

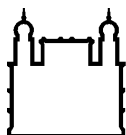
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE HELMINTOS
DE *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (DIDELPHIMORPHIA,
DIDELPHIDAE), EM TRÊS AMBIENTES DISTINTOS DA MATA
ATLÂNTICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

SOCRATES FRAGA DA COSTA NETO

Rio de Janeiro
Setembro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

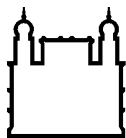
Socrates Fraga da Costa Neto

COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE HELMINTOS DE *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (DIDELPHIMORPHIA, DIDELPHIDAE), EM TRÊS AMBIENTES DISTINTOS DA MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor

Orientador (es): Profa. Dra. Rosana Gentile
Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTOR: SOCRATES FRAGA DA COSTA NETO

***COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE HELMINTOS DE
Didelphis aurita WIED-NEUWIED, 1826 (DIDELPHIMORPHIA,
DIDELPHIDAE), EM TRÊS AMBIENTES DISTINTOS DA MATA ATLÂNTICA
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO***

ORIENTADOR (ES): **Profa. Dra. Rosana Gentile**
 Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

EXAMINADORES:

Prof. Dr. José Luis Passos Cordeiro (Fiocruz/RJ) - Presidente
Prof. Dr. José Luis Fernando Luque Alejos (UFRRJ)
Prof. Dr. Walter dos Santos Lima (UFMG)
Profa. Dra. Simone Chincz Cohen (Fiocruz/RJ) - Suplente
Profa. Dra. Claudia Portes Santos Silva (Fiocruz/RJ) – Suplente - Revisora

Rio de Janeiro, 11 setembro de 2017.

Neto, Socrates Fraga da Costa.

COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE HELMINTOS DE *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (DIDELPHIMORPHIA, DIDELPHIDAE), EM TRÊS AMBIENTES DISTINTOS DA MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO / Socrates Fraga da Costa Neto. - Rio de Janeiro, 2017.

230 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2017.

Orientador: Rosana Gentile.

Co-orientador: Arnaldo Maldonado Júnior.

Bibliografia: f. 136-164

1. Marsupiais. 2. Metacomunidade . 3. Nematoda . 4. Gambá. 5. Trematoda. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho aos meus pais José Wandique Fraga da Costa e Maria Lúcia Grangeiro da Costa, aos meus irmãos Tamara Fraga e Renato Fraga, a minha esposa Danielle Seice, ao meu filho Breno Fraga e a minha avó Rosa Rodrigues em memória, que juntos deram-me apoio e força para concretizar mais este objetivo.

AGRADECIMENTOS

A minha amiga Profa. Dra. Rosana Gentile, Pesquisadora do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela valiosa orientação dada para realização desta Tese, seriedade, dedicação, compreensão, exemplo de profissionalismo, estímulos, crédito, além dos conselhos e sua maravilhosa amizade.

Ao amigo Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, Pesquisador e Chefe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela orientação, por estar sempre pronto a tirar minhas dúvidas, dando conselhos e sendo amigo. Agradeço por ter me ensinado e compartilhado um pouco do seu vasto conhecimento científico. Sinto muito orgulho de tê-lo como amigo.

Ao meu amigo Prof. Dr. Paulo Sérgio D'Andrea, Pesquisador do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela motivação, pelos ensinamentos, conversas, dicas, pelo suporte e apoio que colaboraram para concretização desta tese e pela grande amizade.

Ao Dr. Roberto do Val Vilela, Pesquisador do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pelo ensinamento, por estar sempre pronto a tirar minhas dúvidas, pela ajuda nas análises moleculares e amizade construída.

A Profa. Dra. Helene Santos Barbosa, Pesquisadora e Chefe do Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela colaboração nas análises de MEV, ensinamentos e amizade construída.

Ao Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres, Professor Adjunto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, pela colaboração, ajuda nas análises de MEV e identificação de alguns espécimes, ensinamentos e amizade.

A Profa. Dra. Ester Maria Mota, Pesquisadora do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela colaboração nas análises de histopatologia e amizade.

Ao Dr José Luiz Passos Cordeiro Pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz no Campus Fiocruz da Mata Atlântica – Presidência, FIOCRUZ, RJ, pelo fornecimento de apoio logístico no CFMA, ajuda no trabalho de campo e pela grande amizade.

Ao Dr. André Luiz Rodrigues Roque, Pesquisador do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pelo ensinamento e ajuda no trabalho de campo.

A Dra Marta L. Brandão da Fundação Oswaldo Cruz do Campus Fiocruz da Mata Atlântica – Presidência, FIOCRUZ, RJ, pelo fornecimento de apoio logístico no CFMA, ajuda no trabalho de campo e pela grande amizade.

Ao Dr. Rui Cerqueira do Laboratório de Vertebrados da UFRJ pelo apoio financeiro e estrutural para as coletas do PARNASO através do PPBIO, pela licença de coleta do PARNASO e pelos diversos ensinamentos.

Ao Gilson Antunes Coordenador do Campus Fiocruz da Mata Atlântica – Presidência, (CFMA), FIOCRUZ, RJ, por apoiar o projeto geral dando suporte técnico e ajudando com a logística no trabalho de campo no CFMA.

Ao amigo Marcelo F. Freitas pela ajuda no trabalho de campo em todas as campanhas no CFMA, por esta sempre pronto a ajudar e pela grande amizade construída.

Ao amigo Dr. Juberlan Silva Garcia, Pesquisador do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pelo ensinamento, atenção e grandiosa amizade construída.

Ao amigo Biologo André Campos Santana, Técnico do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela ajuda na realização de necropsias de marsupiais, dicas, ensinamentos e grandiosa amizade construída ao longo dessa caminhada.

A amiga Dra. Raquel de Oliveira Simões, Pesquisadora Pós Doc do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela amizade, pelo apoio, orientações e incentivo nos momentos difíceis.

As amigas Dra. Joyce Gonçalves Rozário de Souza e Msc. Michele Maria dos Santos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela ajuda, por tirarem dúvidas e pela amizade.

A amiga Msc. Ana Paula Nascimento Gomes pela cooperação na identificação e descrição dos espécimes de Acantocephala.

Ao amigo Dr. Bernardo Rodrigues Teixeira, e aos amigos e Msc. Jonathan Gonçalves, aos Biólogos Camila Lucio, Alex Maia do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, por estarem sempre protos para ajudarem nas horas difíceis, pela amizade e ajuda nas coletas.

Ao amigo Msc.Thiago dos Santos Cardoso do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela valiosa ajuda nas análises do capítulo 3 para realização desta Tese, aprendizagem e amizade construída.

A Bióloga Raquel Gonzalez Boullosa Malheiro de Castro do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, pela ajuda em todo o trabalho da tese, aprendizagem e amizade construída.

Aos Pesquisadores, estudantes, técnicos e funcionários do Campus Fiocruz da Mata Atlântica, FIOCRUZ, RJ, do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, do Laboratório de Rickettsioses e Hantavirose do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, RJ, do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonose, FIOCRUZ, RJ, do Laboratório de Vertebrados da UFRJ, que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento e concretização desta Tese.

A equipe do Laboratório de Vertebrados pela organização, parceria e fornecimento de veículo para as coletas do PARNASO, em especial a Dra. Ana Cláudia Delcielos e Dr. Ricardo Finotti.

A Dr. Pedro Estrela de Andrade Pinto da UFPB e ao Dr. Marcelo Weksler da UFRJ pela participação na elaboração e execução do projeto PPBIO, que financiou as coletas no PARNASO.

Aos funcionários da DIRAC do Setor de Transporte da Fundação Oswaldo Cruz, motoristas, meus amigos João Batista da Silva e Jorge Pinto da Silva, pela disponibilidade, atenção, dedicação, solidariedade, companheirismo, pela mais valiosa amizade e compromisso com o trabalho realizado desde o início.

Ao Instituto Estadual do Meio Ambiente (INEA) pela licença de coleta, pelo apoio logístico no PEPB sed Pau da Fome, ajuda no trabalho de campo e pela parceria construída.

A equipe do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, em especial à Cecília Cronenberger de Faria Analista Ambiental do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade e ao meu amigo “Julião” Jorge Luiz do Nascimento Analista Ambiental do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, pelo apoio nas coletas do PARNASO, colaboração na obtenção da licença de coleta e pela parceria e amizade construída.

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ), através do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), pela estrutura e condições para o desenvolvimento desta Tese, além do apoio com financiamentos e infraestrutura, e pela contribuição na minha formação.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde, pelo apoio, financiamento e contribuição para minha formação profissional.

A CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento da minha bolsa de doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) por parte do financiamento deste projeto (E-26/111, 296/2014).

A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Diretoria de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde-DABS, Coordenação do Programa de Pesquisa em Gestão de Ecossistemas-COGEC,

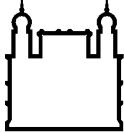
Programa de Pesquisa em Biodiversidade-PPBio Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica. (Processo: 457524/2012-0), por parte do financiamento deste projeto.

Agradeço a todos os meus parentes, meus amigos, meus familiares escolhidos, meus vizinhos que de alguma forma torcem e orgulham-se de mim, por tudo aquilo que represento e procuro fazer por eles.

Agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma a elaborar este trabalho de Tese.

“Um jovem recém casado estava sentado num sofá, num dia quente e úmido, bebericando chá gelado, durante uma visita ao seu pai. Ao conversarem sobre a vida, o casamento, as responsabilidades da vida, as obrigações de adulto, o pai remexia pensativamente os cubos de gelo no seu copo e lançou um olhar claro e sóbrio para seu filho. – Nunca se esqueça de seus amigos! Aconselhou. Serão mais importantes à medida que você envelhecer. Independentemente do quanto você ame sua família, os filhos que porventura venham a ter, você sempre precisará de amigos... Lembre-se de ocasionalmente ir a lugares com eles; faça coisas com eles; telefone para eles. Que estranho conselho! (Pensou o filho). Acabo de ingressar no mundo dos casados. Sou adulto. Com certeza, minha esposa e a família que iniciaremos serão tudo de que necessito para dar sentido à minha vida! Contudo, ele obedeceu ao pai. Manteve contato com seus amigos e anualmente aumentava o número de amigos. À medida que passavam, ele foi compreendendo que seu pai sabia do que falava. À medida que o tempo e a natureza realizam suas mudanças e seus mistérios sobre um homem, amigos são baluartes de sua vida. Passados 50 anos, eis que aprendi: O tempo passa. A vida acontece. A distância separa... As crianças crescem. Os empregos vão e vêm. O amor fica mais frouxo. As pessoas não fazem o que deveriam fazer. O coração se rompe. Os pais morrem. Os colegas esquecem os favores. As carreiras terminam. Os filhos seguem a sua vida como você tão bem ensinou. Mas... os verdadeiros amigos estão lá, não importa quanto tempo e quantos quilômetros tempo estão entre vocês. Um amigo nunca está mais distante do que o alcance de uma necessidade, torcendo por você, intervindo em seu favor e esperando você de braços abertos, e abençoando sua vida! E quando a velhice chega, não existe papo mais gostoso do que o dos velhos amigos. As histórias e recordações dos tempos vividos juntos, das viagens, das férias das noitadas, das paqueras. Ah!!! Tempo bom que não volta mais. Não volta, mas pode ser lembrado numa boa conversa debaixo da sombra de uma árvore, deitado na rede de uma varanda confortável ou à mesa de restaurante, bar, ou quiosque, regada a um bom vinho, uma cachaça ou uma cerveja, não com um desconhecido, mas com os velhos amigos. Quando iniciamos esta aventura chamada VIDA, não sabíamos das incríveis alegrias ou tristezas que estavam adiante, nem sabíamos o quanto precisaríamos uns dos outros”

Autor NI



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE HELMINTOS DE *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (DIDELPHIMORPHIA, DIDELPHIDAE), EM TRÊS AMBIENTES DISTINTOS DA MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

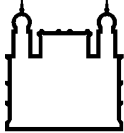
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

SOCRATES FRAGA DA COSTA NETO

Dentre as espécies de marsupiais do Brasil o gênero *Didelphis* é o mais parasitado por helmintos. Apesar da ampla ocorrência de endoparasitos em animais silvestres do gênero *Didelphis*, existe um déficit de informações sobre a helmintofauna destes animais no bioma Mata Atlântica. Além disso, estudos de estrutura de comunidade de helmintos são raros no Brasil e nenhum foi feito até o momento para didelfídeos. Os objetivos desta tese foram descrever a composição de espécies e analisar a estrutura das comunidades de helmintos do gambá *Didelphis aurita* da Mata Atlântica nas escalas de infracomunidade e comunidades componentes, considerando-se três ambientes, peridomiciliar, silvestre e rural no Estado do Rio de Janeiro. Todos os helmintos encontrados foram contados, fixados e identificados. Foram analisadas a distribuição espacial, abundância média, intensidade média e prevalência de cada espécie de helminto encontrada em *D. aurita* e comparadas em relação ao ambiente, estação do ano e sexo do hospedeiro. Também foram analisadas a riqueza de espécies e a estrutura das comunidades em cada ambiente e no total. Foram capturados 73 espécimes de *Didelphis aurita* durante todo o estudo. Quatorze espécies de helmintos foram coletadas, sendo nove do filo Nematoda: *Trichuris minuta* Rudolphi, 1819, *Trichuris didelphis* Babero, 1959, *Globocephalus marsupialis* Freitas & Lent, 1936, *Heterostrongylus heterostrongylus* Travassos, 1925, *Travassostrongylus orloffi* Travassos, 1935, *Viannaia hamata* Travassos, 1914, *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913, *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos (1917) e *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1919; quatro do filo Platyhelminthes (três espécies de Trematoda: *Duboisella prolaba* Baer, 1938, *Brachylaemus advena* Dujardin, 1843 e *Rhopalias coronatus* (Rudolphi, 1819) Stiles & Hassall, 1898, e uma da classe Cestoda e uma do filo Acanthocephala, *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972. Apenas 4,1% não estavam infectados, e 95,9 % estavam infectados com os sete helmintos mais abundantes. As espécies mais abundantes foram *V. hamata*, *C. tentaculata*, *A. raillieti* e *T. orloffi*. Os nematóides *T. turgida*, *C. tentaculata* e *A. raillieti* foram as espécies mais dominantes nos três ambientes. As análises filogenéticas moleculares sugeriram que *H. heterostrongylus* e *Didelphostrongylus hayesi* estão intimamente relacionados. A análise de estrutura da metacomunidade indicou uma estruturação em função do gradiente ambiental somente quando todas as localidades foram incluídas na análise. Tanto ao nível da comunidade componente quanto de infracomunidade total, a estrutura foi aninhada com perda de espécies ao acaso. O filo Nematoda é o principal filo de helmintos parasitos de mamíferos e foi o filo mais representativo com as maiores cargas parasitárias deste estudo. Este estudo constitui novo registro de hospedeiro para as espécies *G. marsupialis* e *T. didelphis*, é primeiro a analisar a estrutura das comunidades de helmintos do gambá *D. aurita* e pioneiro a investigar a estrutura da metacomunidade de helmintos de um marsupial Neotropical.

