas cefálicas (p) e áreas porosas (*). 20. Detalhe da papila cefálica (p) e do pequeno dente (seta). 21. Detalhe dos dentes tripartites (cabeça de seta) e pequeno dente lateral (setas), pequeno orifício (seta fina) e papilas (P).



Figuras 22-24. Microscopia eletrônica de varredura de *P. galvai* n. sp. Microscopia eletrônica de varredura de *P. galvai* n. sp. 22. Poro excretor (Ep). 23. Detalhe do poro excretor (Ep) . 24. Extremidade posterior da fêmea mostrando abertura anal (cabeça de seta) e fasmídios (seta).



Figuras 25-27. Microscopia eletrônica de varredura de *P. galvai* n. sp. 25. Vista dorsal da cauda do macho, mostrando estriações cuticulares na região central (*) e uma leve expansão lateral na cauda. 26. Extremidade posterior do macho vista ventral, mostrando duas dobras lateroventral (seta dupla), quatro pares de papilas pedunculadas externo laterais (pp). 27. Vista ventral da cauda do macho detalhada: abertura cloacal, papilas pré e pós cloacais (ss), quatro pares de papilas pedunculadas (pp) e ornamentação da cutícula.

Tabela 8. Principais características taxonômicas de machos e fêmeas da espécie *Physaloptera* em diferentes hospedeiros na América do Sul.

Espécies	Hospedeiro Vertebrado	Fêmeas		Machos				Autores
		Abertura vulvar	Ramos uterinos	Tamanho dos espículos* (comprimento do corpo %)		Arranjo das papilas posteroventrais		
				Esquerdo	Direito	Pré-cloacal	3 ^o 4 ^o 5 ^o pares	
<i>P. bispiculata</i>	Rodentia: Cricetidae <i>Nectomys squamipes</i>	Anterior	2	0.46 (1.8)	0.40 (1.6)		I	Vaz & Pereira, 1935 Mafrá & Lanfredi, 1998
	<i>Nectomys squamipes</i>		2	0.47 (1.6)	0.41 (1.4)			
<i>P. galvaoi</i>	Rodentia: Cricetidae <i>Cerradomys subflavus</i>	Anterior	4-5	0.26 (1.57)	0.21 (1.27)		III	Presente estudo
<i>P. murisbrasiliensis</i>	Rodentia: Cricetidae <i>Holochilus brasiliensis</i>	Anterior	2	0.40 (1.6)	0.40 (1.6)		II	Diesing, 1861 Ortlepp, 1922
<i>P. calnuensis</i>	Rodentia: Cricetidae <i>Calomys laucha</i>	Anterior	-	0.42 (2.5)	0.31 (1.8)		I	Suton, 1989
<i>P. longispicula</i>	Rodentia: Echimidae <i>Thrichomys apereoides</i>	-	2	0.85 (2.5)	0.71 (2.1)		I	Quenti, 1968
<i>P. hispida</i>	Rodentia: Cricetidae <i>Sigmodon hispidus</i>	Posterior	2	0.41 (1.1)	0.47 (1.3)		II	Schell, 1950
<i>P. torresi</i>	Rodentia: Agoutidae <i>Agouti paca</i>	Anterior	9-11	0.48 (1.3)	0.48 (1.3)		I	Travassos, 1920 Ortlepp, 1922
<i>P. mirandai</i>	Didelphidae: Marsupialia <i>Metachirus nudicaudatus</i>	Anterior	2	0.24 (1.3)	0.26 (1.4)		VI	Lent & Freitas, 1937
<i>P. herthameyrae</i>	Didelphidae: Marsupialia <i>Gracilinanus agilis</i>	Anterior	2	0.24 (1.3)	0.26 (1.4)		IV	Torres et al. 2009
<i>P. turgida</i>	Didelphidae: Marsupialia <i>Didelphis aurita</i>	Anterior	9-11	0.52 (1.8)	0.48 (1.7)		VI	Rudolphi, 1819 Travassos, 1920

<i>P. magnipapilla</i>	Xenarthra: Myrmecophagidae <i>Mirmecophaga tetradactyla</i>	Posterior	2	0.45 (2.0)	0.42 (1.9)		VI	Molin, 1860 Ortlepp, 1922
<i>P. semilanceolata</i>	Carnivora: Procyonidae <i>Nasua nasua</i>	Anterior	2	0.73 (2.7)	0.57 (2.0)		I	Molin, 1860 Ortlepp, 1922
<i>P. maxillaris</i>	Carnivora: Felidae <i>Conepatus chinga</i> <i>Panthera onça</i>	Anterior	2	1.2 (4.4) 0.5 (1.8)	0.56 (2.0) 0.50 (1.8)		I	Molin, 1860 Ortlepp, 1922
<i>P. anomala</i>	Carnivora: Felidae <i>Panthera onça</i>	Anterior	2	0.49 (1.6)	0.49 (1.6)		VII	Molin, 1860 Ortlepp, 1922
<i>P. terdentata</i>	Carnivora: Felidae <i>Puma concolor</i>	Anterior	2	0.32 (2.3)	0.31 (2.2)		V	Molin, 1860 Ortlepp, 1922
<i>P. praeputialis</i>	Carnivora: Felidae <i>Felis catus</i> Carnivora: Canidae <i>Canis familiaris</i> <i>Chrysacyon brachiurus</i>	Anterior	2	1.1 (3.3)	1.3 (3.9)		VIII	Von Linstow, 1889 Ortlepp, 1922
<i>P. dilatata</i>	Primata: Atelidae <i>Lagothricha lagothicha</i>	Anterior	12-15	0.66 (1.3)	0.66 (1.3)		VII	Rudolphi, 1819 Ortlepp, 1922
<i>P. retusa</i>	Reptilia: Teiidae <i>Tupinambis teguixin</i>	Anterior	2	0.46 (2.3)	0.48 (2.4)		VII	Rudolphi, 1819 Ortlepp, 1922
<i>P. apivori</i>	Accipitriformes: Accipitridae <i>Pernis apivorus</i>	-	2	-	-		VIII	Desportes, 1947
<i>P. alata</i>	Accipitriformes: Accipitridae <i>Accipiter gentilis</i>	Anterior	2	0.57 (3.3)	0.57 (3.3)		VIII	Rudolphi, 1819 Ortlepp, 1922
<i>P. thalacomys</i>	Peramelemorphia: Thylacomyidae <i>Macrotis leucura</i>	Anterior	-	0.66 (3.9)	0.52 (3.0)		VII	Johnston & Mawson, 1940

5.2. Análises moleculares

conjunto de sequências foi obtido a partir de NCBI GenBank e barcoding para 33 espécies do gene 18S rRNA e 29 espécies para MT-CO1, que estão listadas na (Tabela 9). *Aqualis Plectus* e *Plectus* sp. foram usados como grupo externo. Um total de 11 espécies foram sequenciadas amplificando a região 18S rRNA e MT-CO1 (Tabela 10). Destas, 6 espécies pertencem à família Physalopteridae, 3 Spiruridae, 1 Gnathostomatidae e 1 Rictulariidae. Dos 766 pares de base da sequência 18S de *Physaloptera* spp., 46 sítios foram variáveis e 44 parcimônia-informativo. Dos 690 sítios no conjunto de dados de MT-CO1, 158 foram variáveis e 66 foram parcimônia-informativo.

As árvores filogenéticas foram construídas baseadas nos genes 18S rRNA e MT-CO1 utilizando as inferências Bayesiana e Máxima parcimônia que mostraram topologias semelhantes e estão e mostradas nas figuras 28 e 29.

A árvore construída baseada no gene 18S rRNA formou dois clados agrupando as espécies da família Physalopteroidea, sendo um formado por espécies de aves e outro por espécies de mamíferos com valores de bootstrap 100% e 84%, respectivamente. Na árvore usando o gene MT-CO1 também foi formado 2 clados distintos, um clado formado por espécies do gênero *Physalopteroides* e outro por espécies do gênero *Physaloptera* e *Turgida* com valores de bootstrap 100% ambos.

Valores Interespecíficos da distância-p entre as espécies de *Physaloptera* considerando o gene 18S rRNA variaram de 0,2% entre *P. bispiculata*, *P. mirandai* e *P. galvaei* parasitos de roedores e marsupiais e 3,1% entre *P. thalacomys* e *P. alata*, parasitos marsupiais e aves. Enquanto, utilizando o gene MT-CO1 a variação interespecífica variou de 14,6% entre *P. retusa* e *P. mirandai* a 24,2% entre *Physaloptera* sp (KC130693) e *P. galvaei*.

Tabela 9. Números de acesso de seqüências recuperadas do GenBank e hospedeiros de parasitas.