Palavras-chaves: marsupiais, metacomunidade, Nematoda, Gambá, Trematoda



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

COMPOSITION AND STRUCTURE OF THE HELMINTH COMMUNITIES OF *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (Didelphimorphia, Didelphidae) IN THREE DISTINCT ENVIRONMENTS OF THE ATLANTIC FOREST IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSITY AND HEALTH

SOCRATES FRAGA DA COSTA NETO

Among the Brazilian marsupials, the genus *Didelphis* is the most parasitized by helminths. Despite the widespread occurrence of endoparasites in wild animals of the genus *Didelphis*, there is a lack of information on the helminths of these animals in the Atlantic Forest biome. In addition, studies of community structure of helminths are rare in Brazil and none have been done so far for didelphids. The objectives of this thesis were to describe the species composition and to analyse the structure of the helminth communities of the Atlantic Forest common opossum *Didelphis aurita* at the scales of infracommunity and component communities, considering three environments, peridomicile, sylvatic and rural in the State of Rio de Janeiro. All helminths recovered were counted, fixed and identified. The spatial distribution, mean abundance, mean intensity and prevalence of each helminth species found in *D. aurita* were analysed and compared in relation to the type of environment, season and host gender. Species richness and the structure of the communities in each environment and in the entire study were also analysed. Seventy three specimens of *D. aurita* were captured throughout the study. Fourteen species of helminths were collected, nine of the phylum Nematoda: *Trichuris minuta* Rudolphi, 1819, *Trichuris didelphis* Biber, 1959, *Globocephalus marsupialis* Freitas & Lent, 1936, *Heterostrongylus heterostrongylus* Travassos, 1925, *Travassostrongylus orloffi* Travassos, 1935, *Viannaia hamata* Travassos, 1914, *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913, *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos (1917) and *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1919; four of the phylum Platyhelminthes (three species of Trematoda: *Duboisella prolaba* Baer, 1938, *Brachylaemus advena* Dujardin, 1843 and *Rhopalias coronatus* (Rudolphi, 1819) Stiles & Hassall, 1898, and one of the class Cestoda and one of the phylum Acanthocephala, *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972. Only 4.1% were not infected, and 95.9% were infected with the seven most abundant helminths. The most abundant species were *V. hamata*, *T. cruzi*, *C. tentaculata* and *T. orloffi*. The nematodes *T. turgida*, *C. tentaculata* and *A. raillieti* were the most dominant species in the three environments. The molecular phylogenetic analyses suggested that *H. heterostrongylus* and *Didelphostrongylus hayesi* are closely related. The analysis of the metacommunity structure indicated a structured pattern as a function of the environmental gradient only when all localities were pulled together. In both, total infracommunity and total component community levels, nested structures with random species loss were observed. The phylum Nematoda phylum is the most important phylum of helminth parasites of mammals and was the most representative phylum with the highest parasitic loads of this study. This study constitutes a new host record for the species *G. marsupialis* and *T. didelphis*, it was the first to analyse the structure of the helminth communities of the common opossum *D. aurita*, and pioneer to investigate the structure of the helminth metacommunity of a Neotropical marsupial.

Keys-words: marsupials, metacommunity, Nematoda, opossum, Trematoda

ÍNDICE

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
LISTA DE TABELAS.....	xxv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xxvii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2 Referencial teórico	4
1.2.1 A Mata Atlântica	4
1.3 A fragmentação e perda de habitat	5
1.4 Ecologia parasitaria	6
1.5 A família Didelphidae, GRAY, 1821	7
1.6 Classificação taxonômica da espécie <i>Didelphis aurita</i> Segundo	
GARDNER, 2007 e VOSS; JANSA, 2009	8
1.7 O marsupial <i>Didelphis aurita</i> WIED-NEUWIED, 1826	
(Didelphimorphia, Didelphidae) gambá de orelha preta	9
1.8 <i>Didelphis</i> spp. como hospedeiro de zoonoses	13
1.9 Justificativa	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral:	18
2.2 Objetivos específicos:	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Área de estudo	19
3.1.1 Ambiente Periurbano – Município do Rio de Janeiro	19

3.1.2 Ambiente Silvestre - Parque Nacional da Serra dos Órgãos – Município de Petrópolis	21
3.1.3 Ambiente rural – Município de Sumidouro.....	22
3.2 Captura dos marsupiais.....	28
3.3 A eutanásia	30

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO	34
1.1 Breve histórico da helmintologia dos marsupiais do Brasil	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Métodos de coleta, fixação e identificação dos helmintos.	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 A helmintofauna de <i>Didelphis aurita</i> na mata atlântica.....	40
4.1.1 Taxonomia das espécies de nematoides de <i>Didelphis aurita</i>	40
4.1.2 Taxonomia das espécies de platelmintos de <i>Didelphis aurita</i>	70
4.1.3 Taxonomia da espécie de acantocefala de <i>Didelphis aurita</i>	86
4.2 Comentários e discussão geral sobre a helmintofauna.....	99

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO.....	92
2 MATERIAL E MÉTODOS	94

2.1 Áreas de estudo e descrição do habitat	94
2.2 Coleta e identificação dos marsupiais	94
2.3 Recuperação de helmintos e análises morfológicas	95
2.4 Recuperação das larvas.....	96
2.5 Análise histopatológica	96
2.6 Análises moleculares e filogenéticas	96
3 RESULTADOS.	100
3.1 Descrições da morfologia por microscopia eletrônica de varredura e de luz	100
3.2 Histopatologia.....	101
3.3 As análises moleculares e filogenéticos.....	106
4 DISCUSSÃO	108

CAPÍTULO 3

1 INTRODUÇÃO	112
3 MATERIAL E MÉTODOS	115
3.1 Análise estatística da estrutura das comunidades parasitárias.....	115
3.1.1 Análise dos dados.....	115
4 RESULTADOS	118
4.1 Análise dos parâmetros parasitológicos.....	118
5 DISCUSSÃO	130
7 CONCLUSÃO GERAL	135
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1:** Limites da Mata Atlântica original e após 500 anos de antropização no Brasil, tendo perdido 81,5% do seu território original.5
- Figura 2:** O gambá de orelha preta Sulamericano *Didelphis aurita*. 8
- Figura 3:** Filhotes neonatos dentro da bolsa circular denominada marsúpio...10
- Figura 4:** Mapa indicando a distribuição de *Didelphis marsupialis* e *Didelphis aurita* no Brasil nos diferentes biomas. 12
- Figura 5:** A localização dos municípios das áreas de estudo dentro do mapa do Estado do Rio de Janeiro: em vermelho Rio de Janeiro, em verde Petrópolis e em azul Sumidouro. 22
- Figura 6:** Imagem de satélite indicando das áreas de estudo CFMA- periurbano e Pau-da-Fome- periurbano (seta vermelha); Petrópolis-silvestre, (seta verde) e Sumidouro-rural (seta azul). 23
- Figura 7:** Imagem de satélite da área de estudo Campus Fiocruz da Mata Atlântica e Pau da Fome dentro da zona de amortecimento do Parque Estadual da Pedra Branca que é caracterizado como mosaico de diferentes habitats, incluindo áreas preservados e perturbadas, florestas e áreas de interface entre os ambientes silvestre e habitações humanas no perímetro urbano. 25
- Figura 8:** Imagem de satélite da área de estudo Parque Nacional da Serra dos Órgãos que é caracterizado como mata contínua. 25
- Figura 9:** Imagem de satélite da área de estudo no município de Sumidouro-RJ caracterizado como zona rural. 27

Figura 10: Armadilha Tomahawk® do tipo “live-traps”. 30

Figura 11: Base latoratorial de campo para processamento das amostras no Município de Sumidouro-RJ. 31

CAPÍTULO 1

Figura 1: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Trichuris minuta*. (A) Região anterior (Ra). (B) Extremidade posterior da fêmea mostrando a abertura do ânus (An). (C) Região posterior do macho mostrando o espículo (Ep) e a bainha prepucial com espinhos (Pc). (D) Detalhe do espículo (Ep) e da bainha prepucial ornamentado por espinhos (Pc). (E) Detalhe da vulva (V). (F) Útero com ovos na região média (Ut). 42

Figura 2: Microscopia óptica (campo claro) de espécimes adultos de *Trichuris didelphis*. (A) Região anterior de espécime fêmea indicando a abertura oral (Ao). (B) Extremidade posterior mostrando a abertura do ânus (An). (C) Região posterior de espécime macho mostrando o espículo (Ep) e a dilatação terminal da bainha prepucial em forma globular (Pc). (D) Detalhe da ponta do espículo em forma de bissel (Pe) e da bainha prepucial ornamentado por espinhos (Pc). (E) Abertura da vulva (V) e ovojector (Oj). (F) Útero muscular repleto de ovos na região média do corpo (Ut). 45

Figura 3: Microscopia óptica de campo claro de espécimes adultos de *Globocephalus marsupialis*. (A) Região anterior da fêmea mostrando abertura oral semiglobosa, circulada por festões, com uma lanceta dorso-lateral munida de espinhos e dois dentes conspícuos na parte anterior da cápsula bucal (Lt). (B) Espécime fêmea com a vulva situada na região anterior do corpo (Vv). (C) Região posterior da fêmea terminando afilada com ânus subterminal. (D) Detalhe da bolsa copulatória em vista ventral da região posterior do macho, raio ventroventral (R2), raio ventrolateral (R3), raio anterolateral (R4), raio mediolateral (R5), raio posterolateral (R6), raio posterodorsal (R8), raio dorsal (Rd), raios dorsais (R9) e (R10), detalhe da ponta do raio dorsal bífido, espículos (Ep) e gubernáculo (Gb). **48**

Figura 4: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Extremidade anterior do macho que mostra o esôfago (Es) e, em detalhe, os lábios (Lb) e colar cefálico (Cc). (B) Extremidade posterior do macho com vista lateral, mostrando gubernáculo (Gb) e espículo (Ep). (C) Extremidade posterior da fêmea mostrando útero (Ut), ovejetor (Oj), vulva (Vv), ânus (An) e cauda digitiforme (Cd). (D) Ovos. **52**

Figura 5: Microscopia óptica (campo claro) de espécimes adultos de *Travassostrongylus orloffii*. (A) Região anterior de espécime macho mostrando a cápsula cefálica (Cp) e esôfago claviforme (Es). (B) Extremidade posterior da fêmea indicando o ânus (An) e cauda cônica digitiforme (Cc). (C) Região posterior do macho mostrando bolsa copuladora (Bc), raio dorsal (Db), raio ventroventral (R2), raio ventrolateral (R3), raio anterolateral (R4), raio mediolateral (R5), raio posterolateral (R6), raio posterodorsal (R8), raios dorsais (R9) e (R10), detalhe da ponta do raio dorsal bífido, espículos (Ep) e gubernáculo (Gb). **55**

Figura 6: Microscopia óptica (campo claro) de espécimes adultos de *Viannia hamata*. (A) Região anterior, mostrando a cápsula cefálica (Cp) e esôfago claviforme (Es). (B) Região posterior do macho mostrando bolsa copuladora (Bc), espículos (Ep), raio ventroventral (R2), raio ventrolateral (R3), raio anterolateral (R4), raio mediolateral (R5), raio posterolateral (R6), raio posterodorsal (R8), e raios dorsais (Rd), (R9) e (R10). (C) e (D) Extremidade posterior da fêmea mostrando útero muscular (Ut) com os ovos (Ov), ovejector muscular (Oj), abertura da vulva (Vv) e ânus (An). **58**

Figura 7: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Aspidodera raillieti*. (A) Visão anterior mostrando: cordões cefálicos (Cc), poro excretor (Pe) e esôfago (Es). (B) Região posterior do macho mostrando espículos (Ep), gubernáculo (Gb), ventosa (Vt) e cloaca (Cl). (C) Detalhe da região posterior da fêmea terminando afilada e mostrando ânus. (D) Detalhe do útero da fêmea (Ut), da vulva (Vv) e ovos (Ov). **62**

Figura 8: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Cruzia tentaculata*. (A) Visão lateral da região anterior com três lábios (Lb), esôfago (Es), dentículos (Dt) e poro excretor (Pe). (B) Detalhe da vulva (Vv) e Ovo uterino (Ov). (C) Região posterior da fêmea com detalhe do ânus (An). (D) Visão lateral da parte posterior do macho com detalhe de uma papila (Pp), cloaca (Cl), gubernáculo (Gb) e espículos (Ep). **66**

Figura 9: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Turgida turgida*. (A) Região anterior mostrando as papilas (Pp), dentículos (Dt), colar cefálico (Cc) e faringe (Fg). (B) Detalhes da região anterior mostrando papilas (Pp), dentículos (Dt) e anfídeo (Af). (C) Região posterior de uma fêmea mostrando o ânus. (D) Ovos uterinos. (E) e (F) Região posterior de um macho, em detalhes a bolsa mostrando papilas (Pp), papilas penduculadas (Pd) e fasmídeo (Fs). **70**

Figura 10: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Duboisella proloba*. (A) Vista total do helminto, mostrando Cecos intestinais (Ci), Glândulas vitelinas (Gv), Ovos (Oo), Ovário pretesticular (Ov), Testículos multilobados no mesmo campo (Te). (B) Órgão tribocítico (Ot) estendendo-se da ventosa oral até o nível do ovário (Ov). (C) Ventosa oral (Vo), Faringe (Fa). (D) Ovário elíptico (Ov) e Testículos (Te). (E) Poro excretor subterminal. (F) Útero repleto ovos (Oo) grandes e operculados. 74

Figura 11: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Brachylaima advena*. (A) Vista total do helminto, mostrando Ventosa oral (Vo), Faringe (Fa), Cecos intestinais (Ci), Ventosa ventral (Vv), Glândulas vitelinas (Gv), Ovos (Oo), Ovário (Ov) e Testículos (Te). 78

Figura 12: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Rhopalias coronatus*. (A) Vista total do helminto, mostrando a probóscide (Pb), Ventosa oral (Vo), Faringe (Fa), Bainha da Probocísce (Ba), Ventosa ventral (Vv), Ovos (Oo), Ovário (Ov), Testículos (Te), Glândulas vitelinas (Gv). (B) Detalhe da probóscide (Pb). (C) Região do meio do corpo com Útero repleto de ovos (Oo), (D) com Ovário elíptico (Ov) a oval, pretesticular e dois testiculos ovais (Te) um atrás do outro. 83

Figura 13: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de Cestoda. (A) Região anterior, mostrando os escólices sem rostelo e as ventosas (Es). (B) Proglótides jovens imaturas (Pg). (C) Ovos maduros. 85

Figura 14: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Oligacanthorhynchus microcephalus*. (A) Região anterior, mostrando probóscide globular armada com ganchos (Pb), pescoço livre de espinhos (Pe), receptáculo da probóscide presente (Rp) e lemniscos (Lm). (B e C) Detalhe da probóscide com seis séries de seis ganchos, com forma semifalciforme, ganchos variando de tamanho do topo até a base da probóscide (G1, G2, G3, G4, G5 e G6). 89

CAPÍTULO 2

Figura 1: Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Corpo da fêmea apresentando a Linha lateral (La). (B) Extremidade anterior do macho apresentando seis lábios desenvolvidos (Li), quatro pares de papilas cefálicas externas (Ecp), seis papilas internas (Icp), e dois anfídeos (Am). (C) Detalhe da abertura oral (Oo). (D) Parte anterior do Macho, vista lateral, mostrando colar cefálico (Cc).**102**

Figura 2: Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) extremidade posterior do macho que mostra bolsa copulatória com raios ventral (Vr), raios laterais (Lr), raios posterodorsal (Pr), raio dorsal (Dr), e cloaca (Cl). (B) Extremidade posterior da fêmea mostrando a vulva (Vu), ânus (An), e cauda digitiforme (Td). (C) Ovos em forma elíptica, mostrando estrias longitudinais. (D) larvas L₃ em detalhe, mostrando uma protuberância em forma de botão (Kt) na ponta ventral na extremidade posterior.**103**

Figura 3: Microscopia de luz de *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Extremidade anterior do macho que mostra o esôfago (Oe), e em detalhe, os lábios (Li) e colar cefálico (Cc). (B) Extremidade posterior do macho, vista lateral, mostrando gubernaculum (Gu) e espículo (Sp). (C) Parte posterior da fêmea mostrando útero didelfo (Du), ovejetor (Oj), vulva (Vu), ânus (An) e cauda digitiforme (Td). (D) Ovos (Ge) e primeira fase larval (L₁). (E) Extremidade anterior das larvas L₃ mostrando poro excretor (Pe), anfídeos (Am) apresentando uma estrutura em formato de haste (Rs), e no final da extremidade posterior apresenta um ânus (An) e ponta em formato de botão (Kt).**104**

Figura 4: Histopatologia do lóbulo pulmonar de *Didelphis aurita* naturalmente infectadas com *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Aspecto macroscópico do pulmão com numerosas áreas aderidas, regiões multifocais e irregularidades na superfície do órgão. (B) Parênquima pulmonar mostrando processo de reação sutil com células inflamatórias (Ic), infiltrados inflamatórios (Ii) e presença de helmintos (H). (C) Respostas graves com ocorrência maciça de células de infiltrados inflamatórios. (D) Ruptura do músculo liso dos brônquios (Dmb) com extravasamento de células inflamatórias para saída do brônquio do (Bi), presença de helmintos adultos com muco e células inflamatórias dentro de seus aparelhos digestivos (Hc). (E) Helmintos dentro do lúmen do brônquio. (F) Primeiro estágio larvar (L₁) associado com exsudativo catarral esverdeado (Ce) e com hiperplasia das glândulas brônquicas no lúmen dos bronquíolos.105

Figura 5: Árvore Bayesiana usando o gene ribossomal 18S nucleotídeos. Os valores de probabilidades posteriores da Bayesiana são representados nos nós.107

CAPÍTULO 3

Figura 1. Análise da diversidade de espécies de helmintos do gambá *Didelphis aurita* utilizando-se escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) entre as localidades investigadas.128

Figura 2. Matrizes ordenadas da análise da metacomunidade de helmintos de *Didelphis aurita* incluindo todas as áreas. A - Escala de Comunidade Componente onde as linhas correspondem aos transectos de todas as localidades e a colunas às espécies; B - Escala de Infracomunidade onde as linhas correspondem aos hospedeiros e as colunas às espécies. ■ Rio de Janeiro-RJ, ■ Petrópolis-RJ e ■ Sumidouro-RJ.129

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Localidades de coleta dentro da área de estudo no Estado do Rio de Janeiro.	24
---	-----------

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Números de acesso das sequências obtidas no GenBank e os hospedeiros dos parasitos.	98
---	-----------

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Resumo das estruturas idealizadas de metacomunidade e seus respectivos resultados de análises de coerência, substituição de espécies e limite de distribuição.	117
--	------------

Tabela 2: Abundância e intensidade (\pm DP), prevalência (intervalo de confiança de 95%) em relação ao tipo de ambiente, sexo do hospedeiro e estação para seis espécies de nematoides e uma de acantocéfala (<i>H. heterostrongylus</i> , <i>T. turgida</i> , <i>C. tentaculata</i> , <i>A. raillieti</i> , <i>V. hamata</i> , <i>T. orloff</i> e <i>O. microcephalus</i>) recuperadas de <i>Didelphis aurita</i> nos Municípios do Rio de Janeiro, Sumidouro e Petrópolis, RJ, Brasil.	121
---	------------

Tabela 3: Índices de agregação em relação aos três ambientes para todas as espécies de helmintos recuperadas de <i>Didelphis aurita</i> , no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.	123
--	------------

Tabela 4: Índices de Importância para os helmintos recuperados de <i>Didelphis aurita</i> nos três ambientes estudados, RJ, Brasil.	124
---	------------

Tabela 5: Valores de Qui-Quadrado e p para comparação das prevalências entre ambientes, sexo dos hospedeiros e estações para as espécies mais abundantes de helmintos de *Didelphis aurita* no estudo. **125**

Tabela 6: Valores de AICc e seleção de modelos para o parâmetro de abundância dos helmintos em relação ao tipo de ambiente, sexo do hospedeiro e estação de nematoides (*C. tentaculata* e *T. orloffii*), recuperados de *Didelphis aurita*. **126**

Tabela 7: Resultados da análise de estrutura de metacomunidade de helmintos de *Didelphis aurita* em duas escalas (infracomunidades e comunidades componentes) com os valores de coerência, substituição de espécies e limite de distribuição de espécies. AE= Ausências embutidas; P= Significância; MA= Matrizes geradas ao acaso; DP= Desvio padrão; SUB= Substituições de espécies; IM= Índice de Distribuição de Morisita. **127**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

18S - Ribosomal RNA

AFA - 93 partes de etanol 70%, 5 partes de formol 0,4% e 2 partes de ácido acético 100%

Aw – Clima Tropical (chuvas no verão)

CENABIO - Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CFMA - Campus Fiocruz da Mata Atlântica

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CHIOC – Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz

CO₂ - Dióxido de carbono

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GenBank – Banco genético

GL – Glacial

HCL - Ácido clorídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

ICZN - International Code of Zoological Nomenclature

INEA - Instituto Estadual do Ambiente

L₁ – Larva de primeiro estágio

L₃ - Larva de terceiro estágio

LBCE – Laboratório de Biologia e Controle da Esquistossomose

M - Molar

mM - Milimolar

mEq/Kg - Conversão de miliequivalente de oxigênio/kg (mEq / kg) para mmol /L

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/Kg – miligramas por quilograma

ml/Kg – mililitro por quilograma

K₃Fe (CN) 6 - Ferrocianeto de potássio

NaCl - Cloreto de Sódio

OsO₄ - Tetróxido de ósmio

PARNASO - Parque Nacional da Serra dos Órgãos

PEPB - Parque Estadual da Pedra Branca

PDTIS - Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto
Oswaldo Cruz

pH – Símbolo para potencial hidrogeniônico, o antilogaritmo da concentração
dos íons

RNA - Ácido ribonucleico

SISBio - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

µm – Micrômetro

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

1 INTRODUÇÃO GERAL

As áreas de ambientes naturais remanescentes no Brasil estão cada vez mais reduzidas, fragmentadas e isoladas, devido a um contínuo processo de urbanização e avanço humano sobre os habitats originais, que têm resultado em mudanças nestes habitats (Soulé; Wilcox, 1980; Turner, 1996; Laurance, 1999; Scott *et al.*, 2006). A substituição dos habitats naturais por áreas cultivadas, áreas de pasto para criação de animais de produção e para ocupação humana afetam diretamente a estrutura das comunidades de animais e vegetais. Entender como as diferentes espécies são afetadas pelas mudanças no ambiente pode contribuir para programas de conservação da diversidade biológica (Turner, 1996; Laurance, 1999; Fahrig, 2003; Fischer & Lindenmayer, 2007).

A ocupação humana dos ambientes naturais tem contribuído para que diversas espécies se comportem como sinantrópicas, podendo atuar como elementos de contato entre os seres humanos e a natureza, podendo potencialmente trazer para o ambiente urbano, parasitoses e viroses anteriormente restritas aos ciclos silvestres e até então desconhecidas do ser humano, ou permitir a introdução um de ciclo de patógenos no ambiente silvestre originalmente restrito aos seres humanos. Deste modo, as questões referentes às alterações nos ambientes e à diversidade de espécies tem se mostrado diretamente relacionadas ao risco de infecção de doenças parasitárias em humanos. A conservação da diversidade biológica tem sido uma preocupação global, principalmente pelo crescente distúrbio na estrutura e função dos ecossistemas por ações antrópicas, o que vem conseqüentemente resultando na alteração da composição e abundância das espécies.

O Estado do Rio de Janeiro apresenta uma grande concentração de espécies de mamíferos (Rocha *et al.*, 2003), sendo que, em diversas localidades, os animais de médio e grande porte desapareceram completamente, ou têm populações bastante reduzidas, levando às mudanças nas interações ecológicas (Cullen *et al.*, 2001), e provavelmente aumentando a abundância de espécies generalistas de pequenos mamíferos, e o gambá *D. aurita* é um exemplo (Fonseca & Robinson, 1990, Moura *et al.*, 2009).

Os estudos de composição e riqueza de comunidades de parasitos em populações de hospedeiros indicam que estes mudam no espaço (Dogiel, 1964; Jiménez *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006). Esta variação tem sido estudada em três níveis de estruturas das comunidades: infracomunidade, comunidade componente e fauna de parasitos (Poulin & Dick, 2007). Nos mamíferos, a comunidade componente de helmintos é variável, estando correlacionada negativamente com a similaridade taxonômica e isolamento geográfico (Pence, 1990; Poulin, 2003; Krasnov *et al.*, 2005).

Poucos estudos têm sido focados na estrutura e variações da comunidade helmíntica de marsupiais (Jiménez *et al.*, 2011). No Brasil há poucos relatos, observando-se alguns estudos sobre a helmintofauna (Anderson *et al.*, 1980; 2009; Antunes, 2005; Chagas-Moutinho *et al.*, 2007). Recentemente, têm sido relatadas algumas descrições e re-descrições taxonômicas de helmintos parasitos de marsupiais (Torres, 2007; Adnet *et al.*, 2009; Araújo, 2011; Chagas-Moutinho *et al.*, 2014), o que vêm subsidiar os estudos de comunidade de helmintos parasitos.

No campo da parasitologia, tem sido uma preocupação constante a identificação precisa e o registro de espécies de parasitos em animais silvestres. A correta identificação taxonômica das espécies tem implicações importantes para muitas áreas, especialmente nos estudos de inventário da diversidade de espécies, incluindo conservação, sistemática, epidemiologia, filogenia molecular e controle de doenças parasitárias que podem representar risco para a saúde pública e saúde animal (Martins *et al.*, 2004).

Parasitos vêm sendo identificados, tradicionalmente através de morfologia e morfometria, (Anderson *et al.*, 2009). Contudo, as limitações de suas características morfológicas para identificação taxonômica e as dificuldades em se analisar o ciclo de vida completo dos helmintos têm levado ao uso de técnicas moleculares como uma ferramenta complementar para o diagnóstico das espécies. O uso da microscopia de luz convencionalmente empregada para a descrição das espécies tem recentemente recebido subsídios a partir da utilização da microscopia eletrônica de varredura, entretanto poucas são as espécies estudadas através dessa técnica.

Dentre as 56 espécies de marsupiais brasileiras (Cáceres, 2012), os gambás destacam-se pela sua grande abundância e importância na saúde

pública, uma vez que são importantes reservatórios de zoonoses como as tripanossomíases e leishmanioses (Lima *et al.*, 2012; Xavier *et al.*, 2014). As constantes perturbações humanas no ambiente fizeram com que a maior parte das espécies predadoras de gambá desaparecessem, restringindo-se apenas às áreas de grandes reservas, tornando os gambás espécies-chave nas comunidades animais (Moura *et al.*, 2009). *Didelphis aurita* é denominada como a espécie de gambá de orelha preta que ocorre na Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil (Cerqueira, 1985; Tribe, 1987; Cerqueira & Lemos, 2000; Brown, 2004; Gardner, 2007). Apesar da ampla ocorrência de endoparasitos em animais silvestres do gênero *Didelphis*, a informação sobre a helmintofauna é fragmentada. Em 2006, Thatcher fez um levantamento de espécies de diferentes famílias de endoparasitos encontrados em marsupiais brasileiros agrupando-os de acordo com o respectivo Filo. Sendo assim: o Filo Platyhelminthes apresenta 11 famílias, sendo uma na classe Cestoda e dez na classe Trematoda. No Filo Nematoda foram relatadas 15 famílias enquanto no Filo Acanthocephala, três famílias. Nos Estados Unidos e Canadá só ocorre uma espécie de marsupial, o *Didelphis virginiana* Kerr, 1792 e para esta espécie, são conhecidas 18 espécies de Trematoda, seis de Cestoda, 29 de Nematoda e cinco de Acanthocephala, totalizando 58 espécies de helmintos parasitos (Alden, 1995). No Brasil, existem 15 gêneros e 56 espécies de marsupiais (Rossi *et al.*, 2006; Gardner, 2007; Pavan *et al.*, 2012) para as quais foram descritas dezoito espécies de Trematoda, quatro de Cestoda, trinta e cinco de Nematoda e três de Acanthocephala, totalizando 60 espécies de helmintos (Thatcher, 2006). Estes dados levantam a necessidade de mais estudos a fim de se conhecer a diversidade de helmintos para os marsupiais brasileiros, principalmente em áreas de grande importância ecológica, como as Florestas Tropicais.

Os estudos sobre parasitos vêm reforçando a necessidade de mais informações sobre a fauna destes animais, uma vez que o conhecimento do assunto é limitado. Além disso, para diversos taxa conhecidos ou descritos, o “status” taxonômico permanece incerto, pois o número de especialistas e revisões taxonômicas está aquém da demanda de conhecimento sobre tais grupos. Tal situação, conhecida como déficit Lineano (Brown & Lomolino,

1998), dificulta outros estudos sobre a biologia das espécies, seu papel ecológico e evolutivo, prejudicando sobremaneira as iniciativas conservacionistas.

Mais preocupante é o fato das distribuições geográficas conhecidas das espécies da flora e fauna serem também subdimensionadas (Auricchio & Salomão, 2002), ou virtualmente desconhecidas, no caso de espécies raras, para fins de avaliação de “status” de conservação (Bonvicino *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2003). Analogamente ao déficit Lineano, esta deficiência é definida como déficit Wallaceano (Lomolino *et al.*, 2005). Este déficit provém dos resultantes vazios amostrais mesmo em regiões com um histórico antigo de ocupação e pesquisa, como é o caso da região sudeste do Brasil. Esta informação por si só justifica a necessidade de mais inventários pontuais aplicando metodologias de coleta complementares.

1.2 Referencial teórico

1.2.1 A Mata Atlântica

O bioma Mata Atlântica (Figura 1) se destaca de todas as florestas tropicais ombrófilas do mundo por sua longa distribuição linear, que se estende ao longo da costa oriental brasileira, pela sua heterogeneidade de habitats (Caramaschi *et al.*, 2000), pelo seu isolamento de outras florestas ombrófilas do continente e pelo seu alto grau de fragmentação que a qualificam como um dos 34 “hotspots” para conservação (Mittermeier *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2009). Estas são características importantes para se explicar a alta diversidade, o endemismo e o atual grau de ameaça dos organismos deste bioma (Bergallo *et al.*, 2000; Myers *et al.*, 2000).

Atualmente a Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros que mais tem sido afetado pelo desmatamento e sofrido com distúrbios devido ao severo impacto causado pela antropização por estar situado na região mais densamente ocupada pela população brasileira. Apesar de possuir uma área (43700 Km²) relativamente pequena de remanescentes florestais, o estado do Rio de Janeiro possui grande diversidade biológica e altas taxas de endemismo para diversos grupos da fauna e flora, e que podem já estar ameaçadas por

causa da devastação e degradação dos ambientes em que vivem (Rocha *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009; Pimm *et al.*, 2010). Essa riqueza de espécies provavelmente reflete na alta heterogeneidade de ambientes, desde restingas até campos de altitude, na existência em grande parte de sua extensão de relevos acidentados, na disponibilidade de diversos tipos de micro-habitat úmidos encontrados no bioma, o que, ao longo do tempo, deve ter favorecido sua ocupação por espécies com diferentes necessidades ecológicas, dentre outros fatores (Caramaschi *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2008).