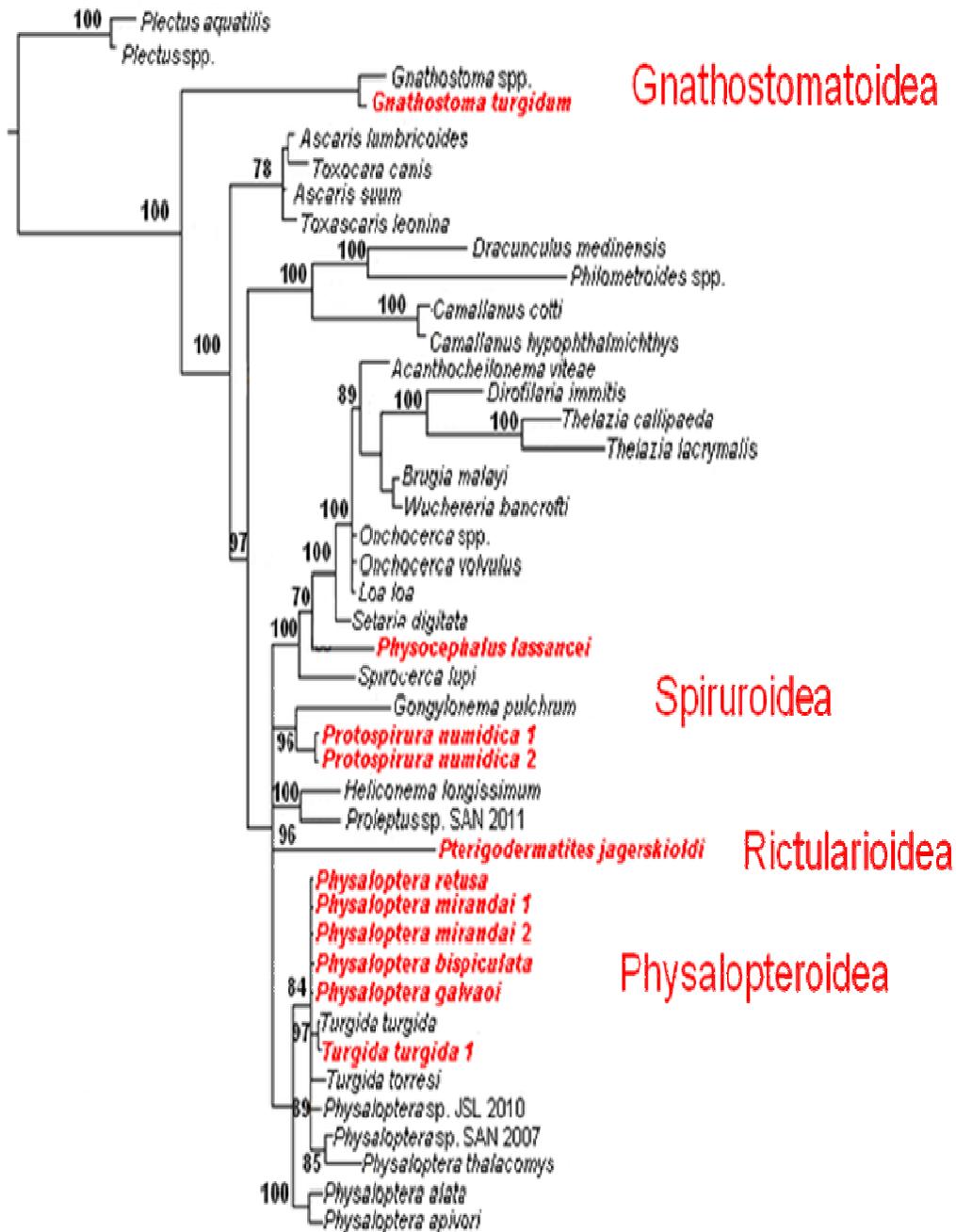
Nematóides	Número acesso do GenBank		Hospedeiros
	18S	MT-CO1	
<i>Acanthocheilonema viteae</i>	DQ094171	NC016197	<i>Meriones unguiculatus</i>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	U94366	HQ704900	<i>Homo sapiens</i>
<i>Ascaris suum</i>	U94367	HQ704901	<i>Sus scrofa</i>
<i>Brugia malayi</i>	AF036588	AF538716	<i>Homo sapiens</i>
<i>Camallanus cotti</i>	EF180071	EU598890	<i>Lentipes concolor</i>
<i>Camallus hypophthalmichthys</i>	JF803915	EU598816	<i>Aristichthys nobilis</i>
<i>Dirofilaria immitis</i>	AF036638	NC005305	<i>Canis lupus familiaris</i>
<i>Dracunculus medinensis</i>	AY947720	HQ216219	<i>Homo sapiens</i>
<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Z96946	-	<i>Homo sapiens</i>
<i>Gnathostoma spinigerum</i>	-	KP410547	<i>Monopterus albus</i>
<i>Gongylonema pulchrum</i>	AB646050	KM264298	Artiodactyla
<i>Heliconema longissimum</i>	JF803926	NC016127	<i>Anguilla japonica</i>
<i>Loa loa</i>	JPEI01001888	NC016199	<i>Homo sapiens</i>
<i>Onchocerca cervicalis</i>	DQ094174	-	Equidae
<i>Onchocerca flexuosa</i>	-	NC016172	<i>Cervus elaphus</i>
<i>Onchocerca volvulus</i>	ADBW01003330	AF015193	<i>Homo sapiens</i>
<i>Philometroides grandipapillatus</i>	JF803941	-	<i>Caranx hippos</i>
<i>Philometroides sanguineus</i>		KM111526	<i>Carassius carassius</i>
<i>Physaloptera alata</i>	AY702703	-	<i>Accipiter gentilis</i>
<i>Physaloptera apivori</i>	EU004817	-	<i>Pernis apivorus</i>
<i>Physaloptera</i> sp. BOLD: AAY6338	-	KC130690	<i>Trimorphodon biscutatus</i>
<i>Physaloptera</i> sp. BOLD: AAY6338	-	KC130694	<i>Trimorphodon biscutatus</i>
<i>Physaloptera</i> sp. BOLD: AAY6338	-	KC130696	<i>Trimorphodon biscutatus</i>
<i>Physaloptera</i> sp. JSL 2010	HM067978	-	<i>Macaca fascicularis</i>
<i>Physaloptera</i> sp. SAN 2007	EF180065	-	<i>Mephitis mephitis</i>
<i>Physaloptera thalacomys</i>	JF934734	-	<i>Perameles gunnii</i>
<i>Physaloptera torresi</i>	EF180069	-	<i>Dasyprocta punctata</i>
<i>Physaloptera turgida</i>	DQ503459	KC130680	<i>Didelphis virginiana</i>
<i>Physalopteridae</i> gen. sp. 1 BOLD:AAY6345	-	KC130693	<i>Sceloporus</i> sp.
<i>Physalopteridae</i> gen. sp. 1 BOLD:AAY6345	-	KC130710	<i>Sceloporus</i> sp.
<i>Physalopteridae</i> gen. sp. 2 BOLD:AAY6344	-	KC130708	<i>Imantodes</i> sp.
<i>Plectus aquatilis</i>	AY284700	HM627505	free-living marine nematode
<i>Plectus minimus</i>	KC206040	-	free-living marine nematode
<i>Plectus murrayi</i>	-	KJ124396	free-living marine nematode
<i>Proleptus</i> sp.	JF934733	-	<i>Trygonorrhina fasciata</i>
<i>Setaria digitata</i>	DQ094175	NC014282	Bovidae
<i>Spirocerca lupi</i>	AY751497	KC305876	<i>Canis lupus familiaris</i>
<i>Thelazia callipaeda</i>	AB538282	JX069968	<i>Homo sapiens</i>
<i>Thelazia lacrymalis</i>	DQ503458	AJ271619	<i>Equus caballus</i>
<i>Toxascaris leonina</i>	U94383	NC023504	<i>Canis lupus familiaris</i>

<i>Toxocara canis</i>	U94382	NC010690	<i>Canis lupus familiaris</i>
<i>Trichinella britovi</i>	AY851257	KM357413	non-specific mammal nematode
<i>Trichuris suis</i>	AY851265	GU070737	<i>Sus scrofa</i>
<i>Wuchereria bancrofti</i>	AY843436	IN367461	<i>Homo sapiens</i>
<i>Xiphinema americanum</i>	AM086684	NC005928	non-specific plant nematode

Tabela 10. Número de acesso (ID) das espécimes sequenciadas e depositadas no GenBank coletadas no território nacional.

Espécimes depositadas	Localidade/ Georeferência	Hospedeiros	Números de acesso do GenBank	
			18S	MT-CO1
Physalopteroidea				
	Minas Gerais			
<i>Physaloptera galvaoi</i>	20°13'28.30"S; 46°30'39.20"W	<i>Cerradomys subflavus</i>	KT894818	KT894807
	Acre			
<i>Physaloptera mirandai 1</i>	9°54'17.70"S; 67°17'8.01"W	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	KT894815	KT894804
	Bahia			
<i>Physaloptera mirandai 2</i>	13°49'.35"S; 39°08'32"W	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	KT894816	KT894805
	Rio Janeiro			
<i>Physaloptera bispiculata</i>	22°01'48.62"S; 42°39'29.71"W	<i>Nectomys squamipes</i>	KT894817	KT894806
	Rio Janeiro			
<i>Physaloptera turgida 1</i>	21°30'06.00"S; 41°53'58.21"W	<i>Didelphis aurita</i>	KT894819	KT894808
	Rio Janeiro			
<i>Physaloptera retusa</i>	23°06'38.21"S; 44°14'52.07"W	<i>Tupinambis teguixin</i>	KT894814	KT894803
Spiruroidea				
	Mato Grosso Sul			
<i>Physocephalus lassancei</i>	19°34'54"S; 056°14'62"W	<i>Thrichomys fosteri</i>	KT894810	KT894799
	Rio Janeiro			
<i>Protospirura numidica 1</i>	23°10'39.77"S; 44°11'29.09"W	<i>Oxymycterus dasythricthus</i>	KT894811	KT894800
	Minas Gerais			
<i>Protospirura numidica 2</i>	18°55'14.71"S; 48°20'52.59"W	<i>Oxymycterus delator</i>	KT894812	KT894801
Rictularoidea				
	Mato Grosso Sul			
<i>Pterigodermatites jagerskioldi</i>	19°15'01"S; 057°01'29"W	<i>Thylamys macrurus</i>	KT894813	KT894802
Gnathostomatoidea				
	Santa Catarina			
<i>Gnathostoma turgidum</i>	27°74'29.41"S; 48°80'34.22"W	<i>Phillander opossum</i>	KT894809	KT894798

Figura 28. Reconstrução filogenética através de Inferência Bayesiana das espécies sequenciadas usando o gene 18S rRNA. Valores de probabilidades posteriores bayesianas estão nos nós da árvore.



0.07

Tabela 11. Valores da distância-*p* (% Kimura-2-parâmetros) entre as sequências de *Physaloptera* baseados no gene 18S rRNA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>Physaloptera retusa</i>												
2 <i>Physaloptera mirandai</i> 1	0,000											
3 <i>Physaloptera mirandai</i> 2	0,000	0,000										
4 <i>Physaloptera bispiculata</i>	0,002	0,002	0,002									
5 <i>Physaloptera galvaei</i>	0,000	0,000	0,000	0,002								
6 <i>Physaloptera turgida</i>	0,005	0,005	0,005	0,003	0,005							
7 <i>Physaloptera turgida</i> 1	0,005	0,005	0,005	0,003	0,005	0,000						
8 <i>Physaloptera torresi</i>	0,008	0,008	0,008	0,006	0,008	0,006	0,006					
9 <i>Physaloptera alata</i>	0,019	0,019	0,019	0,020	0,019	0,020	0,020	0,023				
10 <i>Physaloptera apivori</i>	0,015	0,015	0,015	0,017	0,015	0,020	0,020	0,023	0,009			
11 <i>Physaloptera</i> sp JSL2010	0,006	0,006	0,006	0,008	0,006	0,008	0,008	0,011	0,016	0,015		
12 <i>Physaloptera</i> sp SAN2007	0,009	0,009	0,009	0,008	0,009	0,011	0,011	0,014	0,022	0,015	0,012	
13 <i>Physaloptera thalacomys</i>	0,023	0,023	0,023	0,022	0,023	0,025	0,025	0,028	0,031	0,028	0,027	0,017

Tabela 12. Valores da distância-*p* (% Kimura-2-parâmetros) entre as sequências de *Physaloptera* baseados no gene MT-CO1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>Physaloptera retusa</i>											
2 <i>Physaloptera mirandai</i> 1	0,146										
3 <i>Physaloptera mirandai</i> 2	0,139	0,106									
4 <i>Physaloptera bispiculata</i>	0,168	0,164	0,174								
5 <i>Physaloptera galvaei</i>	0,160	0,160	0,172	0,036							
6 <i>Physaloptera turgida</i> 1	0,148	0,141	0,161	0,166	0,152						
7 KC130690 <i>Physaloptera</i> sp	0,180	0,154	0,148	0,193	0,191	0,145					
8 KC130694 <i>Physaloptera</i> sp	0,178	0,152	0,146	0,195	0,193	0,147	0,003				
9 KC130696 <i>Physaloptera</i> sp	0,180	0,154	0,148	0,193	0,191	0,145	0,000	0,003			
10 KC130693 <i>Physaloptera</i> sp	0,208	0,210	0,200	0,240	0,242	0,184	0,228	0,226	0,228		
11 KC130708 <i>Physaloptera</i> sp	0,223	0,221	0,225	0,236	0,236	0,196	0,217	0,215	0,217	0,090	
12 KC130710 <i>Physaloptera</i> sp	0,208	0,210	0,200	0,240	0,242	0,184	0,228	0,226	0,228	0,000	0,090