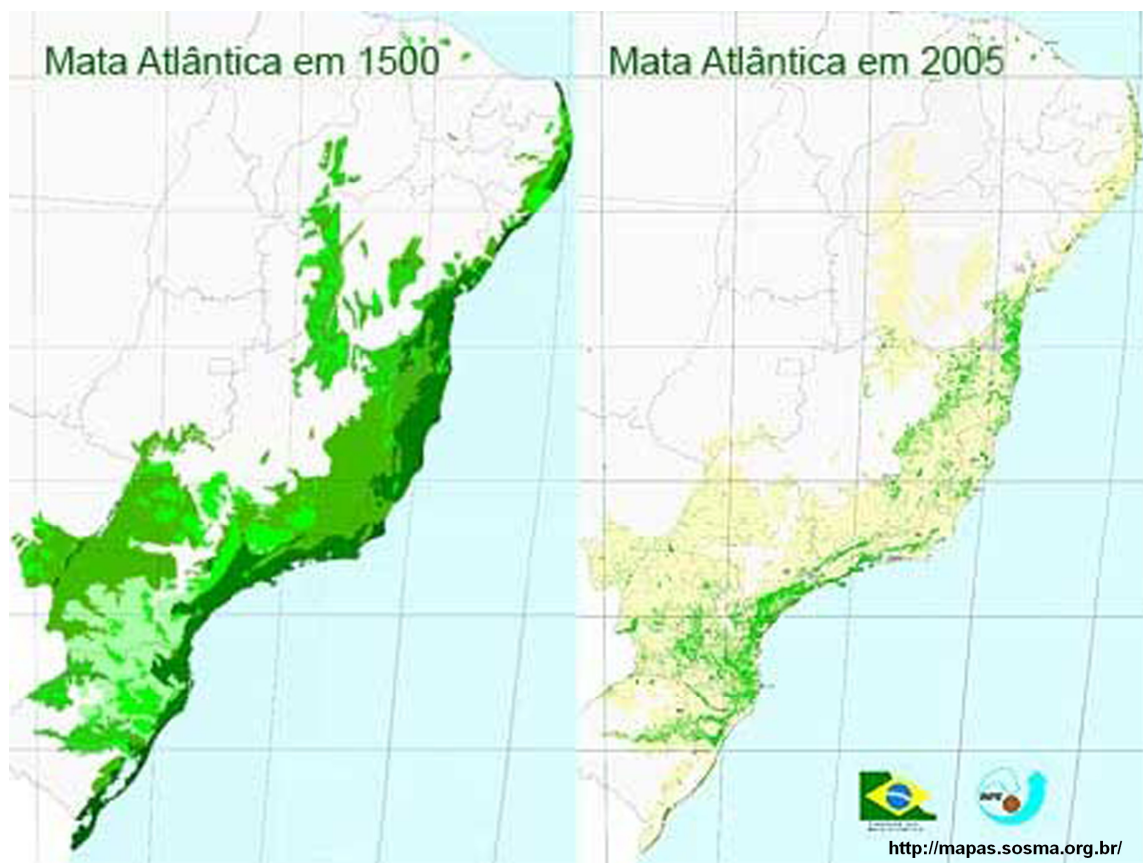


Figura 1: Limites da Mata Atlântica original e após 500 anos de antropização no Brasil, tendo perdido 81,5% do seu território original. Fonte: <http://mapas.sosma.org.br>. Acessado em 14 de junho 2014.

1.3 A fragmentação e perda de habitat

O processo de perda do habitat original é histórico, pois o desenvolvimento de quase todos os grandes centros urbanos brasileiros desde

o século XVI se deu dentro deste bioma, onde vive cerca de 72% da população brasileira IBGE (2016). O processo intenso de perda do habitat culmina com a fragmentação da paisagem em manchas, que vem reduzindo a área e aumentando o grau de isolamento por matrizes de habitats diferentes das originais (Andrén, 1996).

A perda e fragmentação do habitat associados, impactam diretamente na riqueza biológica, alterando os padrões de distribuição espacial nas florestas (Laurance *et al.*, 2000). Extinções de populações em diferentes escalas, desde espécies que se distribuem em manchas a espécies de rara ocorrência, possibilitam a invasão de espécies exóticas, e isto se agrava em ambientes rurais (áreas cultivadas ou manejo de animais) e urbanos (ocupação humana) (Tabarelli *et al.*, 2005). A diminuição da riqueza de espécies pela perda do habitat é pouco conhecida (Chiarello, 2000; Metzger, 2000; Castro & Fernandez, 2004; Pardini *et al.*, 2005).

1.4 Ecologia parasitaria

A importância do parasitismo nos estudos ecológicos foi negligenciada durante muito tempo e somente nos últimos vinte anos sua importância na evolução dos organismos hospedeiros e na estrutura dos ecossistemas começou a ser compreendida (Thomas *et al.*, 2009). O parasitismo pode alterar os padrões populacionais das espécies de hospedeiros, a estrutura das comunidades, as relações biológicas (ex. competição, predação), o padrão de evolução dos organismos (ex. especiação, extinção), e podem ser considerados como engenheiros dos ecossistemas (Thomas *et al.*, 2005). Os parasitos também podem ser determinantes da diversidade de espécies das comunidades de vida livre e controlar a estabilidade de um ecossistema através do “efeito cascata” (Thomas *et al.*, 2005), sendo o conhecimento da diversidade de parasitos de extrema relevância para a compreensão da estrutura das comunidades e avaliação dos efeitos das perturbações antrópicas nos ecossistemas.

Dentre os diversos taxons de parasitos, os helmintos apresentam características biológicas que tem possibilitado sua utilização como indicadores de alterações ambientais (Gardner & Campbell, 1992). Mudanças ambientais

podem alterar os parâmetros biológicos destes organismos, resultando em modificações em sua relação com as populações de hospedeiros (Bush *et al.*, 2001). Os helmintos são considerados os organismos metazoários mais abundantes (Poulin, 1996). São excelentes modelos de estudo para a investigação da interação parasito-hospedeiro em ecossistemas naturais e antropizados (Maldonado JR *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2010; 2011b; 2012), dados alguns fatores tais como o seu imenso potencial de dispersão entre as espécies e ambientes, sua acentuada história evolutiva e capacidade para ser herdado filogeneticamente e pelo tempo relativamente longo dos ciclos de vida (Brandão, 2007). Mais da metade das espécies conhecidas no mundo compreende indivíduos parasitos (Begon *et al.*, 2007). Consequentemente, o parasitismo é uma relação biológica frequente e nenhuma espécie está livre de parasitos (Price, 1980). Além disto, os parasitos podem influenciar indivíduos, populações de hospedeiros e até mesmo ecossistemas inteiros (Hudson *et al.*, 2002).

1.5 A família Didelphidae, GRAY, 1821

Os marsupiais representam um dos três principais grupos de mamíferos. São importantes componentes da fauna americana com adaptações a diversos tipos de habitat, permitindo-lhes ocupar diferentes nichos ecológicos (Streilein, 1982). Desempenham um importante papel ecológico nos ecossistemas onde ocorrem, agindo como presas para vertebrados carnívoros, promovendo o controle populacional de invertebrados e pequenos vertebrados. Em sua maioria, são onívoros e eventualmente frugívoros, além de atuarem como potenciais dispersores de sementes e ajudarem na polinização (Charles-Dominique *et al.*, 1981; Ceotto *et al.*, 2009; Abreu *et al.*, 2011). Algumas espécies do grupo também podem atuar como indicadores biológicos no monitoramento e na avaliação da qualidade ambiental, pois certas espécies apresentam baixa mobilidade e alto grau de endemismo, enquanto outras espécies são nômades e solitárias (Gentile *et al.*, 2000; Bonvicino *et al.*, 2002).

Apesar da diversidade pré-histórica de marsupiais ter sido alta, no Brasil (Paula Couto, 1952; Oliveira & Goin, 2006), a família Didelphidae, é representada por quatro subfamílias (Glironiinae, Caluromyinae, Hyladelphinae

e Didelphinae), esta última sendo a única pertencente à ordem Didelphimorphia, que representa os marsupiais recentes no continente americano (Gardner, 2007). Atualmente, é composta por 95 espécies distribuídas em 19 gêneros, sendo que no Brasil temos registrado 15 gêneros e 56 espécies de marsupiais recentes (Rossi *et al.*, 2006; Gardner, 2007; Voss & Jansa, 2009; Pavan *et al.*, 2012).

1.6 Classificação taxonômica da espécie *Didelphis aurita* Segundo GARDNER, 2007 e VOSS; JANSA, 2009

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Mammalia LINNAEUS, 1758

Ordem: Didelphimorphia GILL, 1872

Família: Didelphidae GRAY, 1821

Subfamília: Didelphinae GRAY, 1821

Gênero: *Didelphis* LINNAEUS, 1758

Espécie: *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (Figura 2)



Figura 2: O gambá de orelha preta Sulamericano *Didelphis aurita*. Foto: R. Gentile.

1.7 O marsupial *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826 (Didelphimorphia, Didelphidae) gambá de orelha preta

O nome genérico *Didelphis* foi cunhado por Linnaeus e vem do grego que significa "útero duplo", apresenta marsúpio externo no "ventre" com o formato de uma grande bolsa" (Figura 3). O vocábulo gambá deriva do tupi-guarani *gã'ba ou gaambá*, que significa 'ventre aberto' 'mama oca' teta vazia", ou seja, foi o modo de reprodução que chamou a atenção dos povos pré-coloniais (Jansen, 2002), mas é popularmente conhecido no Brasil também como mucura, micurê, saringué, sarigué, sariguê, saruê, sarigueia, cassaco, timbú, taibu, tacaca, ticaca e raposa (Emmons & Feer, 1997).

O gênero *Didelphis* apresenta cinco espécies sul-americanas: *D. marsupialis* Linnaeus, 1758, *D. aurita* Wied-Neuwied, 1826, *D. albiventris* Lund, 1840, *D. imperfecta* Mondolfi & Pérez-Hernández, 1984 e *D. pernigra* Allen, 1900 (Cerqueira, 1985). *Didelphis aurita* foi considerado por muito tempo conspecífico do gambá de orelha preta do Norte do Brasil, *Didelphis marsupialis* Linnaeus 1758. Hoje sabe-se que representam duas espécies alopátricas, sendo o *D. aurita* o gambá de orelha preta que ocorre na Mata Atlântica e *D. marsupialis* o gambá de orelha preta que ocorre na região Amazônica (Figura 4). As outras três espécies constituem os gambás de orelha branca. Na América do Norte e parte da América Central encontra-se apenas uma espécie, *D. virginiana* Kerr, 1792, que se distribui do Canadá até a Costa Rica (Gardner 1973; 1982; 1993).

Já foram considerados sinônimos para *D. aurita*: *Didelphis azarae* Temminck, 1824; *D. marsupialis* Wied-Neuwied, 1826; *Didelphys azarae*: J. A. Wagner, 1843; *Didelphys cancrivora*: J. A. Wagner, 1843; *Gamba aurita brasiliensis* (Liais, 1872); *Didelphys marsupialis aurita*: Cope, 1889; *D. koseriti* Ihering, 1892; [*Didelphys (Marmosa)*] *koseriti* Trouessart, 1898; [*Didelphys (Didelphys) marsupialis*] *aurita*: Trouessart, 1898; *D. marsupialis cancrivora*: Bertoni, 1914; [*Didelphis (Didelphis)*] *leucoprymnus* Matschie, 1916; *D. aurita Longipilis* Mirand-Ribeiro, 1935; *D. aurita melanoidis* Miranda-Ribeiro, 1935; *D. aurita longigilis* Avila-Pires, 1968.

O sinônimo sênior é *Didelphis azarae*. Temminck em 1824 aplicou este nome a esta espécie, dado que a descrição menciona especificamente orelhas

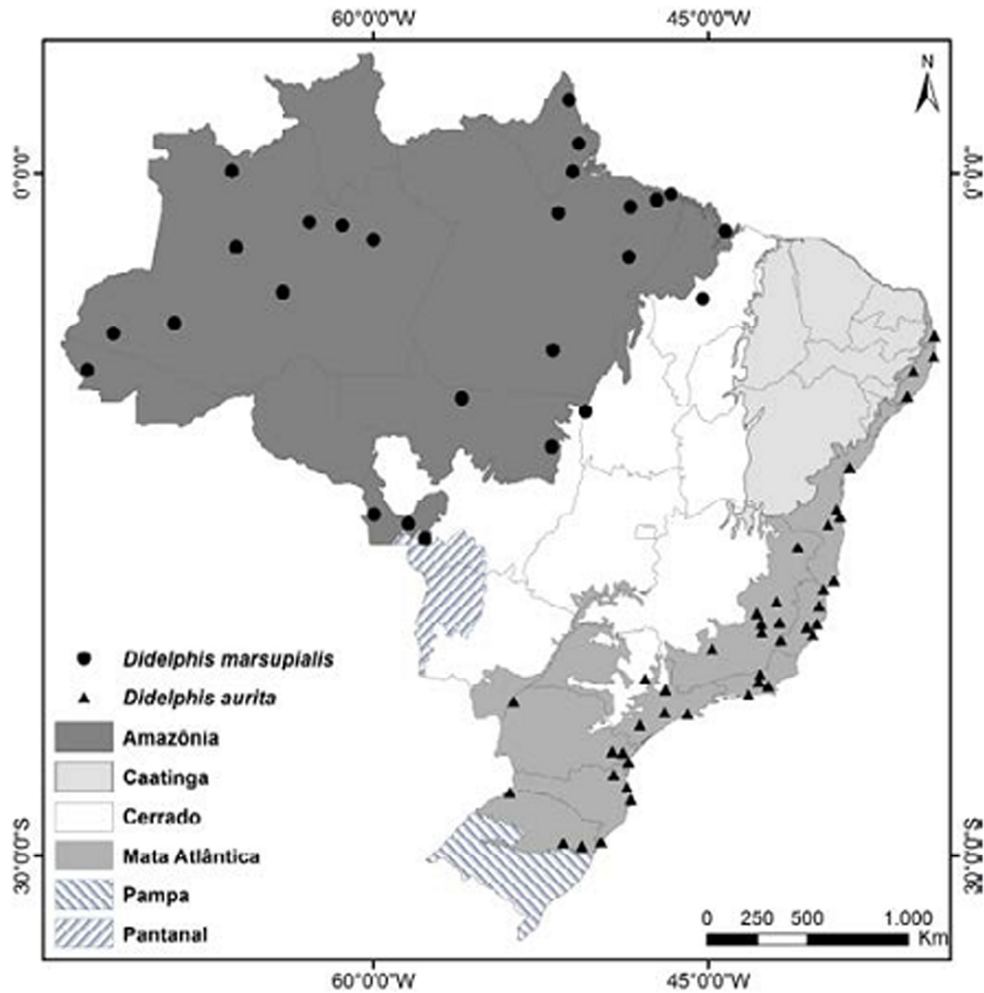
pretas. No entanto, o nome tinha sido equivocadamente aplicado a *D. albiventris* por mais de 160 anos desde sua descrição. Embora o nome *D. azarae* anteceda o nome *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, a confusão causada pela sua má aplicação resultou no uso do nome *D. aurita* atualmente (Gardner, 2007).



Figura 3: Filhotes neonatos dentro da bolsa circular denominada marsúpio.

Didelphis aurita ocorre em toda Mata Atlântica (Figura 4), na porção leste do Brasil oriental, do litoral leste no estado da Paraíba ao norte do estado do Rio Grande do Sul, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul, ocupando ainda o sudeste do Paraguai e a província de Misiones, na Argentina (Cerqueira, 1985; Tribe, 1987; Cerqueira & Lemos, 2000; Brown, 2004; Gardner, 2007; Cerqueira & Tribe, 2008). *Didelphis aurita* é bastante comum em toda Mata Atlântica, e em área de transição entre biomas, possui hábito noturno e solitário, sendo que os machos apresentam grandes deslocamentos sendo agressivos. As fêmeas apresentam deslocamentos menores que os machos, sendo mais residentes (Gentile *et al.*, 2000).

Apresenta hábito escansorial, mas predominantemente terrestre e ocasionalmente arborícola, podendo ser capturado em vários estratos da vegetação, escalar árvores, superar obstáculos e nadar (Santori *et al.*, 1995; Leite *et al.*, 1996; Grelle, 2003;). Ocupa uma grande variedade de habitats, geralmente, vive em matas próximas a cursos d'água, abrigando-se em troncos, em tocos de árvores mortas, entre raízes ou debaixo de folhas secas (Emmons & Feer, 1997). São tolerantes quanto a presença do ser humano em áreas rurais e antropizadas, estando presente em áreas de peridomicílio, sendo considerado habitat-generalista e frequentemente dominante em comunidades de pequenos mamíferos de áreas perturbadas (Fonseca & Robinson, 1990; Moura *et al.*, 2009). No estado do Rio de Janeiro, geralmente, são encontrados em todo o território e todas as microrregiões, desde áreas isoladas como a Ilha Grande, restingas (Cerqueira *et al.*, 1993; Gentile *et al.*, 1995), serras (Gentile *et al.*, 2004), áreas rurais (Gentile *et al.*, 2000; Bonecker *et al.*, 2009), baixadas, cidades perto das matas, em área de peridomicílio ou periurbanas (Pessôa *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2013).