5.3. Descrição histológica de *P. galvaoi*

Nas análises microscópica foi observado a cutícula em torno de todo corpo dos nematódeos. Esta cutícula invagina em diferentes regiões tais como: boca, ânus, abertura vulvar e cloaca. Além disso, também recobre órgãos sensoriais como anfídios, fasmídios e em algumas outras partes formam expansões cuticulares, colarete cefálico, lábios, denticulos e papilas caudais (pedunculadas e sésseis). A parede do corpo de *P. galvaoi* consiste em três camadas: cutícula, subcutícula ou hipoderme e uma camada muscular. Na microscopia de luz, a cutícula dorsal e ventral deste parasito possui uma ultraestrutura com múltiplas camadas e estriações que formam três camadas: o córtex (bastante corado) ou camada superior mais escura com 7,44 μm , em seguida, matriz ou camada mediana 10 μm de espessura (sem constituições distintas) e uma camada interna muito fina de aparência fibrosa em contato com a hipoderme com 15,75 μm de espessura disposta em torno do parasito e apoiada sobre a membrana basal (Figura 30A). A subcutícula ou hipoderme consiste em uma camada de células distintas localizadas logo abaixo da cutícula (Figura 30B).

Músculos longos são observados apenas abaixo da hipoderme ao longo do interior do corpo. As camadas musculares estão todas alinhadas longitudinalmente, contínuas com células com núcleo circular na região central e citoplasma vacuolizado, essas são interrompidas pela presença de cordas laterais em forma de cogumelo situado perto do esôfago muscular. Observamos ainda nesta camada núcleo arredondado e nucléolo evidente (Figura 30C).

As células do EM estão dispostas em direções diferentes com núcleo não evidente em HE (Figura 31A). EM exhibe uma luz muito delgada e sinuosa que termina em leve constrição na região de transição para o EG. EG apresenta epitélio cilíndrico simples, núcleo basal arredondado evidente com microvilosidades e constitui a maior parte do esôfago passando mais da metade do corpo do helminto dobrando-se e retornando a região anterior (Figura 31C).

Logo após o ponto de junção do esôfago com o intestino, o mesmo exhibe uma luz discreta e tortuosa com material mucoso no seu interior. Esta luz fica mais evidenciada à medida que o intestino segue para a porção medial do corpo. O intestino tem as paredes constituídas por uma só camada de células epiteliais cilíndricas como um tubo de células individuais com núcleos na base das células com

nucléolos evidentes. Na região apical destas células se observa uma área escura que representa a presença dos filamentos de actina (microfilamentos) que conectam-se com as terminações das microvilosidades ao citoplasma (Figura 32A). Nas secções histológicas foram observados materiais coagulados no líquido pseudocelomático (Figura 30D). Na porção posterior do corpo, o intestino diminui seu diâmetro, acompanhando a curvatura da região posterior do corpo do helminto (Figura 32B).

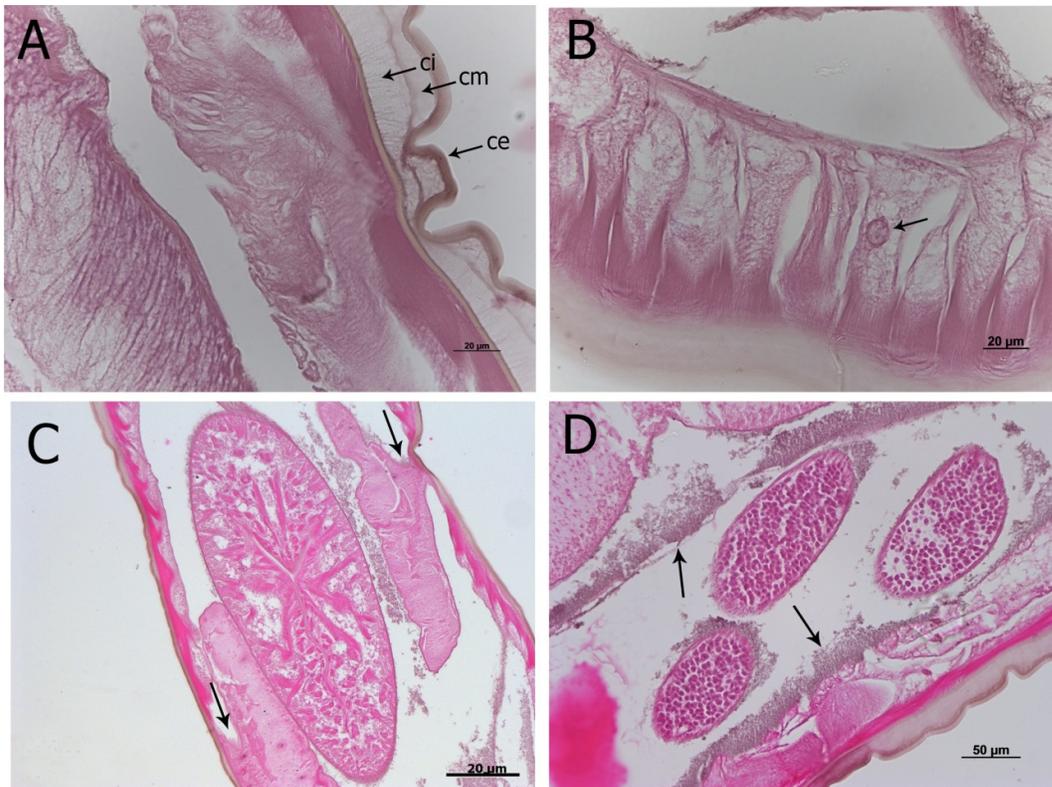


Figura 30. Cortes histológicos transversais corados em HE de *P. galvai*. A. Camadas da cutícula (parede do corpo): cortéx (ce), matrix (cm) e camada mais interna (ci). B. Hipoderme. C. Cordões laterais (cl). D. Material coagulado entre os órgãos (seta).

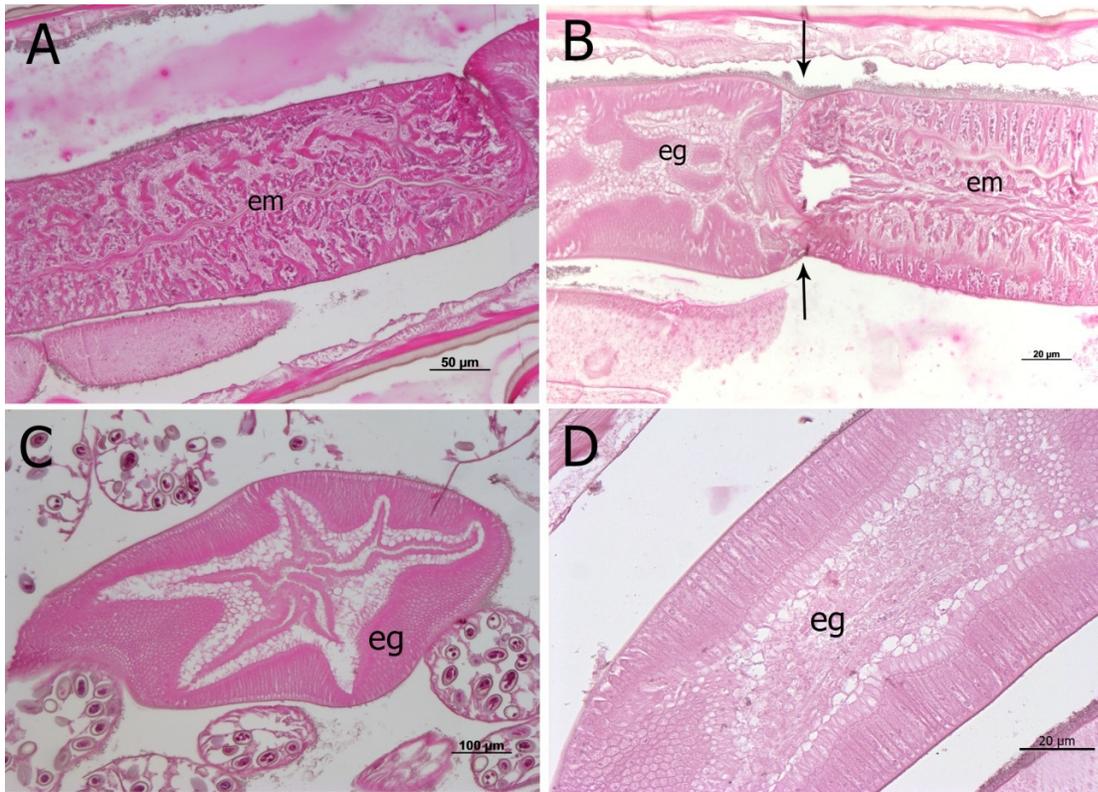


Figura 31. Cortes histológicas transversais corados em HE de *P. galvai*. A. Esôfago muscular. B. Região de transição (seta) entre em e eg. C. Vista longitudinal do eg estrelado. D. Detalhes da composição celular do eg.

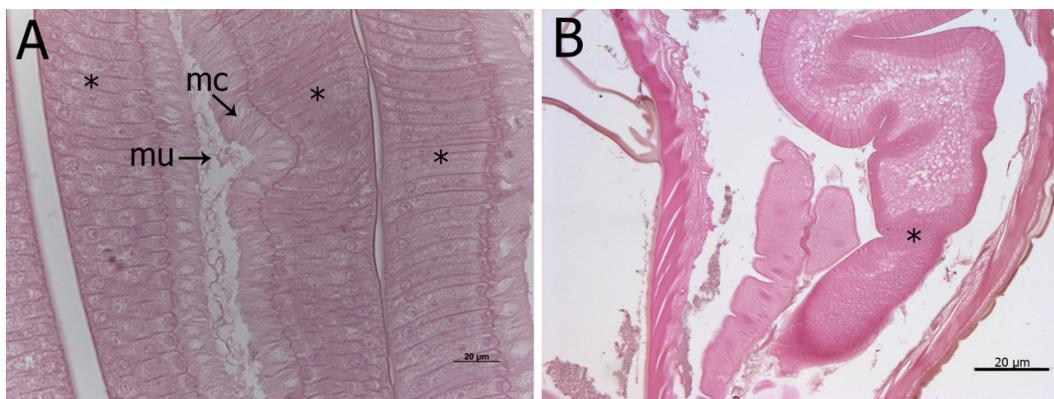


Figura 32. Cortes histológicas transversais corados em HE de *P. galvai*. A. Células intestinais (*), muco (mu) e microvilosidades (mc). B. Região posterior do corpo, parte terminal do intestino (*).