Fonte: Os Marsupiais do Brasil

Figura 4: Mapa indicando a distribuição de *Didelphis marsupialis* e *Didelphis aurita* no Brasil nos diferentes biomas.

Este marsupial é classificado como sendo de pequeno porte, com comprimento da cabeça e corpo entre 355 e 450 mm, comprimento da cauda entre 298 e 470 mm e massa corporal entre 670 e 1882 g (Reis *et al.*, 2006). Apresenta uma listra escura na face e outra sobre os olhos. A orelha é grande, desprovida de pelos e o pavilhão auditivo é completamente negro (daí vem o nome vulgar gambá de orelha preta). Sua coloração dorsal poder ser negra ou grisalha, devido à presença de pelos-guarda brancos que se sobressaem aos pelos de cobertura negros. A pelagem ventral é creme-amarelada. A cauda é preênsil, forte, preta em sua parte basal seguida por um branco-amarelado; está coberta de pelos apenas na região próxima ao corpo. As fêmeas possuem

marsúpio (bolsa) bastante definido, com até 13 tetas. O tempo de gestação é de 13 dias e de lactação é, em média, de 90 a 100 dias (Walker *et al.*, 1964). Os filhotes passam um período de oito a 15 dias no ninho, enquanto a mãe forrageia por comida; o cuidado parental é apenas materno (Shirai, 2008). A espécie apresenta dimorfismo sexual, sendo os machos maiores que as fêmeas.

Didelphis aurita tem dieta frugívora/onívora de uma maneira oportunista (Paglia *et al.*, 2012; Casella, 2011), com certa variação no consumo dos itens, incluindo na sua dieta pequenos vertebrados (roedores, aves, lagartos, serpentes, anfíbios anuros) e uma grande diversidade de invertebrados (Leite *et al.*, 1996) (Mollusca, Crustacea, Arachnida, Chilopoda, Diplopoda, Blattariae, Coleoptera, Isoptera, Hymenoptera, Diptera, Hemiptera, Dermaptera, Formicidae e Orthoptera). Estes artrópodes característicos da fauna de folhíço, e a sua relação com a característica de seu micro-habitat indicam que a quantidade de folhíço seja importante para sua alimentação (Freitas *et al.*, 1997). Também alimenta-se de frutos e sementes (Sapindaceae, Bromeliaceae, Myrtaceae, Araceae, Passifloraceae, Cactaceae e Solenaceae) (Santori *et al.*, 1995; Palma, 1996; Cáceres & Monteiro-Filho, 2001; Ceotto *et al.*, 2009), ovos e em áreas antropizadas ataca criações, podendo-se alimentar também de itens encontrados no lixo doméstico (Santori, 1995). A presença de pupas de dípteros nas fezes pode ser um indicador do consumo de carniça (Santori *et al.*, 1995).

1.8 *Didelphis* spp. como hospedeiro de zoonoses

O parasitismo é uma associação que pode ser harmoniosa ou desarmoniosa entre dois organismos, caracterizada pela disposição unilateral de benefícios. O indivíduo que depende metabolicamente do outro é o parasita; aquele que fornece o ambiente para o parasita é o hospedeiro. Dependendo da localização aonde seja encontrado, os parasitas recebem uma classificação específica quanto ao seu habitat: quando são encontrados nas cavidades abdominal e torácica, no interior dos sistemas, no interior dos órgãos e tecidos, estes são chamados por endoparasitas ou hemoparasitas e quando são

encontrados sobre a superfície corporal externa são chamados de ectoparasitas.

No Brasil, segundo a Lei de Proteção à Fauna (5197/67) fica proibido o exercício da caça profissional, a utilização, matar, perseguição, destruição, caça ou apanha de espécimes da fauna silvestres, nativos ou em rota migratória, sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente, o caçador que for capturado responde pela Lei de Crimes Ambientais Lei (9.605/98), mesmo com uma legislação ambiental forte, juntamente com uma fiscalização atuante dos órgãos de fiscalizador, ainda é recorrente o consumo de carne de caça por todo o território, a caça de animais silvestres nunca deixou de existir no Brasil e é um dos principais fatores que levam à extinção de espécies ameaçadas, sendo o gênero *Didelphis* spp. um dos mais consumidos devido sua proximidade com as residências, tolerância a antropização, abundância e facilidade de sua captura.

Estes animais são importantes hospedeiros de zoonoses, pouco se sabe acerca da distribuição geográfica no território nacional das espécies de helmintos causadores dessas zoonoses destes animais, tão pouco seus riscos de transmissão. Os pequenos mamíferos (marsupiais e roedores) apresentam endoparasitas importantes para a saúde pública, tais como os helmintos: *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose manônica (Barbosa; Coelho, 1954), *Echinostoma* spp., causador de equinostomíase (Antunes, 2005), *Trichuris* spp., causador da trichuríase (Antunes, 2005), *Lagochilascaris* spp. causador da lagochilascariíase (Sprent, 1982), *Strongyloides* spp. causador da estrogiloidíase (Froes, 1976), *Capillaria* spp. causador da capilaríase, *Ancylostoma* spp. causador da ancilostomíase, *Necator* spp. causador da necatoríase, *Haemonchus* spp. causador da Hemoncose, *Ascaris* spp. causador da ascaridíase, *Dirofilaria* spp. causador da dirofilariose, *Onchocerca* causador da oncocercose (Vicente *et al.*, 1997), *Gnathostoma* spp. causador da Gnatostomíase (Albuquerque *et al.*, 2007), *Amphimerus* spp. causador da opistorquiase, (Thatcher, 2006), *Paragonimus* spp. causador da paragonimiose (Thatcher, 2006), *Diphyllobothrium* spp. causador da difilobotríase ou esparganose por suas formas larvais (Thatcher, 2006), *Trichinella* spp. causadora da trichinose (Thatcher, 2006).

Os protozoários apresentam grande importância nas infecções entre os seres humanos: *Trypanosoma cruzi* (Lainson, 1979) causador da tripanossomíase americana, *Leishmania chagasi*, *L. brasiliensis* são agentes causadores da leishmaniose (Jansen, 2002), *Toxoplasma gondii* é o causador da toxoplasmose (Thatcher, 2006), *Babesia ernestoi* é a causadora da babesiose (Serra Freire, 1979), *Sarcocystis garnhami* é uma das causadoras da sarcocistose (Mandour, 1965), *Isospora* spp. é causador da isosporíase (Volk, 1938), *Trichomonas* spp. é o causador da Tricomoníase (Henger, Ratcliffe, 1927), *Babesia* spp. é o agente etiológico causador da babesiose transmitido por um ectoparasita, mas foi encontrada circulante no sangue de *Didelphis albiventris* (Roca-Garcia, 1945).

As bactérias não menos importantes também tem sua parcela de agentes zoonóticos: *Salmonella* spp. causadora da salmonelose (Pinheiro *et al.*, 1974), *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose (Taylor; Burrell, 1968), *Borrelia recurrentis* causadora da febre recorrente (Dunn; Clark, 1933), *Francisella tularensis* e *Pasteurella multocida* são causadoras da Tularemia (Francis, 1937; Pucak *et al.*, 1969), *Streptococcus* spp. causa endocardite bacteriana (Vakilzadeh *et al.*, 1970), *Staphylococcus aureus* causa Infecções cutâneas (Thrasher *et al.*, 1971), *Proteus mirabilis* causa calculo renal (Thrasher *et al.*, 1970), *Leptospira* spp. é causadora de leptospirose (Santa Rosa *et al.*, 1975), *Pseudomonas aeruginosa* causa infecções do trato urinário, infecções no sistema respiratório, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções oftalmológicas, infecções ósseas e articulares e outras infecções sistêmicas, *Escherichia coli* pode causar infecção urinária, *Klebsiella* spp. pode causar trato urinário (Thrasher *et al.*, 1971), *Bordetella bronchiseptica* pode causar bronquite infecciosa (Switzer *et al.*, 1966), *Coxiella burnetii* é a causadora da Febre Q (Derrick, 1944), *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico causador da riquetsiose transmitido por um ectoparasita, mas foi encontrada circulante no sangue de *Didelphis aurita* (Dias, Martins, 1939).

As arboviroses não relatadas nesses animais como sendo importantes, o animal a partir do qual o agente é obtido pode ser um hospedeiro incidental que não está no ciclo de transmissão que mantém o vírus na natureza. Os marsupiais provavelmente não desempenham papéis importantes como

reservatório ou bons hospedeiros amplificadores de arboviroses, não se revelando uma fonte potencial de infecção para a população humana.

1.9 Justificativa

Infecções por helmintos de mamíferos, ganharam um maior interesse de pesquisadores e médicos-veterinários, devido à maior morbidade e fraca gravidade clínica que provocam para os animais silvestres (Prestwood, 1977), sinantrópicos (Simões *et al.*, 2011b), domésticos (Brianti *et al.*, 2012) e de produção (Traversa *et al.*, 2014). Seguindo-se o conceito de “one world, one health” (um mundo uma saúde) (Cardiff *et al.*, 2008; Osburn *et al.*, 2009), o conhecimento das espécies de helmintos que parasitam os mamíferos silvestres é fundamental para se entender a etiologia e o diagnóstico das doenças helmínticas do ser humano e de outros animais. Os helmintos de animais silvestres continuam sendo negligenciados havendo uma carência de investigações com propósito para avaliar suas distribuições geográficas, grau de especificidade, e grau de ameaça para a saúde humana, silvestre, dos animais de produção e dos animais de companhia.

A ocorrência de infecção humana por helmintos parasitos de animais silvestres tem sido atribuída ao aumento das áreas de interface das populações urbanas ou rurais com áreas silvestres onde ocorrem espécies de mamíferos reservatórios desses agravos, devido ao contínuo processo de urbanização e avanço humano sobre as áreas florestais. Apesar de sua importância para a saúde pública, pouco se sabe acerca da distribuição geográfica no território nacional das espécies de helmintos causadores de zoonoses, assim como sobre a estrutura das comunidades onde estão inseridas e seus potenciais de transmissão. No Brasil, pequenos mamíferos (marsupiais e roedores) já foram relatados hospedando helmintos parasitos de caráter reconhecidamente zoonóticos.

Os estudos de composição e riqueza de comunidades de parasitos em populações de hospedeiros indicam que estes mudam no espaço (Dogiel, 1964; Jiménez *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006). Hospedeiros com similaridades em relação a sua distribuição geográfica, filogenia, ecologia e biologia tendem a apresentar comunidades de parasitos mais similares, sendo

tais características capazes de afetar os modos de transmissão ou estabelecimento dos parasitos (Pence, 1990; Poulin, 2003; Krasnov *et al.*, 2005; Krasnov *et al.*, 2010a; 2010b; Poulin, 2010).

De acordo com esta visão, a saúde deve ser vista de maneira integrada visando prevenir ou controlar a exposição a agentes parasitários potenciais, através de abordagens multidisciplinares envolvendo estudos da biodiversidade e relação das espécies com a saúde e o ambiente (Gentile & D'Andrea, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Descrever a composição de espécies e analisar a estrutura das comunidades de helmintos do gambá *Didelphis aurita* da Mata Atlântica nas escalas de infracomunidade e comunidades componentes, considerando-se três ambientes, peridomicíliar, silvestre e rural no Estado do Rio de Janeiro.

2.2 Objetivos específicos:

Identificar as espécies de helmintos encontradas em *D. aurita* nas três áreas considerando-se ambientes silvestres, periurbano e rural.

Analisar a estrutura das comunidades nos níveis de infracomunidade e comunidade componente estimando-se as abundâncias, intensidades, prevalências, riquezas e associação de espécies de helmintos encontradas em cada ambiente.

Comparar estes parâmetros parasitológicos obtidos entre os ambientes estudados.

Analisar a estrutura da metacomunidade de helmintos considerando-se os três ambientes estudados.

Comparar os resultados encontrados com a helmintofauna de *D. aurita*, *D. marsupialis* e *D. albiventris* descritos em literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Este trabalho foi feito em três tipos de ambiente dentro da Mata Atlântica, sendo eles: periurbano, silvestre e rural (Figuras 5 e 6). O ambiente periurbano compreendeu áreas do Campus Fiocruz da Mata Atlântica (CFMA) na área de amortecimento do Parque Estadual da Pedra Branca (PEPB) e a sede Pau-da-Fome do PEPB, no Município do Rio de Janeiro. O ambiente silvestre compreendeu três localidades dentro do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), Bonfim, Uricanal e Águas do Imperador no município de Petrópolis. O ambiente rural compreendeu as localidades de Pamparrão e Porteira Verde no município de Sumidouro. As coletas realizadas no Campus Fiocruz da Mata Atlântica (CFMA) e PEPB estavam inseridas dentro de um projeto maior intitulado “Ecologia de populações e comunidades de pequenos mamíferos e seus parasitos no Maciço da Pedra Branca e arredores, RJ” coordenado pela Dra. Rosana Gentile (FIOCRUZ). As coletas realizadas no PARNASO estavam inseridas dentro de um projeto maior intitulado “Programa de Pesquisa em Biodiversidade-PPBio Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica”, coordenado pelo Dr. Rui Cerqueira (UFRJ).

3.1.1 Ambiente Periurbano – Município do Rio de Janeiro

A área de estudo desse projeto fica na região de Jacarepaguá, onde se localiza o CFMA, esta já foi ocupada, anteriormente, por engenhos de cana-de-açúcar e café, e posteriormente apresentou núcleos de ocupação territorial, que se desenvolveram principalmente da confluência dos caminhos e em volta das fazendas, começando feições urbanas com grandes residências e estradas. Em 1912 iniciou-se o processo de implantação de uma colônia psiquiátrica com a desapropriação de áreas de engenho. Somente na década de 90 iniciou-se um processo de municipalização desta colônia, sendo que o

setor hospitalar, atual IMASJM (Instituto Municipal de Assistência à Saúde Juliano Moreira), passou a ser gerido pela Secretaria Municipal de Saúde e uma grande parte do terreno, caracterizado como área de preservação ambiental, passou a pertencer à FIOCRUZ.

O CFMA está localizado na vertente leste do Maciço da Pedra Branca, sobrepondo-se parcialmente ao Parque Estadual da Pedra Branca acima da cota de 100 m de altitude. Cerca de 90% da área do CFMA encontram-se inseridos na bacia hidrográfica do Córrego do Engenho Novo (área total de 5,06 km²), efluente do rio Guerenguê, que forma o Arroio Pavuna. Os 10% restantes da área do CFMA encontram-se na bacia hidrográfica do Rio Pavuninha.

O Parque Estadual da Pedra Branca está localizado na Zona Oeste do município do Rio de Janeiro, é a maior floresta urbana do país, sendo um dos principais remanescentes do bioma Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro. Apresenta uma área de 12.500 hectares, abrangendo os bairros de Jacarepaguá, Vargem Grande, Vargem Pequena, Guaratiba, Campo Grande, Senador Camará, Bangu e Realengo, ocupando 11% do território da Cidade do Rio de Janeiro.

O PEPB constitui um maciço montanhoso, com cobertura vegetal típica de Mata Atlântica de floresta ombrófila densa, também chamada de mata de encosta, é um tipo de vegetação caracterizado como mata perenifólia (ou sempre verde).

Foram amostradas áreas de peridomicílio, de mata perturbada e de mata preservada próximas às áreas urbanas (Tabela 1) (Figura 7). As áreas de peridomicílio situavam-se próximas às residências, passando hora por dentro do quintal dos moradores hora dentro do CFMA e quando no PEPB ocorrendo o mesmo tipo de situação. Os transectos apresentavam pontos com alagamento no decorrer das trilhas ou até mesmo pequenos corpos d'água como no PEPB, sub-bosque aberto na maior parte dos transectos com dossel variando de 6 a 20 metros, predominância de árvores de pequeno e médio porte e relevo variando de plano, pouco inclinado a inclinado. As áreas de mata perturbada localizavam-se em áreas de floresta degradadas em processo de regeneração e apresentavam alguns pontos alagados, sub-bosque semiaberto com dossel variando de 6 a 20 metros, predominância de árvores de grande

porte com ocorrência de muitas árvores de médio porte em alguns pontos, e relevo plano, pouco inclinado a inclinado. As áreas de mata preservada apresentavam sub-bosque semiaberto com dossel de 10 a 40 metros, predominância de árvores de médio e grande porte, esta área de coleta foi estabelecida as margens do Rio Camorim, com distâncias entre 15 e 100 metros, o relevo varia de plano a inclinado.

A paisagem geral do CFMA é formada por um mosaico de paisagens, contendo desde áreas com vegetação em avançado estágio de sucessão ecológica, passando por estágios intermediários e iniciais, agricultura, até áreas com urbanização consolidada. O clima da região é tropical úmido ou superúmido, sem estação seca, sendo a temperatura média do mês mais quente superior a 18°C. O total das chuvas do mês mais seco é superior a 60 mm, com precipitações maiores de março a agosto, ultrapassando o total de 1.500 mm anuais. Nos meses mais quentes (janeiro e fevereiro) a temperatura é de 24 a 25°C (Ayoade, 1986).

3.1.2 Ambiente Silvestre - Parque Nacional da Serra dos Órgãos – Município de Petrópolis

O Parque Nacional da Serra dos Órgãos – PARNASO - RJ tem 20.000 mil hectares, está localizado na região serrana do Estado, distante cerca de 80 quilômetros da Cidade do Rio de Janeiro, encontrando-se entre os municípios de Teresópolis, Petrópolis, Magé e Guapimirim. É um dos principais remanescentes de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, internacionalmente reconhecido como Reserva da Biosfera. (RBMA, 1996), área-chave para a conservação da biodiversidade no leste brasileiro (Bencke *et al.*, 2006). A Serra dos Órgãos foi identificada pelo Ministério do Meio Ambiente como área de extrema importância biológica por sua flora, fauna de vertebrados, invertebrados e fatores abióticos (MMA, 2002). Sua avifauna é particularmente importante, representando 65% do total de espécies endêmicas do bioma (Bencke *et al.* 2006); ainda, o parque abriga um dos únicos estudos de longo prazo (15 anos) de mamíferos do Brasil (Loretto, 2012) e ocupa posição central no Corredor Ecológico da Serra do Mar (Aguiar

et al., 2005), definido como uma das áreas estratégicas pelo Projeto Parques e Reservas (MMA, SCA, IBAMA, 2001) e para o Mosaico da Mata Atlântica Central Fluminense (Costa *et al.*, 2010).

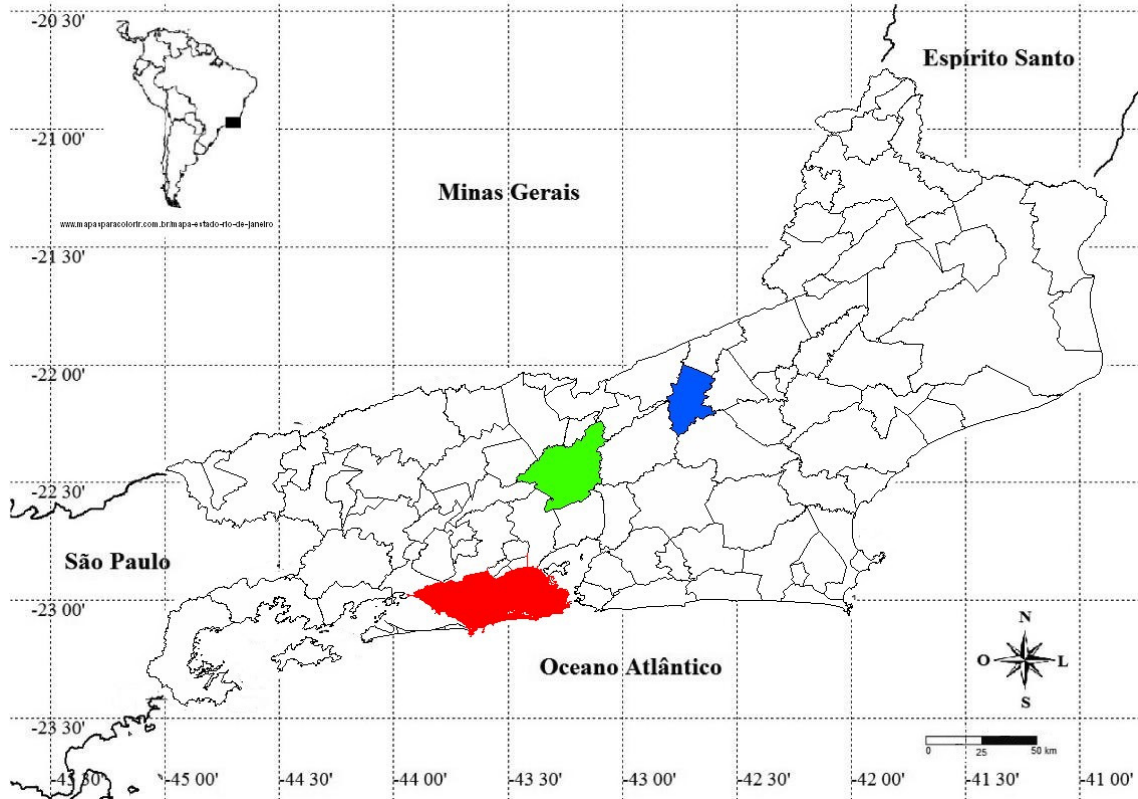


Figura 5: A localização dos municípios das áreas de estudo dentro do mapa do Estado do Rio de Janeiro: em vermelho Rio de Janeiro, em verde Petrópolis e em azul Sumidouro. Fonte: LABPMR.

O PARNASO situa-se no domínio da Mata Atlântica, localizado na região fitoecológica fluminense classificada como Floresta Ombrófila Densa, as coberturas florestais variam de acordo com as cotas altimétricas. As coletas foram feitas entre 800 e 1000m. Entre 500 e 1.500 metros a vegetação é classificada como floresta montana. Esta é a formação que possui maior estratificação vegetal entre as diferentes fisionomias da Mata Atlântica com árvores atingem até 40 metros, e o dossel superior encontra-se entre 25 e 30 metros. O estrato arbóreo é dominado por grandes árvores. O estrato herbáceo é povoado por begônias, orquídeas, bromélias lianas, samambaias e gramíneas, além de jovens das espécies arbóreas de tamanho semelhante ao

das espécies herbáceas e arbustivas. O município de Petrópolis abrange a maior totalidade da área do Parque, representando cerca de 43% (ICMBIO, 2014). O estudo foi desenvolvido em uma região de Floresta Atlântica no município de Petrópolis – RJ, nas localidades de Bonfim, Águas do Imperador e Uricanal (Tabela 1) (Figura 8).

As áreas silvestres situavam-se dentro do Parque com no mínimo um quilometro dentro da mata preservada. Os transectos apresentavam pontos com alagamento no decorrer das trilhas, pequenos corpos d'água, rios ou eram em área com ausência de áreas alagadas. O sub-bosque era semiaberto ou fechado na maior parte dos transectos com dossel variando de 15 a 50 metros, predominância de árvores de grande porte com ocorrência de muitas árvores de médio porte em alguns pontos relevo variando de plano, pouco inclinado a muito inclinado.

O clima do PARNASO e entorno é tropical de altitude, com inverno curto e seco e verão ameno. A temperatura média do mês mais quente é inferior a 22°C (Ayoade, 1986).

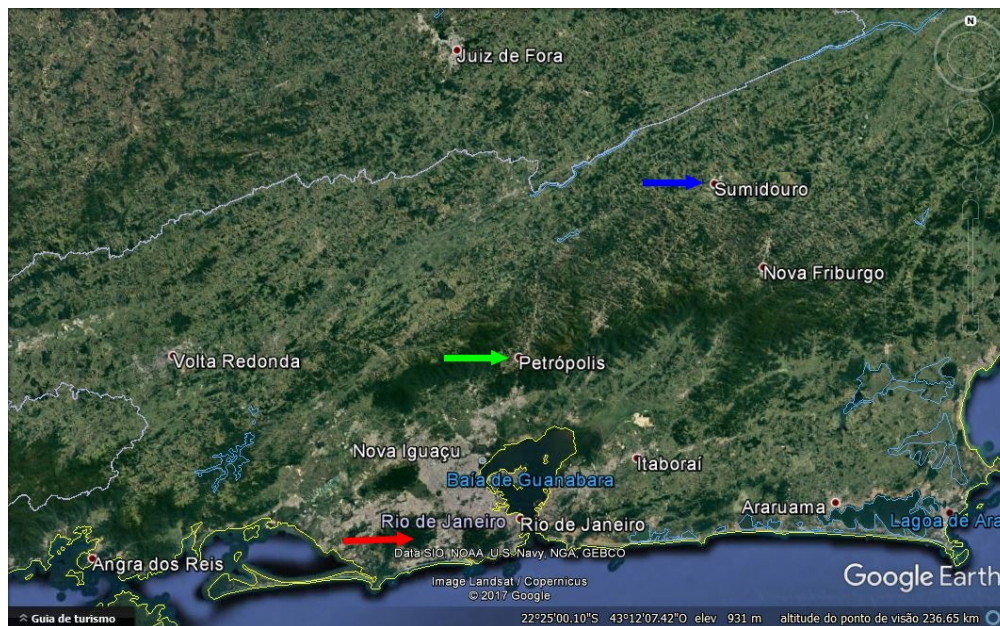


Figura 6: Imagem de satélite indicando das áreas de estudo CFMA- periurbano e Pau-da-Fome- periurbano (seta vermelha); Petropólis-silvestre, (seta verde) e Sumidouro-rural (seta azul). Fonte: Google Earth.

Tabela 1: Localidades de coleta dentro da área de estudo no Estado do Rio de Janeiro.

Localidade	Transectos	Município	Localização	Tipo de ambiente
CFMA	A	Rio de Janeiro	22°56'30.11"S e 43°24'31.59"W	Periurbano
CFMA	B	Rio de Janeiro	22°56'28.59"S e 43°24'35.82"W	Periurbano
CFMA	C	Rio de Janeiro	22°56'11.13"S e 43°24'06.65"W	Periurbano
CFMA	D	Rio de Janeiro	22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W	Periurbano
CFMA	E	Rio de Janeiro	22°56'41.40"S e 43°24'56.36"W	Periurbano
CFMA	F	Rio de Janeiro	22°56'47.74"S e 43°14'48.13"W	Periurbano
CFMA	L	Rio de Janeiro	22°56'46.10"S e 43°24'45.87"W	Periurbano
CFMA	K	Rio de Janeiro	22°57'11.02"S e 43°24'37.93"W	Periurbano
Pau da Fome	G	Rio de Janeiro	22°56'31.48"S e 43°26'20.11"W	Periurbano
Pau da Fome	H	Rio de Janeiro	22°55'57.41"S e 43°26'34.14"W	Periurbano
Pau da Fome	I	Rio de Janeiro	22°56'55.32"S e 43°26'36.66"W	Periurbano
Pau da Fome	J	Rio de Janeiro	22°55'04.85"S e 43°26'21.57"W	Periurbano
Pamparrão	Ponte	Sumidouro	22°02'09.49"S e 42°39'02.14"W	Zona rural
Pamparrão	Capim	Sumidouro	22°02'02.10"S e 42°38'58.30"W	Zona rural
Pamparrão	Quintal	Sumidouro	22°01'47.03"S e 42°39'13.46"W	Zona rural
Porteira Verde	Banqueta	Sumidouro	22°02'20.57"S e 42°39'23.53"W	Zona rural
Porteira Verde	Charco	Sumidouro	22°02'03.00"S e 42°39'43.20"W	Zona rural
Encanto	Plantação	Sumidouro	22°00'37.20"S e 42°38'35.90"W	Zona rural
Encanto	Mata	Sumidouro	22°02'43.11"S e 42°37'10.55"W	Zona rural
Encanto	Pousada	Sumidouro	22°02'17.33"S e 42°39'33.00"W	
Águas do Imperador	A	Petropolis	22°30'09.46"S e 43°07'12.33"W	Silvestre
Águas do Imperador	B	Petropolis	22°30'22.00"S e 43°06'50.00" W	Silvestre
Águas do Imperador	C	Petropolis	22°30'28.41"S e 43°06'24.33"W	Silvestre
Uricanal	D	Petropolis	22°29'45.44"S e 43°07'24.36"W	Silvestre
Uricanal	E	Petropolis	22°29'38.24"S e 43°07'06.15"W	Silvestre
Uricanal	F	Petropolis	22°29'19.56"S e 43°07'31.54"W	Silvestre
Uricanal	G	Petropolis	22°29'04.99"S e 43°07'02.50"W	Silvestre
Bonfim	H	Petropolis	22° 27'38.8"S e 43° 05'35.3" W	Silvestre
Bonfim	I	Petropolis	22°27'50.53"S e 43°05'17.78"W	Silvestre
Bonfim	J	Petropolis	22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W	Silvestre



Figura 7: Imagem de satélite da área de estudo Campus Fiocruz da Mata Atlântica e Pau da Fome dentro da zona de amortecimento do Parque Estadual da Pedra Branca que é caracterizado como mosaico de diferentes habitats, incluindo áreas preservadas e perturbadas, florestas e áreas de interface entre os ambientes silvestre e habitações humanas no perímetro urbano. Fonte: Google Earth.

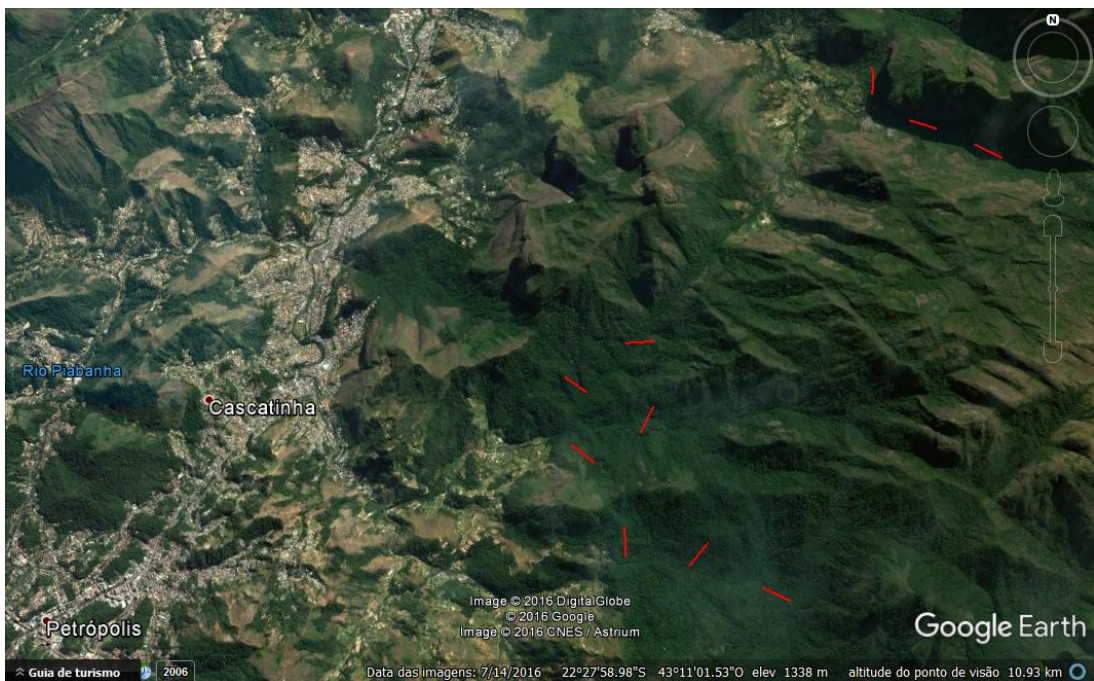


Figura 8: Imagem de satélite da área de estudo Parque Nacional da Serra dos Órgãos que é caracterizado como mata contínua. Fonte: Google Earth.