O aparelho reprodutor masculino é formado por um longo tubo diferenciado em testículo, canal deferente, canal ejaculador e órgãos copuladores anexos (Figuras 33 e 34). O tubo genital masculino se abre em uma abertura na região denominada cloaca. O testículo é um tubo cilíndrico com várias curvas, formando alças no interior do corpo, e a alça mais anterior se inicia na região de transição entre EM e EG. (Figura. 33A). Em sua porção anterior, o testículo é constituído por epitélio de revestimento formado por células grandes com um ou dois núcleos contendo nucléolos bem evidentes. O entorno da carioteca tem aspecto radial. Na coloração HE os limites entre as espermatogônias não é evidente. O citoplasma cora-se ligeiramente mais forte na periferia pela eosina e está repleto de inclusões e apresentando aspecto craquelado (Figura 33B). À medida que se diferenciam, as espermatogônias diminuem de tamanho e ficam localizadas na periferia do órgão, o qual apresenta uma parede com superfície externa ondulada. Partes citoplasmáticas das espermatogônias soltam-se para a luz como grumos que se diferenciam em espermátides que posteriormente se individualizam (Figura 33C). A vesícula seminal dotada de parede delgada, formada por monocamada de células com núcleo arredondado e nucléolo evidente, a qual contém espermátides (Figura 33D). As espermátides unem-se pela porção flagelar e apresentam núcleo com um ou dois nucléolos (Figura 34A) e diferenciam-se em espermatozoides na porção posterior da vesícula seminal (Figura 36B). Os espermatozoides são flagelados e possuem núcleo evidente (Figura 34B). O vaso deferente é um segmento da vesícula seminal e na altura desta região ocorrem constrições (Figura 34C). O tubo reprodutor segue em direção à região posterior do helminto com redução da luz e alargamento da parede (Figura 32B). O aparelho copulador dos machos é constituído por espículos que em corte transversal apresentou região externa revestida por cutícula que recobre músculos dispostos radialmente repousadas sobre espaço claro cujo interior contém camada de músculo circular envolvida por cutícula (Figuras 34D e E). As papilas da cauda apresentaram envoltório cuticular contendo no seu interior células com núcleo periférico e nucléolo evidente (Figura 34E e F).

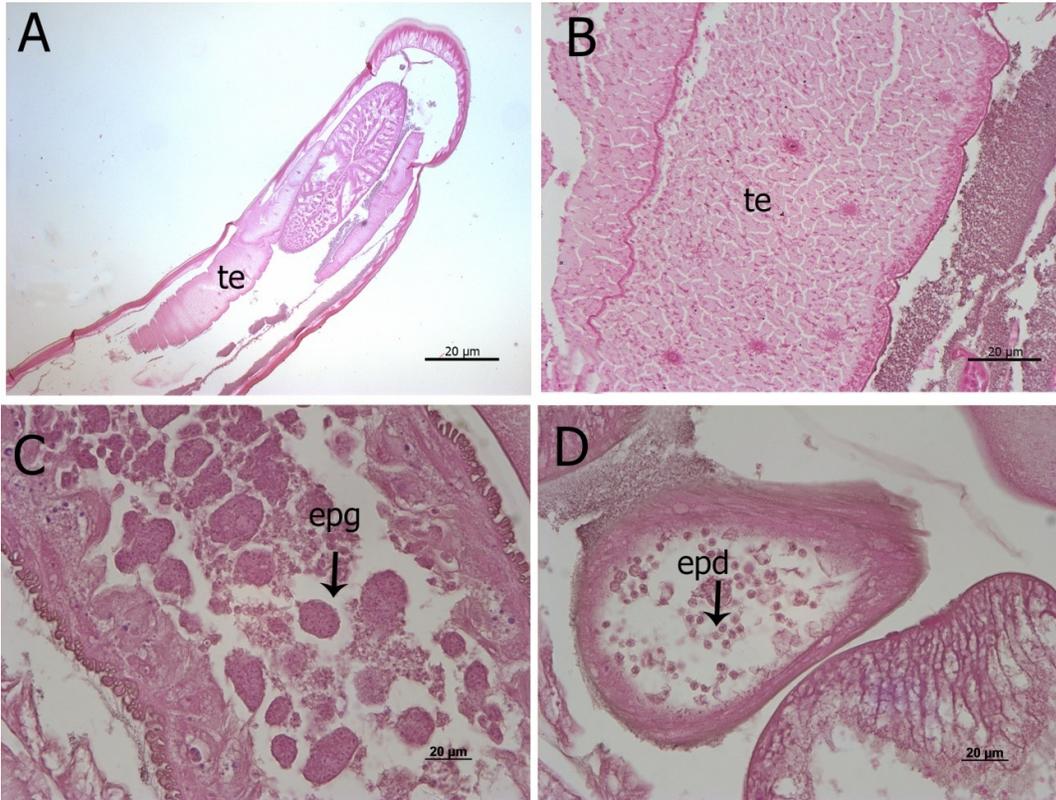


Figura 33. Cortes histológicos transversais corados em HE de *P. galvai*. A. Células intestinais (*), muco (mu) e microvilosidades (mc). B. Região posterior do corpo, parte terminal do intestino (*). C. Epiderme com células epidermais (epg) e células de suporte (es). D. Epiderme com células epidermais (epd) e células de suporte (es).

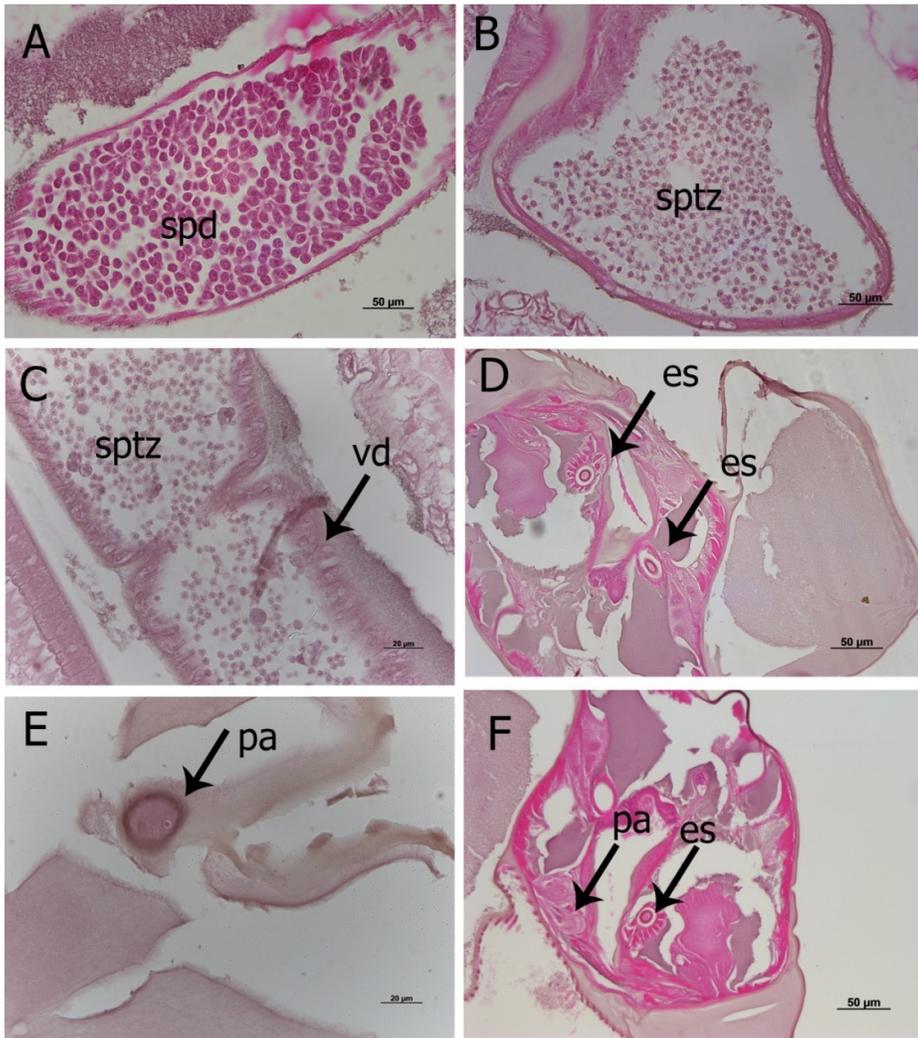


Figura 34. Cortes histológicos transversais corados em HE do tubo genital masculino de *P. galavoi*. **A.** Multiplicação das espermátides (epd). **B.** Espermatozóides (sptz). **C.** Vaso deferente (vd) com espermatozóides maduros (sptz). **D.** Espículos (es). **E.** Papila ventral. **F.** Papilas pedunculadas (pa) e espículos (es).

O aparelho reprodutor feminino é constituído por tubos diferenciados em diversas partes que se abrem para o exterior através da vulva-vagina (Figura 36D). As fêmeas adultas são polidelfas, ou seja, apresentam de quatro a cinco ovários conforme seu número de úteros. Cada ovário é formado por folículos de diferentes tamanhos preenchidos por massa germinativa (Figuras 35A e B). A parede que reveste o ovário é constituída por células eosinofílicas com núcleo oval e nucléolo evidente cujos prolongamentos preenchem os espaços entre os folículos (Figura 35B). Dentro do folículo, é possível, às vezes observar núcleos dos oócitos. Na coloração HE não se observa as membranas que individualizam cada ovócitos (Figura 35B). Em um dos cortes histológicos foi possível observar a conexão entre o ovário e a porção anterior do útero, a qual abre-se como um tubo com luz inicialmente discreta depois proeminente cuja parede é composta por células fusiformes com núcleo e nucléolo evidente, abaixo desse epitélio corre uma camada muscular em contato com a luz (Figura 35B e D).

A parede dos ramos uterinos contém células de núcleo oval com nucléolo evidente e com prolongamentos citoplasmáticos, de formas variadas, projetadas para a luz do tubo (Figura 35C). Os ramos uterinos não contêm a camada muscular subepitelial observada no útero. Os prolongamentos citoplasmáticos envolvem individualmente os ovos durante todo seu desenvolvimento. Em alguns cortes histológicos observa-se várias secções transversais e longitudinais dos ramos uterinos contendo ovos em diferentes estágios de desenvolvimento tais como mórula e larvas (Figuras 36A). Os ovos apresentam três camadas: a mais externa compreende uma casca delgada corada pela hematoxilina; a camada intermediária é hialina e mais espessa que a casca no espaço interno desenvolve-se o embrião (Figura 36B).

A espermateca é constituída de uma monocamada de células achatadas cuja luz, encontram-se espermátides e espermatozoides (Figuras 35D, 36C e D). O segmento da espermateca mais posterior é denominado de ovoejtor (Figuras 36D e E), cuja periferia contém células musculares e a luz é recoberta por cutícula, a qual desemboca na abertura vulvar que é composta do mesmo modo que o ovoejtor.

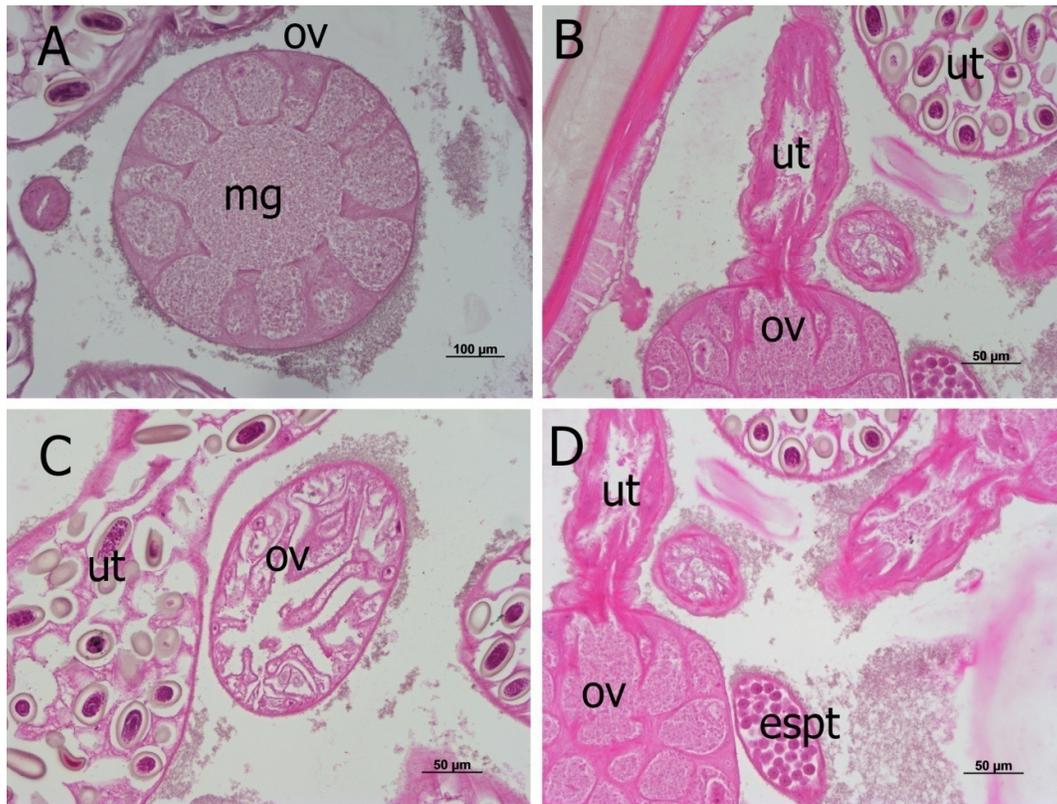


Figura 35. Cortes histológicos transversais corados em HE do tubo genital feminino de *P. galvai*. **A.** Ovário (ov) inicial e massa germinativa (mg). **B.** Folículos ovarioanos e útero. **C.** Útero com maasa ovigera e ovário terminal. **D.** Ovário (ov), útero (ut) e espermateca (espt).

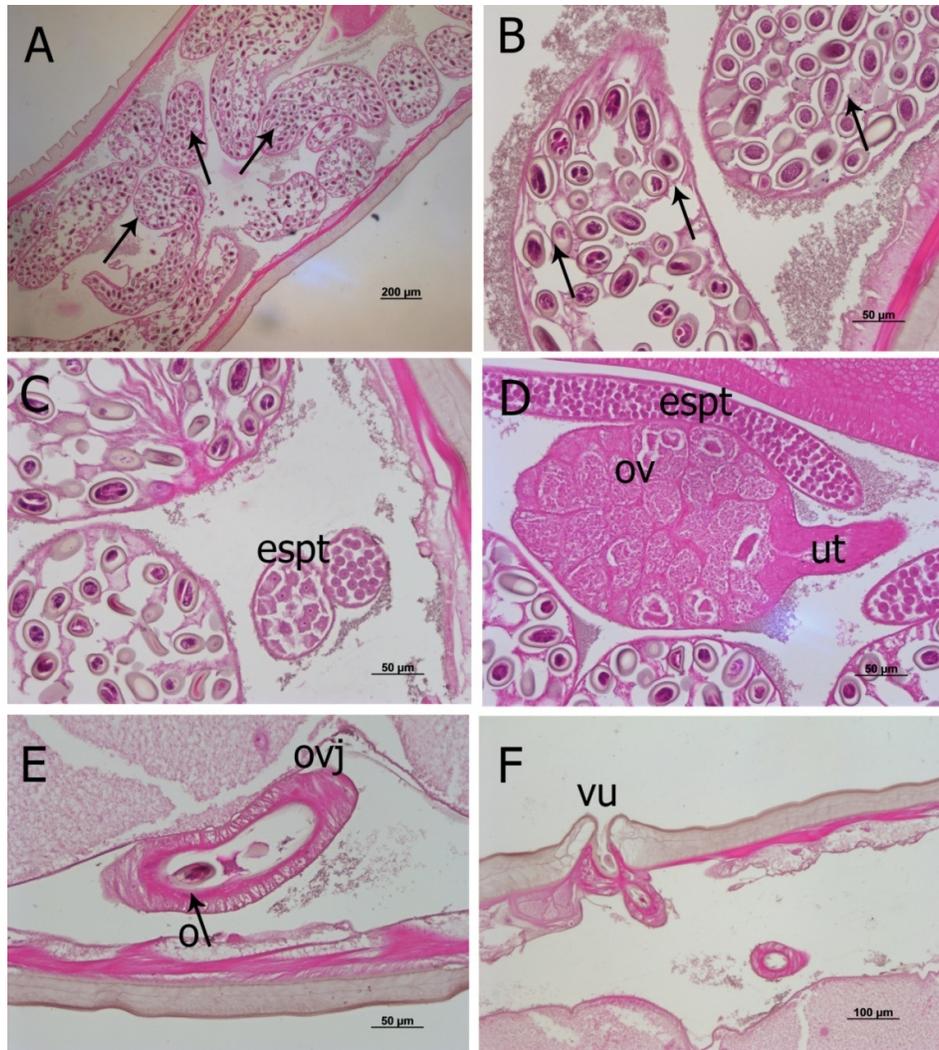


Figura 36. Cortes histológicas transversais corados em HE do tubo genital feminino de *P. galvai*. A. Ramos uterinos. B. Ovos em diferentes estágios de desenvolvimeto. C. Espermateca com sptz em cachos. D. Formação dos ovos nos folículos ovarianos (ov), ramo uterino (ut) e espermateca (espt). E. Ovejeter e ovo (o). F. Vulva (vu).

6. DISCUSSÕES

As espécies do gênero *Physaloptera* se caracterizam por ter uma cutícula que forma o colarete cefálico (cutícula inflada), a presença de dois pseudolábios laterais que contornam a abertura oral, cada um com dois dentes, um deles em formato tripartite na margem interna de cada pseudolábio e um único dente grande triangular na dobra externa. A disposição das papilas caudais, o tamanho e o formato dos espículos nos machos, e os ramos uterinos nas fêmeas são caracteres específicos de *Physaloptera* (Ortlepp, 1922; Skrjabin e Sobolev, 1964; Chabaud, 1975). Estas características nos permitiram incluir *P. galvai* no gênero *Physaloptera*. As principais características da nova espécie incluem machos com espículos desiguais e curtos; o terceiro e quarto pares de papilas pós-cloacal assimétricos; entre o quinto par de papilas existe a presença de uma papila em forma de botão e fêmeas com 4 a 5 ramos uterinos.

Comparando *P. galvai* com as espécies que parasitam os mamíferos na América do Sul, esta pode ser distinguida de *P. bispiculata*, *P. murisbrasiliensis*, *P. calnuensis*, *P. longispicula*, *P. hispida*, *P. torresi* (Syn *turgida torresi*.) parasitos de roedores; *P. turgida* (Syn *T. turgida*.) parasita de marsupial; *P. maxillaris*, *P. anomala*, *P. terdentata*, *P. preaputialis* de carnívoros e *P. dilatata* de primata por terem os espículos mais curtos e o padrão III das papilas caudais enquanto as demais espécies têm os padrões I, II, V, VI, VII e VIII. Além disso, a nova espécie se diferencia de *P. murisbrasiliensis*, *P. hispida*, *P. mirandai*, *P. herthameyare*, *P. turgida*, *P. magnipapilla*, *P. anomala*, *P. semilanceolata*, *P. dilatata* e *P. retusa* por possuírem três papilas sesséis pré-cloacais lineares enquanto as outras apresentam o padrão pré-cloacal triangular para cima ou para baixo. Além disso, *P. galvai* distingue-se das outras espécies de *Physaloptera* porque é a única espécie que apresenta 4 a 5 ramos uterinos.

De acordo com Anderson et al. (2009) os caracteres diagnósticos que diferenciam o gênero *Turgida* Schulz, 1927 de *Physaloptera* Rudolphi, 1819 é que a primeira apresenta um colarete cefálico, espécimes fêmeas com mais de

quatro úteros e infectam mamíferos neotropicais. No entanto, há muitas espécies de *Physaloptera* que apresenta o colarete cefálico e são encontradas parasitando mamíferos neotropicais como *P. clausa*, *P. herthameyerae*, *P. preputialis*, *P. rara* e *P. bispiculata* (Tiekotter, 1981, Torres et al., 2009, Gorgani et al., 2013).

Matey et al., 2001, adicionalmente, apontaram para a presença de vários dentículos no interior da margem interna em *Turgida turgida* e a presença de uma 22^a papila caudal na cauda do macho. Na verdade, a presença de dentículos nas margens interiores são mostradas em *P. clausa* (Gorgani et al., 2013) como também verificou-se a presença da 22^a papila em *P. tupinambae* e *P. retusa* de réptil, *P. galvaei* e *P. bispiculata* de roedores, *P. mirandai* de marsupiais. Alguns autores consideram a presença de uma 22^a papila em *Physaloptera*, embora em algumas trabalhos de descrição originai tenham sido retratadas, mas não consideradas como uma papila. Por outro lado, *P. binae* se destaca como a única espécie do gênero que exhibi dentes externos no formato de 4 espinhos que são organizados em um padrão em forma de cruz e 23 papilas caudais (Pereira et al., 2014).

Conforme observado por Morgan (1947) o número de úteros constituem uma dificuldade taxonômica, uma vez que os Spirurida tendem a polidelfia. A espécie *P. galvaei* compartilha os caracteres com *Physaloptera* e *Turgida* como colarete na região cefálica, 22 papilas caudais e numerosos ramos uterinos. Esta característica também é observada em *P. dilatata*, que apresenta 11-15 ramos uterinos e infectam primatas da América do Sul, e em *P. capensis*, que apresenta 14 ramos uterinos e infecta roedores na África.