3.1.3 Ambiente rural – Município de Sumidouro

O município de Sumidouro-RJ está localizado na região serrana do Estado, distante cerca de 160 quilômetros da Cidade do Rio de Janeiro, encontrando-se entre os municípios de Nova Friburgo, Duas Barras, Carmo, Sapucaia, São José do Vale do Rio Preto e Teresópolis. Sua altitude média é de 348 metros acima do nível do mar, tendo como coordenadas geográficas 22° 02' 46" S de Latitude Sul e 42° 41' 21" de Longitude Oeste, a área total do município é de aproximadamente 395.516 km², e de acordo com o IBGE (2016), a população total é de 14900 habitantes, sendo que 87,7% se encontram na área rural e sua taxa de urbanização é a menor dentre os municípios do Estado do Rio de Janeiro, cerca de 15,4%. Segundo NIMER (1979), a região apresenta clima mesotérmico-úmido, com verão chuvoso e inverno seco caracterizado por duas estações climáticas: uma estação quente e úmida de Novembro a Março, com as mais alta temperaturas em Fevereiro e outra chuvosa, com período mais elevado em Dezembro (temperaturas normais variam de 23,2 °C até 25,4 °C e chuvas variando entre 269,4mm e 153,5mm), e uma estação seca e fria que vai desde de Maio a Outubro com temperaturas mínimas e meses mais secos que se estendem de Julho a Agosto (temperaturas normais variam entre 18,3 °C e 20,3 °C e Chuvas variando entre 24,7 mm e 44,2 mm) Dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia da estação do Carmo).

Desde o início do século XIX sua economia se baseia na agropecuária e pecuária. Atualmente, as principais fontes de renda da região são basicamente a agricultura, especialmente o cultivo de hortaliças e a pecuária da produção de leite junto a uma cooperativa.

Seu território ainda tem alguns fragmentos de remanescentes de Mata Atlântica de Floresta ombrófila densa, na sua grande maioria no alto das cadeias de montanhas. A degradação promovida pela ação antropogênica transformou a paisagem em uma matriz de áreas agrícolas e pastagem, e fragmentos com poucas árvores emergentes de 25 até 30m de altura. Dentro dos fragmentos a vegetação é densa e arbustiva, composta por samambaias, arbustos, bromélias, palmeiras, trepadeiras, epífitas e poucas samambaias. O

estudo foi desenvolvido em áreas rurais nas localidades de Porteira Verde e Pamparrão (Tabela 1) (Figura 9).

As áreas rurais situavam-se próximas às residências, pastagem, pasto com animais domésticos de produção, plantações (legumisonas, hortaliças), até chegar a borda de alguns fragmentos de mata, os transectos passavam dentro desse mosaico, hora acontecendo em apenas um tipo de ambiente desses ou hora em um ambiente mesclado entre esses diferentes ambientes. Os transectos apresentavam pontos com alagamento no decorrer das trilhas ou pequenos corpos d'água, a maioria era área aberta pertubado, as bordas de mata apresentavam sub-bosque aberto ou semi aberto com dossel variando de 3 a 15 metros, predominância de árvores de pequeno e médio porte e relevo variando de plano, pouco inclinado a inclinado perto. O clima de Sumidouro é tropical de altitude com inverno seco (com temperaturas inferiores a 18°C) e verão quente (com temperaturas superiores a 22°C) (Ayoade, 1986).



Figura 9: Imagem de satélite da área de estudo no município de Sumidouro-RJ caracterizado como zona rural.

3.2 Captura dos marsupiais

Os marsupiais foram coletados em transectos lineares formados de acordo com o projeto de pesquisa ou trabalho realizado, na área periurbana, 20 pontos de captura, com espaçamento de 15 metros, onde foi colocado 1 armadilha em cada estação no chão, as coletas foram feitas durante cinco noites consecutivas, na área silvestre e área rural foram 15 pontos de captura, com espaçamento de 20m onde foi colocado 1 armadilha em cada estação no chão e mais 3 pontos de captura no sub-bosque a ser decidido na hora da instalação. Cada estação foi marcada utilizando-se uma fita vermelha (de cetim ou algum produto compatível) marcada com uma caneta de retroprojektor que foi fixada usando como suporte algum arbusto ou plântula ou árvore de preferência na altura dos olhos. Entre cada ponto, foi colocado fitas intermediárias que permitiram sempre visualizar a direção a ser seguida até o próximo ponto, as fitas intermediárias foram identificadas com um nó. As armadilhas, sempre que possível, estavam abrigadas do sol e chuva. Os transectos foram identificados por letras e os pontos de captura identificados por números em sequência. Os transectos foram abertos com o auxílio do facão para realizar o corte na mata/floresta, uma bússola para manter o mais reto/linear possível o transecto e a trena para medir a distâncias entre os pontos. As coletas foram feitas durante cinco noites na área rural e dez noites de captura consecutivas na área silvestre.

As armadilhas utilizadas nos transectos são do tipo live-trap da marca Tomahawk® (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm), apropriadas para a captura de animais vivos com até 3Kg. Durante a montagem, todas as armadilhas foram testadas e verificadas quanto ao seu bom funcionamento.

Em cada armadilha foi colocada uma porção de isca e a composição da mistura e feita de pasta de amendoim, banana, aveia e bacon, (grãos, fruto, farelo, proteína animal), sempre considerando itens que apresentem forte odor para atração dos animais. A isca tem o intuito de ser generalista, abrangendo os principais hábitos alimentares deste animal.

As armadilhas foram vistoriadas diariamente no período da manhã. Os profissionais estavam usando os Equipamento de Proteção Individual (EPI). Só foi permitido a entrada dos profissionais nos transectos no mínimo em dupla.

Caso nenhum animal tivesse sido capturado na armadilha, era observado a condição da isca para eventual reposição e o funcionamento do mecanismo de desarme da armadilha para substituição da mesma, caso fosse preciso. A isca foi necessariamente substituída ou incrementada todos os dias.

Quando era encontrado um animal na armadilha, esta era removida e em seu lugar colocada uma nova armadilha, com nova isca. O mesmo procedimento era realizado caso fosse constatado vestígio de presença de animal (fezes e urina). Cada armadilha removida com o animal foi identificada com uma fita crepe contendo a identificação da trilha, o ponto de captura e data. A armadilha foi colocada individualmente em um saco plástico com capacidade entre 100 litros. Esta foi aberto apenas no momento do manuseio dos animais na base laboratorial de campo, com o uso de EPI.

O transporte dos animais do campo para base laboratorial foi feito em veículo do tipo Pick-up com cabine separada para o transporte dos pesquisadores onde não tiveram contato com a carroceria onde ficavam os animais.

O esforço de captura foi de 4560 armadilhas-noite para o ambiente periurbano, no ambiente silvestre foi de 2160 armadilhas-noite e na zona rural foi de 1330 armadilhas-noite, num total de 8050 armadilhas para todo o período estudado. As coletas dos animais foram feitas de acordo com as autorizações do SISBio/ICMBio (números das licenças 13373-1; 45839-1 em anexo), do Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA FIOCRUZ-RJ (número da licença L – 066/08; L – 049/08 e LW81/12 em anexo), e do Instituto Estadual do Ambiente-INEA (020/2011 em anexo), seguindo as normas de Biossegurança da Fundação Oswaldo Cruz (Lemos & D'Andrea, 2014). Os espécimes de marsupiais foram depositados na coleção do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Todos os animais capturados eram adultos: a faixa etária foi estimada através da dentição completa pela formula $P^3 M^4$ (P = Pré molares- M = Molares), a dentição superior e inferior dos dois lados, eram observadas, assim o lado mais desenvolvido prevaleceria (Macedo *et al.*, 2006). O animal mais leve com a dentição completa pesou 780 gramas e o mais pesado tinha 2900

gramas, assim como o menor animal mediu 657 milímetros corpo/cauda o maior animal mediu 860 milímetros corpo/cauda.



Figura 10: Armadilha Tomahawk® do tipo “live-traps”.

3. A eutanásia

Esse protocolo de eutanásia aplica-se para roedores, marsupiais e demais pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos capturados durante os trabalhos de campo ou referência do laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios.

A eutanásia dos animais foi realizada pelo veterinário responsável da equipe de campo, preferencialmente, por exanguinação (sangria total) em anestesia profunda de acordo com as resoluções em anexo (nº 714/2002; 876/2008 e 1000/2012) do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV.



Figura 11: Base laboratorial de campo para processamento das amostras no Município de Sumidouro-RJ.

Os animais foram pesados ainda no saco de pano com balanças manuais da marca Pesola. O peso do saco foi descontado para o cálculo do peso do animal e ajuste da dose do anestésico. O tempo de permanência do animal dentro do saco de pano foi de cerca de 5 a 10 minutos, que é o tempo gasto entre sua pesagem, ajuste da dose do anestésico e início do efeito da anestesia.

A anestesia é feita com os animais ainda contidos nos sacos de pano. Os pesos aferidos na etapa anterior foram utilizados para cálculo da dose adequada. Os protocolos anestésicos incluem Cloridrato de ketamina (100mg/ml) associado a: (i) Cloridrato de xilazina (20mg/ml) na proporção 1:1 para os marsupiais. Dose: 0,15ml/100g. Tempo de duração: 20-30 minutos, sendo a manutenção da anestesia, quando necessário (usualmente não é) com metade da dose inicial.

No caso de impossibilidade de sua realização (sangria total), foi realizada inoculação intra-cardíaca de Cloridrato de Ketamina, numa superdosagem acima de 50 mg/Kg de peso ou injetado Cloreto de Potássio, via intra-cardíaco, segundo a dosagem Cloreto de Potássio – 2,56 mEq/Kg (1,91g de KCl em 100 ml de água destilada), Dosagem Letal: 1 ml/Kg. A sua aplicação está restrita a pequenos mamíferos e aplicável somente após anestesia geral prévia e após confirmada a ausência do reflexo corneal (Resoluções 714/2002; 876/2008 e 1000/2012 do CFMV).

4 **CAPÍTULO 1**

**Helmintofauna de *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826
(Didelphimorphia, Didelphidae), em três ambientes distintos da Mata
Atlântica no Estado do Rio de Janeiro**

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico e a identificação de parasitos de animais silvestres são fundamentais para a compreensão da estrutura e funcionamento dos ecossistemas, com implicações importantes nos estudos de conservação, sistemática, epidemiologia, ecologia e controle de doenças parasitárias. Dentro do contexto de “Uma Saúde”, os parasitos de animais silvestres também podem representar um risco para a saúde humana, saúde pública e animal. Apesar disso, a maioria dos inventários de biodiversidade não consideram os parasitos em seus estudos.

1.1 Breve histórico da helmintologia dos marsupiais do Brasil

Desde do século XIX, os helmintos começaram a figurar nos trabalhos de Humboldt (1809). Alguns anos mais tarde, Rudolphi (1819) em sua publicação “Entozoorum synopsis”, descreveu várias espécies de helmintos que são reconhecidas como espécies válidas até hoje. Diesing (1851), no “Systema Helminthum” incluiu os endoparasitas de marsupiais em seus estudos. Janicki (1904) descreveu a espécie *Cochoristica bivittata*, mas em 1946 (Akhumian) modificou o nome do gênero para *Mathevotaenia* e Santos (1968) redescreveu a espécie.

No Brasil, os estudos de Travassos (1913), realizados desde o início do século XX até a segunda metade do século XX (1971), ganharam importância particularmente no que se refere a diversidade da helmintofauna brasileira dos marsupiais onde os mesmos estavam parasitados por helmintos dos filos Acantocefala, Nematoda e Platelminhos. De fato, Travassos foi um dos primeiros discípulos de Oswaldo Cruz como helmintologista, tendo escrito 181 trabalhos de grande valor científico, sendo, com certeza, um dos pesquisadores brasileiros mais conhecidos no exterior.

Na década de 50 e 60 foram realizados vários trabalhos importantes como o “Systema Helminthum” de Yamaguti em três volumes (1958 - Trematoda, 1959 - Cestoda e 1961 - Nematoda), aumentando significativamente o número de trabalhos publicados para os endoparasitas da

ordem Didelphimorfia. Travassos, Freitas & Konh (1969) publicaram a revisão “Trematódeos do Brasil” em um fascículo único das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, onde incluíram a descrição dos helmintos, os hospedeiros e o sítio de infecção.

O Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, RJ, Brasil, tem papel fundamental na taxonomia dos helmintos de marsupiais no Brasil. A equipe de pesquisadores deste laboratório contribuiu com a identificação de várias espécies de helmintos destes marsupiais, onde podemos destacar as seguintes publicações: Vicente, 1966; Gomes & Pinto, 1972; Pinto & Gomes, 1976; Gomes, 1977; Pinto & Gomes, 1978; Gomes & Pinto, 1978; Gomes, 1979a; b; Pinto & Gomes, 1980; Vicente & Pinto, 1981; Vicente *et al.*, 1982; Vicente *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1990; Vicente *et al.*, 1997; Noronha *et al.*, 2001; Noronha *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003. Todos estes trabalhos colaboraram para aumentar o conhecimento sobre a helmintofauna dos marsupiais brasileiros.

De acordo com Rossi *et al.* (2006), Gardner (2007) e Pavan *et al.* (2012), existem 15 gêneros e 56 espécies de marsupiais no Brasil, dos quais apenas 16 espécies já foram, pelo menos uma vez, encontradas parasitadas por algum helminto. Apesar disso, são conhecidas apenas 88 espécies de helmintos parasitos de marsupiais do Brasil, havendo poucos relatos da helmintofauna destes animais. Contudo, recentemente têm sido publicadas descrições e re-descrições taxonômicas de helmintos parasitos de marsupiais (Chagas-Moutinho *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015). Dente estes, o gênero *Didelphis* é o mais parasitado por helmintos, apresentando a maior diversidade de espécies. Os principais fatores que contribuem para este fato são sua ampla distribuição geográfica ocupando todos os grandes biomas (Nowak, 1991; Emmons & Feer, 1997; Gardner, 2007), o hábito escansorial, mas predominantemente terrestres e ocasionalmente arborícolas (Cordero & Nicolas, 1987; Julien-Lafférière & Atramentowicz, 1990; Santori *et al.*, 1995; Passamani, 1995; Cherem *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 1996; Passamani, 2000; Cunha & Vieira, 2002; Grelle, 2003; Loretto & Vieira, 2005), sua dieta, que é composta de pequenos animais vertebrados e invertebrados. (Cabrera & Yepes, 1960; Santori *et al.*, 1995; 1997; Cherem *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1999; Cáceres &

Monteiro-Filho, 2001; Cunha & Vieira, 2002; Cáceres, 2004; Ceotto *et al.*, 2009; Casella, 2011), e pelo seu hábito sinantrópico (Gentile, *et al.*, 2000). Os gambás também destacam-se pela sua grande abundância e importância na saúde pública, uma vez que são importantes reservatórios de zoonoses (Xavier *et al.*, 2014) e estão presentes em todos os biomas (Martins *et al.*, 2004; Cáceres *et al.*, 2012).

O objetivo deste capítulo foi estudar a helmintofauna e identificar as espécies de helmintos Trematoda, Cestoda, Nematoda e Acantocephala do gambá de orelha preta *Didelphis aurita* Wied-Neuweid, 1826 da Mata Atlântica considerando-se áreas de três ambientes distintos no Estado do Rio de Janeiro: ambientes periurbano (Campus Fiocruz da Mata Atlântica, e Parque Estadual da Pedra Branca, Rio de Janeiro), silvestre (Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Petrópolis) e rural (Porteira Verde e Pamparrão, Sumidouro).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Métodos de coleta, fixação e identificação dos helmintos

A coleta e diagnóstico dos helmintos foram feitos através de pesquisa nas cavidades torácica e abdominal, no interior dos sistemas, no interior dos órgãos e tecidos. Foi feito um corte longitudinal no tronco seguindo a linha alba, pele e musculatura abdominal, no sentido da pelve até o tórax parando no processo xifoide do osso externo, para alcançar a cavidade torácica o músculo diafragma era cortado e estes órgãos eram retirados. Os animais foram dissecados, ocorreu a retirada dos órgãos, estes foram separados e colocados em placas de Petri individualizados, onde foram lavados em solução salina (NaCl a 0,85% (tipo de mantenedor)), abertos ou dilacerados, foram examinados minuciosamente utilizando técnicas específicas desenvolvidas ou adaptadas para as espécies.