Estudos morfológicos utilizando MEV de *Physaloptera* demonstram a presença de pequenos dentes na borda lateral externa de cada lado dos lábios pseudolabio. *P. rara* Hall e Wigdor, 1818 (Naem & Asadi), *P. clausa* Rudolphi de 1819 (Gorgani et al., 2013) e *P. herthameyerae*, Torres et al., 2009 mostraram apenas um pequeno dente na borda lateral externa de cada pseudolabia. Enquanto que *P. bispiculata* Vaz e Pereira, 1935 (Mafra & Lanfredi, 1998) e *P. galvaei* mostraram dois pequenos dentes nas bordas laterais externa de cada pseudolabia.

A filogenia da família Physaloperidae corrobora a taxonomia morfológica de Anderson (2009), uma vez que a antiga subfamília Proleptinae é um grupo irmão da subfamília Physalopterinae e demonstra o parafiletismo da superfamília Physalopteroidea.

Considerando as análises filogenéticas dentro da ordem Spirurida, *Pterigodermatites jagerskioldi* da superfamília Rictularioidea formou um ramo parafiletico com Physalopteroidea, Embora, a superfamília Gnathostomatoidea pertença à ordem Spirurida forma um grupo irmão com Ascarida, o que corrobora os achados de Nadler et al., 2007, Wijová et al. 2006 e Blaxter, 2003.

Além disso, as relações dentro do gênero *Physaloptera* revelaram uma politomia com fraca resolução para espécies representativas. Isto sugere uma diversificação quase simultânea dos physalopterídeos e está de acordo com a hipótese da filogenia estrela. Este comportamento também pode ser observado nas famílias de roedores (Echymidae) como demonstrado por Lara et al., 1996 e Leite e Patton, 2002. Tal como o gênero *Physaloptera* pareça ter tido uma rápida radiação infectando as grandes classes de hospedeiros na América do Sul. Por outro lado, a espécie *P. thalacomys* parasita de marsupiais australianos *Macrotis leucura* assim como *Physaloptera* sp. SAN2007 parasita de carnívoro norte americano *Mephitis mephitis* provavelmente tenham derivado de uma linhagem mais antiga ou diversificou antes, uma vez que estes são basais na topologia da árvore para o gênero.

A utilização de técnicas moleculares para elucidar a taxonomia da ordem Spirurida tem sido amplamente utilizada (Nadler et al, 2007; Park et al., 2011, Moravec et al., 2014), no entanto, para o gênero *Physaloptera* que possui mais de uma centena de espécies pouco ainda se sabe sobre a sua filogenia. Neste estudo, mostramos que o gênero *Physaloptera* tem uma recente e simultânea diversificação, com captura de diferentes classes de hospedeiros. Além disso, as diferenças de caracteres morfológicos intraespecíficos tais como; o número de ramos uterinos, o padrão de arranjo das papilas caudais, tamanho e forma dos espículos são consistentes para identificação. Como demonstrado no presente estudo, mais análises, incluindo a grande diversidade de *Physaloptera* são necessárias para elucidar e esclarecer a história evolutiva dos physalopterídeos.

Em contrapartida, os estudos histológicos deste grupo de nematódeos são escassos e dados histológicos podem contribuir para o conhecimento da biologia do parasito, da patologia causada em virtude da infecção. A estrutura da parede do corpo de *P. galvaei* não difere da organização estrutural das paredes que compõe a maioria dos nematódeos estudados (Chitwood & Chitwood, 1974; Rahemo & Hussain 2009).

O encontro dos gametas masculinos no corpo da fêmea foi um achado inédito e que parece ter a função de assegurar a fecundidade da fêmea por mais tempo, o que pode ser uma estratégia adaptativa da espécie. Na espécie estudada não foi possível perceber nenhuma diferenciação dos cortes histológicos do receptáculo seminal. O qual parece ser o oviducto propriamente dito. Segundo Travassos (1950), a extremidade do útero, que se continua no oviducto, apresenta-se como uma dilatação que serve para recolher os espermatozoides, os quais aguardam os óvulos para então fecundá-los em um local denominado pelo autor de vesícula seminal feminina ou *espermateca*.

Travassos (1950) também descreve que nas paredes do interior do útero existem vilosidades sobretudo na porção distal; estas vilosidades servem para proteger os espermatozoides, que se movimentam entre elas sem que sejam arrastados pela corrente descendente de ovos. Porém, não foi observado qualquer tipo de projeção ou vilosidades na porção distal do útero de *P. galvaei*, onde foram observados os espermatozoides. Diferentemente, projeções celulares só estavam presente na porção proximal e medial dos úteros. Supomos que estas células sejam secretoras e estes prolongamentos auxiliem no contato dos ovos em desenvolvimento com seu produto de secreção. Este produto de secreção pode ser importante para proteger os ovos do ressecamento e permanecerem viáveis por mais tempo no ambiente até serem ingeridos por hospedeiros intermediários. Outro aspecto observado foram as fases iniciais do desenvolvimento embrionário ainda nas ramificações uterinas onde puderam ser distinguidas as formas moruladas e larviformes.

Nos machos, a organização das estruturas do tubo genital é semelhante, conforme já descrito em outros nematódeos (Travassos 1950). Chitwood & Chitwood (1950) na microscopia convencional conseguiu visualizar as duas camadas musculares intercaladas por cutículas.

Goldschmidt (1903) relatou que a estrutura da papila genital de *Ascaris* consiste de áreas elevadas de uma camada de cutícula delgada perfurada por canal contendo de uma a três fibras nervosas as quais estão rodeadas por uma célula de sustentação. Nas preparações do presente estudo, não foi possível a observação dessa célula de sustentação envolvida pela cutícula. A não detecção se deu em função da técnica utilizada neste estudo.

7. CONCLUSÕES

► Uma nova espécie de nematoídeo *P. galvai* foi descrita parasitando *Cerradomys subflavus* baseado em suas características morfológicas utilizando ML e MEV.

► A utilização de hospedeiros vertebrados como critério taxonômico deve ser reavaliado.

► O gênero *Physaloptera* apresenta uma politomia, sugerindo uma rápida e simultânea diversificação das espécies do parasito em seus hospedeiros definitivos.

► Os aspectos histológicos da espécie *P. galvai* contribuiu para o conhecimento da biologia deste grupo.

► A combinação dos métodos morfológicos, moleculares e histológicos apresentaram resultados satisfatórios para descrição de uma nova espécie e uma melhor compreensão das espécies do gênero *Physaloptera*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albuquerque S, Ávila RW, Bernarde PS. Occurrence of helminths in lizards (Reptilia: Squamata) at lower Moa River Forest, Cruzeiro do Sul, Acre, Brazil. *Comparative Parasitology* 2012; 79: 64-67.
2. Anderson RC, Chaubaud AG, Willmott S. *CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates: Archival Volume*. CABI North American Office, Cambridge, USA, 2009: 1- 463p.
3. Barton MA, McEwan DR. Spirurid nematodes in dogs and cats from central Australia. *Australian Veterinary Journal* 1993, 70: 270.
4. Bhadury P, Austen MC, Bilton DT, Lamshead PJD, Rogers AD, Smerdon GR. Exploitation of archived marine nematodes — a hot lysis DNA extraction protocol for molecular studies. *Zoologica Scripta* 2007, 36:93–98.
5. Baylis, H.A. Helminths from the American cotton rat (*Sigmondon hispidus*). *Ann. Mag. Nat. Hist.* 1945; ser. 11, vol. 12, pp.189-195.
6. Blaxter ML. Nematoda: Genes, Genomes and the Evolution of Parasitism. *Advances in Parasitology* 2003; 54: 101–195.
7. Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu, LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JP, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 1998; 392: 71-75.
8. Bongers T, Bongers M. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology* 1988, 10: 239-251.
9. Bueno-Silva M. Molecular genetics and animal systematics: A brief history, contributions and challenges. *Estud. Biol., Ambiente Divers.* 2012; 34(83), 157-163
10. Chaubaud AG. Keys to genera of the Order Spirurida. In *CHI Keys to the nematode parasites of vertebrates*. Commonweal. Edited by Anderson RC, Chaubaud AG, Willmott S. UK; 1975: 1-27.
11. Chitwood BG & MB Chitwood MB 1933. The histological anatomy of *Cephalobellus papilliger* Cobb, 1920. *Z. Zelforsch.* 19: 309-355.

12. Cracraft J. Species as Entities of Biological Theory. *Philosophy of Biology* 1989; 31-52.
13. Cristofaro R, Guimarães JF, Oliveira Rodrigues H. Algunos nematódeos de *Tropidurus torquatus* (Wied) e *Ameiva ameiva* (L).-Fauna helmintológica de Salvador, Bahía. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro* 1976; 18: 65-70.
14. Dayrat B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 2005; 85: 407-415.
15. De Ley P, Blaxter ML: Systematic position and phylogeny. In *The Biology of Nematodes*. Edited by: Lee BL. New York: Taylor 2002:1-30.
16. De Ley P, Blaxter ML: A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. In *Nematology Monographs and Perspectives 2*. Edited by: Cook R, Hunt DJ. Leiden: E.J. Brill Publisher; 2004:633-653.
17. De Ley P, De Ley IT, Morris K, Abebe E, Mundo-Ocampo M, Yoder M, Heras J, Waumann D, Rocha-Olivares A, Burr AHJ, Baldwin JG, Thomas WK. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Physiological Transactions of the Royal Society B.*, 2005; 360: 1945-1958.
18. De Queiroz K, Donoghue MJ. Phylogenetic systematics or Nelson's version of cladistics. *Cladistics* 1990; 6: 61-75.
19. Desportes C. Sur un nouveau Physaloptere de la Bondree *Pernis apivorus* L. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 1947; 21: 257-262.
20. Diesing, K. 1861. Revision der Nematoden. *Sii. AKad. Wissench.* 42: 595-736.
21. Gibbons LM. 2010. CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates: Supplementary Volume. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K., 416p.
22. Gomes AP, Olifiers N, Santos MM, Simões RO, Maldonado AJ. New records of three species of nematodes in *Cerdocyon thous* from the Brazilian Pantanal wetlands. *J. Vet. Parasitol.* 2015; 24 (3): 324-330.

23. Goldschmidt R 1903. Die Sinnesorgane von *Ascaris*. Zool. Jb. (Anat. Ontog. Tiere) 18: 1-57.
24. Gonçalves AQ, Bóia MN, Coura JR, Pinto RM. New records for helminths of hystricognath rodents from the middle and high Rio Negro microregion, State of Amazonas, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 2006; 23 (3): 716-726.
25. Gorgani T, Naem S, Farshid AA, Otranto D. Scanning electron microscopy observations of the hedgehog stomach worm, *Physaloptera clausa* (Spirurida: Physalopteridae). *Parasit Vectors* 2013, 6:87.
26. Gray JB, Anderson RC 1982. Development of *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) in the common field cricket (*Acheta pennsylvanicus* Burmeister). *Can J Zool*, 60:2134–2142.
27. Hennig W. 1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
28. Hill WC. *Physaloptera terrapenis*, a New nematode from a Tortoise. *American Microscopical Society* 1941; 60(1): 59-69.
29. Hodda M. Phylum Nematoda. *Zootaxa* 2007; 1668: 1-776.(Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy).
30. Huggins EJ. A survey of the helminths and ectoparasites of roof and cotton rats in Brazos Country, Texas. *Amer. Midland Nat.* 1951.; 46: 230-244.
31. Inglis W G. New marine nematodes from off the coast of South Africa. *Bullet Bri. Museum Natural History (Zoology)* 1983, 10 (9): 529-552.
32. Kinsella J.M. Comparison of helminth parasites of the cotton rat, *Sigmodon hispidus*, from several habitats in Florida. *American Museum Novitates* 1974; 2540:1–12.
33. Labarthe N, Serrão ML, Ferreira AM, Almeida NKO, Guerrero J. A survey of gastrointestinal helminths in cats of the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2004; 123: 133-139.

34. Lara MC, Patton JL, da Silva MN: The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Mol Phylogenet Evol* 1996, 5:403–413.

35. Leite YLR, Patton JL. Evolution of South American spiny rats (Rodentia: Echimyidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2002; 25: 455-464.

36. Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA. Bayesian Phylogeography finds its roots. *Plos Computational Biology* 2009; 5(9): 1-16.

Lemos & D'Andrea, 2006

37. Lent H, Freitas JFT 1937. Nova *Physaloptera* parasita de marsupial (Nematoda:Spiruroidea). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 32: 221-227.

38. Li HC. Report on a collection of parasitic nematodes, mainly from North China part II. Spiruroidea *Transactions of the American Microscopical Society* 1934; 53 (2): 174-195.

39. Ling-sheng Y. On *Physaloptera lumsdeni* n. sp. From a Bush-baby in Tanganyika, with a Note on *Abbreviata caucasica*. *Journal of Helminthology* 1957; XXXI (1/2): 29-32.

40. Torres ELJ, Maldonado A, Lanfredi RM. Spirurids from *Gracilinanus agilis* (Marsupialia: Didelphidae) in Brazilian Pantanal wetlands with a new species of *Physaloptera* (Nematoda: Spirurida). *Vet Parasitol.* 2009; 163:87–92.

41. Mafra ACAT, Lanfredi RM. Reevaluation of *Physaloptera bispiculata* (Nematoda:Spiruroidea) by light and Scanning Electron Microscopy. *The Journal of Parasitology* 1998; 84(3):582-588.

42. Maggenti AR 1963. In "The Lower Metazoa" (E.C. Dougherty, ed), Univ. of California Press, Berkeley, California, pp. 273-282.

43. Maggenti AR 1983. Nematode higher classification as influenced by species and families concept. London, pp 25-40.

44. Malhotra A, Thorpe R S. A phylogeny of four mitochondrial gene region suggests a revised taxonomy for Asian pitvipers (*Trimeresurus* and *Ovophis*). *Mol. Phylogen. Evol.* 2004; 32, 83 – 100.
45. Matey VE, Kuperman BI, Kinsella J. Scanning Electron Microscopy of *Turgida turgida* (Nematoda: Spiruroidea), parasite of the Virginia Opossum, *Didelphis virginiana*, From Southern California. *Journal Parasitology* 2001; 87 (5) 1199-1202.
46. Meldal BHM, Debenham NJ, De Ley P, De Ley IT, Vanfleteren JR, Vierstraete AR, Bert W, Borgonie G, Moens T, Tyler PA, Austen MC, Blaxter ML, Rogers AD, Lamshead PJD. An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2007; 42 (3): 622-636.
47. Moravec F. Some aspects of the taxonomy and biology of dracunculoid nematodes parasitic in fishes: a review. *Folia Parasitol.* 2004; 51: 1-13.
48. Moravec F. Some aspects of the taxonomy and biology of adult spirurine nematodes parasitic in fishes: a review. *Folia Parasitol.* 2007; 54: 239-257.
49. Morgan BB. Additional notes on North American Physalopterinae. (Nematoda). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 1941; 8: 63-64.
50. Morgan BB. The Physalopterinae (Nematoda) of North American vertebrates. *Sum. Doctoral Diss. Univ. Wis.* 1942; 88-91.
51. Morgan BB. The Physaloptera (Nematoda) of rodents. *The Wasmann Collector* 1943; 5: 99-107.
52. Morgan BB. Host-parasite relationships and geographical distribution of the *Physaloptera* (Nematode). *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters* 1947; 38: 273-292.
53. Morgan BB. *Physaloptera buteonis n. sp.* A Nematodes from the Eastern Red-Tailed Hawk. *American Microscopical Society* 1948; 67 (2): 183-186.

54. Mutani A, Rhynd K, Brown G. A preliminary investigation on the gastrointestinal helminthes of the Barbados green monkey, *Cercopithecus aethiops sabaesus*. Rev.Inst.Med.trop. S. Paulo 2003; 45 (4): 193-195.
55. Nadler SA, Carreno RA, 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* 2007, 134(Pt 10):1421–1442.
56. Naem S, Asadi R. Ultrastructural characterization of male and female *Physaloptera rara* (Spirurida: Physalopteridae): feline stomach worms. Parasitol. Res. 2013;
57. Ortlepp RJ. The Nematode Genus *Physaloptera* Rudolphi, 1819. *Proc Zool Soc London* 1922, 92:999–1107.
58. Parihar A, Nama HS. *Physaloptera funambuli* sp. n. (Nematoda, Physalopteridae) from *Funambulus pennanti*. Current Science Bangalore 1978; 47: 832-834.
59. Park J-K, Sultana T, Lee S-H, Kang S, Kim HK, Min G-S, Eom KS, Nadler SA. Monophyly of clade III nematodes is not supported by phylogenetic analysis of complete mitochondrial genome sequences. *BMC Genomics* 2011, 12:392.
60. Pereira FB, Alves PV, Rocha BM, Lima SS, Luque JL. A new *Physaloptera* (Nematoda: Physalopteridae) parasite of *Tupinambis merianae* (Squamata: Teiidae) from southeastern Brazil. J. Parasitol. 2012; 98 (6): 1227-1235.
61. Pereira FB, Alves PV, Rocha BM, Lima SS, Luque JL. *Physaloptera binae* n. sp. (Nematoda: Physalopteridae) Parasitic in *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae), with a Key to *Physaloptera* Species Parasitizing Reptiles from Brazil. Journal of Parasitology 2014; 100(2):221-227. 2014.
62. Prosser SWJ, Velarde-aguilar MG, Le-onregagnon V, Paul DN, Hebert PDNH. Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. Mol. Eco. Resources 2013; 13: 1108–1115.
63. Quadros RM, Marques SMT, Moura AB, Antonelli M. First report of the nematode *Physaloptera praeputialis* parasitizing a jaguarandi. Neotropical Biology and Conservation 2014; 9(3):186-189.

64. Quentin JC. *Physaloptera Longispicula* nouvelle espèce de spiruride parasite de *Cercomys cunicularius Cuvier*. Bulletin du muséum national d'histoire naturelle 2^a série-1968 (1969); 40 (5):1043-1046.
65. Ramallo G, Díaz F. *Physaloptera lutzi* (Nematoda: Physalopteridae) parásito de *Liolaemus* (Iguania: Tropiduridae) del nordeste argentino. Bol. Chil. Parasitol. 1998; 53:19-23.
66. Rahemo ZIF, Hussain SS. Histological study on the body wall of *Ascaridia galli* (Nematoda). Journal of Entomology and Nematology 2009; 1(6): 074-082.
67. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP, Mark P van der, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol* 2012, 61:539–542.
68. Santos JLC, Magalhães NB, Santos HA, Ribeiro RR, Guimarães MP.. Parasites of domestic and wild canids in the region of Serra do Cipó National Park, Brazil.
69. Schell SC. A new species of *Physaloptera* (Nematoda: Spiruroidea) from the Cotton Rat. The Journal of parasitology. 1950; 36(5): 423-425.
70. Schell SC. Studies on the life cycle of *Physaloptera hispida* Schell (Nematoda: Spiruroidea) a parasite of the cotton rat (*Sigmodon hispidus littoralis* Chapman). Journal of parasitology. 1952; 462-472.
71. Seberg O, Humphries CJ, Knapp S, Stevenson DW, Petersen G, Scharff N, Andersen NM. Shortcuts in systematic? A commentary on DNA-based taxonomy. Trends Ecol. Evol. 2003; 18:63-65.
72. Seurat G. Sur quelques nematodes de l'estomac des murides et les reactions qu'ils provoquent. Bulletin de la Société d' Histoire Naturelle d' Afrique du Nord 1937; 28: 428-431.
73. Skrjabin KI, Sobolev AA. Osnovi Nematodologi. *Public Acad Sc USSR Moscow* 1964, 12:1–334.

74. Smyth JD 1994. Introduction to animal parasitology. 3^a ed. p.401?? ver citação de livro
75. Stunkard HW. Life histories and systematics of parasitic worms. Syst. Zool. 1953; 2 (1): 7-18.
76. Sutton CA. Contribution to the knowledge of Argentina's parasitological fauna XVII. Spirurida (Nematoda) from Neotropical Cricetidae: *Physaloptera calnuensis* n. sp. and *Protospirura numidica* criceticola Quentin, Karimi and Rodriguez de Almeida. *Bull du Muséum Natl d'Histoire Nat Sect A Zool Biol Ecol Anim* 1989; 11:61–67.
77. Travassos L. Contribuições para a fauna helmintológica brasileira. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1920; 73-94.
78. Travassos L. Contribuição ao conhecimento da phylogenia dos Oxyuroidea. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1937; 32 (4): 607-613.
79. Travassos L. Introdução ao Estudo da Helminologia. Revista Brasileira De Biologia 1950; 32-74.
80. Torres E JL, Maldonado AJ, LANFREDI RM. Spirurids from *Gracilianus agilis* (Marsupialis:Didelphidae) in Brazilian Pantanal wetlands with a new species of *Physaloptera* (Nematoda: Spirurida). *Veterinary Parasitology* 2009; 163: 87:92.
81. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:4673-4680.
82. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer AO, FREITAS-NETO AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 37 p.
83. Tiekotter K.: Observations of the head and tail regions of male *Physaloptera praeputialis* von Linstow, 1889, and *Physaloptera rara* Hall and Wigdor, 1918, using scanning electron microscopy. *roceedings - Helminthol Soc Washingt* 1981, 48:130–136.

84. Urquhart GM, Armour J, Dunn AM, Jennings FW. *Parasitologia veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
85. Vaz Z, Pereira C. Some New Brazilian Nematodes. *American Microscopical Society* 1935; 54(1): 36-40.
86. Venciana M, Chaisiri K, Morand S, Miquel J, Ribas A. New biogeographical and morphological information on *Physaloptera ngoci* Le-Van-Hoa, 1961 (Nematoda: Physalopteridae) in South-east Asian rodents. *Parasite* 2013; 20: 1-5.
87. Vicente JJ, Rodrigues H de O, Gomes DC, Pinto RM. Nematóides do Brasil. Parte V: nematóides de mamíferos. *Rev Bras Zool* 1997, 14(supl. 1):1–452.
88. Walton A.C. *Physaloptera polydentata* n. sp. . *The Journal of parasitology* 1932; 18(4): 288-290.
89. Wijova M, Moravec F, Horák A , Lukes J. Evolutionary relationships of Spirurina (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida) with special emphasis on dracunculoid nematodes inferred from SSU rRNA gene sequences *International Journal for Parasitology* 2006; 36: 1067–1075
90. Wahlberg N, Brower AVZ., Sören N. Phylogenetic relationships and historical biogeography of tribes and genera in the subfamily Nymphalinae (Lepidoptera: Nymphalidae. *Biological Journal of the Linnean Society* 2005; 86: 227–251.
91. Wiens JJ, Penkrot TA. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (Sceloporus). *Syst. Biol.* 2002; 51(1):69–91.
92. Wijová M, Moravec F, Horák A, Modrý D, Lukeš J. Phylogenetic position of *Dracunculus medinensis* and some related nematodes inferred from 18S rRNA. *Parasitol Res* 2005, 96:133–135.
93. Yamaguti S. *Systema helminthum*. The nematodes of vertebrates. Interscience Publishers, Inc., New York, 1961,261p.?

9. APÊNDICES E/OU ANEXOS

9.1. APÊNDICE A - ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia geral externa e interna dos nematóides. A. Fêmea. B. Macho. (Fonte: Hirschmann, 1960).5

Figura 2. Secção transversal mostrando morfologia geral dos nematoideos: cavidade do corpo triblástico, pseudocelomático, protostomado com simetria bilateral dos nematóides e camadas da cutícula. (Fonte: Smyth, 1994).....6

Figura 3. Ciclo biológico das espécies do gênero *Physaloptera* com alguns representantes de hospedeiros (Fonte: São Luiz, 2015)10

Figura 4. Regiões biogeográficas de captura dos hospedeiros.....23

Figura 5. A. Helmintos coletados em solução salina. B. Frascos com fixadores e rótulo de identificação.24

Figura 6. Representação esquemática da vista ventral das bolsas dos machos de *Physaloptera* spp. mostrando variações nos arranjos dos pares de papilas sésseis pré e pós cloacais(3º, 4º e 5º). Padrão I: pré-cloacais com formato triangular para cima ou linear, 3º, 4º e 5º pares eqüidistantes sem inclinação; Padrão II: pré-cloacais com formato triangular para baixo, 3º, 4º e 5º pares eqüidistantes com inclinação para a esquerda no 3º par; Padrão III: pré-cloacais lineares, 3º 4º e 5º pares equidistantes com inclinação para a esquerda par 3º e 4º; Padrão IV: pré-cloacais com formato triangular para baixo, 3º, 4º e 5º pares equidistantes com inclinação para a direita dos 3º e 4º pares; Padrão V: pré-cloacais com formato linear, 3º e 4º pares agrupados sem inclinação e 5º par no final da cauda sem inclinação. Padrão VI: pré-cloacais com formato triangular para baixo e para cima, 3º par com inclinação esquerda, 4º e 5º pares agrupados na extremidade da cauda sem inclinação; Padrão VII: pré-cloacais com formato triangular para baixo, 3º par sem inclinação e 4º e 5º pares agrupadas na extremidade da cauda sem inclinação. Padrão VIII: pré-cloacais com formato triangular para baixo ou linear, 3º par ausente, 4º e 5º pares equidistantes sem inclinação (Fonte: São Luiz, 2015).....37

Figuras 7-11. *P. galvaoi* n. sp. 6. Extremidade anterior da fêmea mostrando esôfago muscular e glandular, anel nervoso, abertura vulvar e junção esôfago-intestinal. Barra de escala: 100 µm. 7. Extremidade anterior do macho

mostrando dente tripartite, papilas cefálicas e colarete cefálico. Barra de escala: 100 µm. 8. Úteros com cinco ramos uterinos. Barra de escala: 500 µm. 9. Extremidade posterior do macho com 4 pares de papilas pedunculadas e treze papilas sésseis, 1 elevação tipo papila e abertura cloacal. Barra de escala: 100 µm. 10. Espículos esquerdo (Ee) e direito (Ed). Barra de escala: 100 µm.41

Figuras 12-17. Fotografias em microscopia de luz do holótipo *P. galvaoi* n. sp.

18. Extremidade anterior do macho, vista lateral. Barra de escala: 100µm. 19. (A) Vista ventral da extremidade posterior do macho mostrando papilas pedunculadas e papilas sésseis. (B) Detalhe do 5º par de papilas sésseis como um botão. Barra de escala: 100µm. 20. Vista ventral das papilas pré-cloacais. Barra de escala: 500µm. 21. Vista ventral das papilas pós-cloacais. Barra de escala: 500µm. 22. Útero com os cinco ramos uterinos. Barra de escala: 100µm. 23. Extremidade posterior da fêmea mostrando ânus. Barra de escala: 100µm.42

Figuras 18-21. Microscopia eletrônica de varredura de *P. galvaoi* n. sp.

18. Extremidade anterior da fêmea mostrando lábios com duas papilas cefálicas (P), dentes tripartites e externos (cabeça de seta), região cervical (cc), anfídios (a) e áreas porosas (*). 19. Detalhes mostrando dois pares de pequenos dentes laterais em cada pseudolábio (setas), papilas cefálicas (p) e áreas porosas (*). 20. Detalhe da papila cefálica (p) e do pequeno dente (seta). 21. Detalhe dos dentes tripartites (cabeça de seta) e pequeno dente lateral (setas), pequeno orifício (seta fina) e papilas (P).....43

Figuras 22-24. Microscopia eletrônica de varredura de *P. galvaoi* n. sp.

Microscopia eletrônica de varredura de *P. galvaoi* n. sp. 22. Poro excretor (Ep). 23. Detalhe do poro excretor (Ep) . 24. Extremidade posterior da fêmea mostrando abertura anal (cabeça de seta) e fasmídios (seta).....44

Figuras 25-27. Microscopia eletrônica de varredura de *P. galvaoi* n. sp.

25. Vista dorsal da cauda do macho, mostrando estriações cuticulares na região central (*) e uma leve expansão lateral na cauda. 26. Extremidade posterior do macho vista ventral, mostrando duas dobras lateroventral (seta dupla), quatro pares de papilas pedunculadas externo laterais (pp). 27. Vista ventral da cauda

do macho detalhada: abertura cloacal, papilas pré e pós cloacais (ss), quatro pares de papilas pedunculadas (pp) e ornamentação da cutícula.....	45
Figura 28. Reconstrução filogenética através de Inferência Bayesiana das espécies sequenciadas usando o gene 18S rRNA. Valores de probabilidades posteriores bayesiana estão nos nós da árvore.....	52
Figura 29. Reconstrução filogenética através de Inferência Bayesiana das espécies sequenciadas usando o gene COI. Valores de probabilidades posteriores bayesiana estão nos nós da árvore.....	54
Figura 30. Cortes histológicos transversais corados em HE de <i>P. galvaii</i> . A. Camadas da cutícula (parede do corpo): cortéx (ce), matrix (cm) e camada mais interna (ci). B. Hipoderme. C. Cordões laterais (cl). D. Material coagulado entre os órgãos (seta).	57
Figura 31. Cortes histológicos transversais corados em HE de <i>P. galvaii</i> . A. Esôfago muscular. B. Região de transição (seta) entre em e eg. C. Vista longitudinal do eg estrelado. D. Detalhes da composição celular do eg.....	58
Figura 32. Cortes histológicos transversais corados em HE de <i>P. galvaii</i> . A. Células intestinais (*), muco (mu) e microvilosidades (mc). B. Região posterior do corpo, parte terminal do intestino (*).....	58
Figura 33. Cortes histológicos transversais corados em HE de <i>P. galvaii</i> . A. Células intestinais (*), muco (mu) e microvilosidades (mc). B. Região posterior do corpo, parte terminal do intestino (*).....	60
Figura 34. Cortes histológicos transversais corados em HE do tubo genital masculino de <i>P. galvaii</i> . A. Multiplicação das espermatídes (epd). B. Espermatozóides (sptz). C. Vaso deferente (vd) com espermatozóides maduros (sptz). D. Espículos (es). E. Papila ventral. F. Papilas pedunculadas (pa) e espículos (es).	61
Figura 35. Cortes histológicos transversais corados em HE do tubo genital feminino de <i>P. galvaii</i> . A. Ovário (ov) inicial e massa germinativa (mg). B. Folículos ovarioanos e útero. C. Útero com maasa ovigera e ovário terminal. D. Ovário (ov), útero (ut) e espermateca (espt).	63

Figura 36. Cortes histológicos transversais corados em HE do tubo genital feminino de *P. galvaoi*. A. Ramos uterinos. B. Ovos em diferentes estágios de desenvolvimeto. C. Espermateca com sptz em cachos. D. Formação dos ovos nos folículos ovarianos (ov), ramo uterino (ut) e espermateca (espt). E. Ovejeter e ovo (o). F. Vulva (vu).6

9.2. APÊNDICE B - LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fixadores, composição química e tipos de análises.	25
Tabela 2. Lista de iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento genes rRNA 18S para todos táxons, discriminando a sequência dos iniciadores senso (F de <i>foward</i>) e anti senso (R de <i>reverse</i>).	29
Tabela 3. Ciclagem utilizada para as reações de sequenciamento do gene rRNA 18S para todos táxons.	29
Tabela 4. Lista do coquetel de iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene <i>citocromo C oxidase</i> para todos táxons, discriminando a sequência dos iniciadores senso (F de <i>foward</i>) e anti senso (R de <i>reverse</i>).	30
Tabela 5. Ciclagem utilizada para as reações de sequenciamento do gene citocromo C oxidase para todos táxons.	31
Tabela 6. Morfometria, hospedeiros e localidades de machos <i>Physaloptera</i> spp. parasitos de roedores nas Américas.	36
Tabela 7. Morfometria, hospedeiros e localidades de fêmeas <i>Physaloptera</i> spp. parasitos de roedores nas Américas.	39
Tabela 8. Principais características taxonômicas de machos e fêmeas da espécie <i>Physaloptera</i> em diferentes hospedeiros na América do Sul.....	46/ 47
Tabela 9. Números de acesso de sequências recuperadas do GenBank e hospedeiros de parasitas.	49/ 50
Tabela 10. Número de acesso (ID) das espécimes sequenciadas e depositadas no GenBank coletadas no território nacional.	51
Tabela 11. Valores da distância- <i>p</i> (% Kimura-2-parâmetros) entre as sequências de <i>Physaloptera</i> baseados no gene 18S rRNA.	53
Tabela 12. Valores da distância- <i>p</i> (% Kimura-2-parâmetros) entre as sequências de <i>Physaloptera</i> baseados no gene COI.....	55

9.3. APÊNDICE C - LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ML ► Microscopia ca de luz

MEV ► Microscopia eletrônica de varredura

IOC ► Instituto Oswaldo Cruz

EM ► Esôfago muscular

EG ► Esôfago glandular

MT-CO1 ► Citocromo C oxidase subunidade 1

18S rRNA ► Menor subunidade do gene nuclear RNA rinosomal