Todos os helmintos recuperados foram reservados em placa de Petri com solução salina (NaCl a 0,85%) individualizados pelo número de registro, sítio de localização no hospedeiro. Os exemplares de helmintos com mais de 0,5 milímetros foram observados a vista desarmada e foram transferidos dos locais nos quais foram encontrados, com o auxílio de pinça ou estilete, para

placa de Petri ou bandeja com tamanho adequado ao do parasito e contendo solução fisiológica e rotulo de identificação do hospedeiro e habitat do helminto. As espécies com tamanho inferior a 0,5 milímetros, em geral, só foram visualizados e coletados com auxílio de microscópio estereoscópico. Após a coleta dos parasitas, estes foram limpos com auxílio de um pincel.

O processamento dos helmintos desses animais apresentam muitas particularidades que devem ser respeitadas, para que os parasitos possam ser devidamente preparados e os seus caracteres taxonômicos que os identificam sejam preservados para posteriormente serem observados.

Foram utilizados fixadores químicos para fixar os espécimes de helmintos: AFA (93 partes de etanol 70%, 5 partes de formol 0,4% e 2 partes de ácido acético 100%), Etanol Absoluto, Álcool Etilico 70% Glacial, Paraformaldeido, Karnovsky, Glutaraldeido, Millonig.

Os nematóides recolhidos foram fixados em AFA aquecido a 65°C (essa etapa de fixação é chamada de Físico-Química), ocorre a substituição da solução fisiologia pelo fixador que é líquido conservador, e alguns espécimes foram mantidos em etanol para estudos moleculares, parte dos nematoides foram diafanizados com lactofenol ou álcool glicerinado. (Amato *et al.*, 1991). Para algumas espécies foram efetuados cortes transversais com auxílio de um microscópio estereoscópico. Os cortes transversais foram montados entre lâmina e lamínula, ladeada por duas lamínulas a fim de possibilitar uma visão transversal da secção.

Os platelmintos da classe: Trematoda e Cestoda foram retirados do local em que foram encontrados e transferidos para placa de Petri contendo solução fisiologia, quando destinados a preparação de lâminas para estudos morfológicos, por possuir o corpo achatado dorso/ventral, foram sempre fixados comprimidos no sentido dorso ventral, entre lâminas mantidas úmidas amarrando-as com barbante ou elástico ou entre lâmina e lamínula (dependendo da espessura do parasita foi usado cortes de vidro um sobre o outro) para distensão da musculatura. Os platelmintos form comprimidos imersos na solução fixadora, preferencialmente, AFA a frio, onde permaneceram por aproximadamente 24 horas, foi tomado o cuidado de manter as lâminas na vertical. Para os trematódeos e os cestódeos é recomendado o relaxamento muscular, antes da fixação, para tanto devem ser

mantidos em solução fisiológica e mortos sob a ação de frio, no refrigerador. Passado o período de fixação os parasitos foram retirados das lâminas e mantidos na solução conservadora, estas era o próprio AFA ou Álcool Etílico 70% (Amato *et al.*, 1991).

Parte dos dos trematódeos, os cestóides foram corados com Carmim de Langeron ou com Hematoxilina de Delafield, diferenciados com álcool clorídrico a 0,5 %, desidratados em série alcoólica crescente, diafanizados em salicilato de metila e fixados em Bálsamo do Canadá com preparação permanente (Amato *et al.*, 1991).

Os Acantocéfalos, alguns foram fixados comprimidos outros não, o procedimento foi o mesmo dado para trematódeos e os cestóides. Os espécimes foram mortos a frio, em água destilada, no refrigerador, para protraírem a probóscide. Os espécimes maiores serão mortos através do fixador AFA frio e comprimidos entre lâminas para protração da probóscide (Amato *et al.*, 1991).

Algumas espécies dos espécimes foram reservadas pra análise molecular, sendo colocados em criotubos resfriamento no nitrogênio líquido, ou eppendorffs para serem resfriado a -20 °C, ou fixados em Etanol Absoluto, ou Álcool Etílico 70%.

Algumas espécies dos espécimes foram reservadas pra análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), fixados AFA, Paraformaldeido, Karnovsky, Glutaraldeido, e Histologia em Millonig ou Formalina 10%.

Os helmintos encontrados foram armazenados em tubos de vidro e/ou microtubos de acordo com o órgão encontrado e foi dado uma classificação prévia (Trematoda, Cestoda, Nematoda ou Acantocefala) até a identificação mais específica, contagem dos espécimes e separação de acordo com o sexo do helmintos caso não fossem hermafroditas.

Os tubos receberam uma etiqueta padrão (Ver anexo) contendo as informações referentes a cada espécime coletado como: Número de LBCE que é o número da Ficha de Registro de cada espécie, a data da coleta da amostra, localização por órgão ou sítio, fixador utilizado na fixação e conservação.

As informações geradas diariamente durante o período da expedição foram anotadas individualmente na ficha de Registro de cada espécime que foi positivo para helminto: Na observação constava o grupo zoológico a qual o

helminto pertence, o órgão ou sítio de localização, tipo de fixação utilizada na fixação e conservação dos helmintos.

Os demais espécimes foram montados entre lâmina e lamínula e analisados com auxílio de microscópio de luz (Axio Scope.A1 – Zeiss acoplado a câmara digital Axio Cam MRc) para fotomicrografia.

Os aspectos morfológicos específicos foram usados na identificação dos espécimes de acordo com Travassos *et al.* (1937), Yamaguti (1961), Khalil *et al.* (1994), Vicente *et al.* (1997), Gibson *et al.* (2002) e Jones *et al.* (2005), Anderson *et al.* (2009), além dos artigos de descrição das espécies relacionadas.

Todos os helmintos foram identificados no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz situado na Fundação Oswaldo Cruz-RJ.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A helmintofauna de *Didelphis aurita* na mata atlântica

4.1.1 Taxonomia das espécies de nematoides de *Didelphis aurita*

Espécie: *Trichuris minuta* Rudolphi, 1819 (Sinonímia: *Trichocephalus minuta* Rudolphi, 1819) (Figura 1)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Enoplea

Subclasse: Dorylaimia

Ordem: Trichocephalida

Superfamília: Trichinelloidea

Família: Trichuridae Railliet, 1915

Subfamília: Trichurinae Ransom, 1911

Gênero: *Trichuris* Roederer & Wagler, 1761 (Sinonímia: *Trichocephalus* Goeze, 1782; *Trichocephalos* Schrank, 1788; *Mastigodes* Zeder, 1800; *Buckleyurius* Saewar, 1959; *Salimia* Saewar, 1959; *Rudolphia* Sarwar, 1959)

Descrição geral: *Trichuris minuta*, corpo robusto, não filiforme. Abertura oral simples (Figura 1A); cutícula estriada transversalmente. Nematoides característicos por apresentarem corpo com duas partes distintas, uma porção anterior afilada e outra posterior dilatada a partir da junção do esôfago com o intestino, com ânus subterminal (Figura 1B). Apresenta esôfago do tipo tricuriforme, que é um esôfago glandular e uma fileira de células denominadas esticócitos, que formam o esticossomo. A porção posterior abriga os demais órgãos dos aparelhos digestório e genital. Machos com a porção posterior do corpo espiralada, espículo revestido por uma bainha prepucial que se estende para além da extremidade posterior do corpo, de morfologia cilíndrica e superfície externa recoberta com pequenos espinhos (Figuras 1C e 1D). Fêmeas com a extremidade posterior ligeiramente curvada, não espiralada. Vulva está localizada próxima à junção do esôfago com o intestino (Figura 1E).

São ovíparas. Útero apresentando ovos com casca castanha, espessa e com opérculos polares em cada extremidade (Figura 1F).

Resumo taxonômico

Espécie: *Trichuris minuta* Rudolphi, 1819

Hospedeiros: *Didelphis aurita* WIED-NEUWIED, 1826

Local de infecção: Intestino Grosso

Quantidade de espécimes encontrados: 122 espécimes (37 machos e 85 fêmeas)

Prevalência: 16,5% (12 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 1-54

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 16000).

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca e Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

Coordenada: 22°56'18.00"S 43°24'10.13"W e 22°29'04.99"S 43°07'02.50"W

Comentários: O nematóide *Trichuris minuta* Rudolphi, 1819 (Sinonímia: *Trichocephalus minuta* Rudolphi, 1819) foi descrito como um parasito do intestino de *Didelphis* sp. coletado no Brasil. Contudo, desde a redescritção de *T. minuta* por Babero (1959) como parasita de *Didelphis virginiana* no EUA, nenhum outro relato foi observado para a espécie em *D. aurita*. Posteriormente, Silva & Costa (1999) e Antunes (2005) encontraram pela primeira vez *T. minuta* parasitando *D. albiventris*, ampliando a distribuição geográfica e a diversidade de espécies hospedeiras para *T. minuta*.

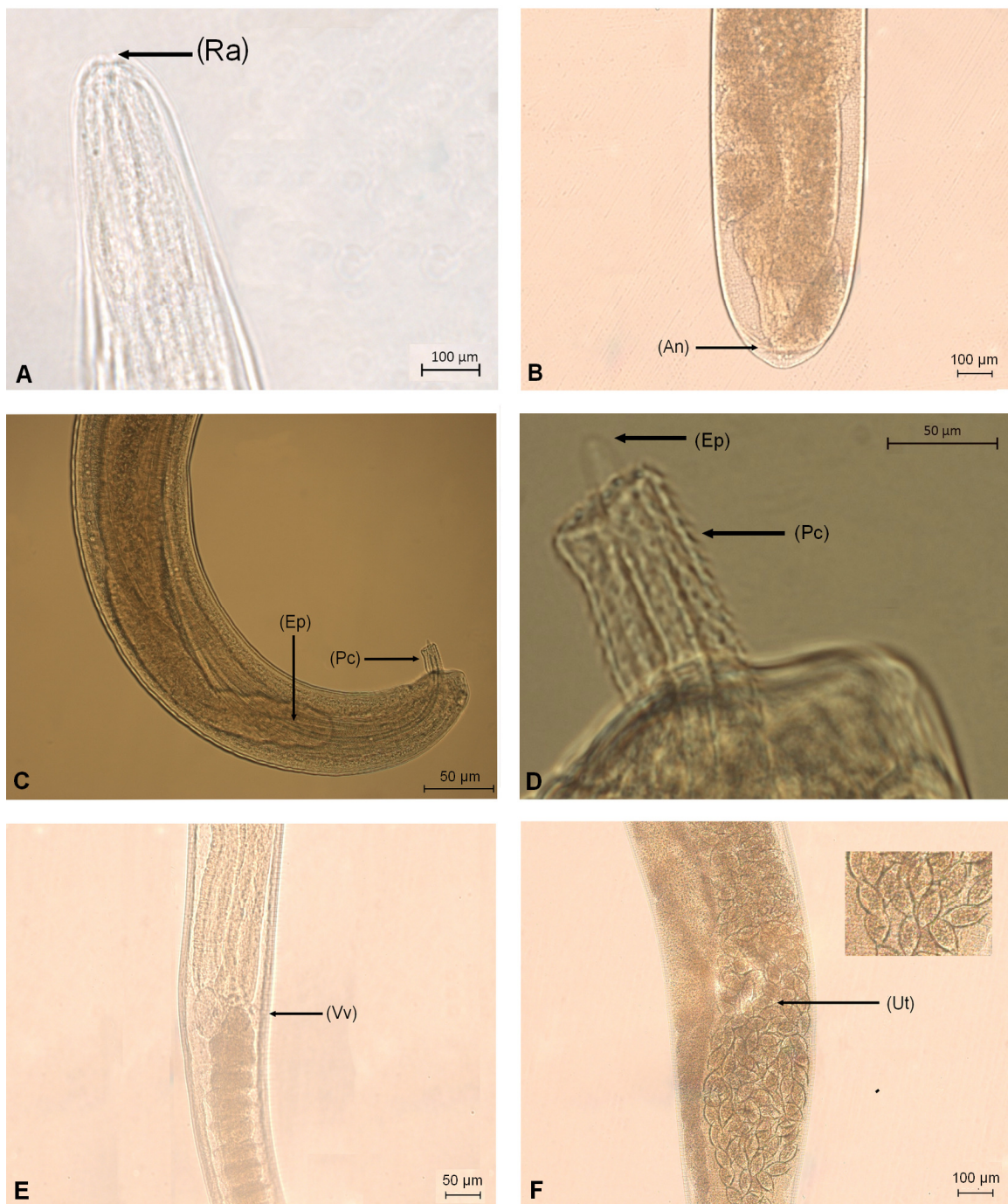


Figura 1: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Trichuris minuta*. (A) Região anterior (Ra). (B) Extremidade posterior da fêmea mostrando a abertura do ânus (An). (C) Região posterior do macho mostrando o espículo (Ep) e a bainha prepucial com espinhos (Pc). (D) Detalhe do espículo (Ep) e da bainha prepucial ornamentado por espinhos (Pc). (E) Detalhe da vulva (V). (F) Útero com ovos na região média (Ut).

Espécie: *Trichuris didelphis* Babero, 1959 (Figura 2)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Enoplea

Subclasse: Dorylaimia

Ordem: Trichocephalida

Superfamília: Trichinelloidea

Família: Trichuridae Railliet, 1915

Subfamília: Trichurinae Ransom, 1911

Gênero: *Trichuris* Roederer & Wagler, 1761 (Sinonímia: *Trichocephalus* Goeze, 1782; *Trichocephalos* Schrank, 1788; *Mastigodes* Zeder, 1800; *Buckleyurius* Saewar, 1959; *Salimia* Saewar, 1959; *Rudolphia* Sarwar, 1959)

Descrição geral: *Trichuris didelphis*, corpo robusto, não filiforme. Abertura oral simples (Figura 2A), cutícula estriada transversalmente. Nematoides com corpo dividido em duas partes, característica do gênero, sendo uma porção anterior delgada e outra posterior mais dilatada, com ânus subterminal (Figura 2B). A transição da porção delgada para porção dilatada do corpo ocorre na junção do esôfago e intestino. Na porção anterior encontra-se o esôfago do tipo tricuriforme e na posterior os demais órgãos dos aparelhos digestório e genital. Machos com a porção posterior do corpo espiralada. Esta espécie é caracterizada pelo tamanho do espículo (Figura 2C). Presença de bainha que se estende além da extremidade posterior do corpo (Figura 2C), formato globular com a superfície externa espinhosa (Figura 2D). Fêmeas com a extremidade posterior ligeiramente curvada, não espiralada. Vulva posterior localizada próxima à junção das duas partes do corpo (Figura 2E). Vulva muscular com ovejetor ligeiramente enrolado (Figura 2E). Ovário na extremidade posterior do corpo. Útero normalmente inteiramente preenchido por ovos (Figura 2F). São ovíparas. Ovos apresentando ovos com casca castanha, espessa e com opérculos polares em cada extremidade.

Resumo taxonômico

Espécie: *Trichuris didelphis* Babero, 1959

Local de infecção: Intestino Grosso

Quantidade de espécimes encontrados: 5 espécimes (2 machos e 3 fêmeas)

Prevalência: 2,7% (2 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 1-4

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 19444).

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca e Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W

Comentários: O Nematóide *Trichuris didelphis* Babero, 1959 foi inicialmente descrito como um parasito do intestino grosso de *D. virginiana* coletado nos Estados Unidos da América. Contudo, desde a descrição original de *T. didelphis* por Babero (1959) em *D. virginiana*, nenhum outro relato havia sido observado para *D. aurita*. Silva & Costa, (1999) e Antunes, (2005) encontraram pela primeira vez *T. didelphis* parasitando *D. albiventris* ampliando a distribuição geográfica para a espécie e acrescentando um novo hospedeiro.

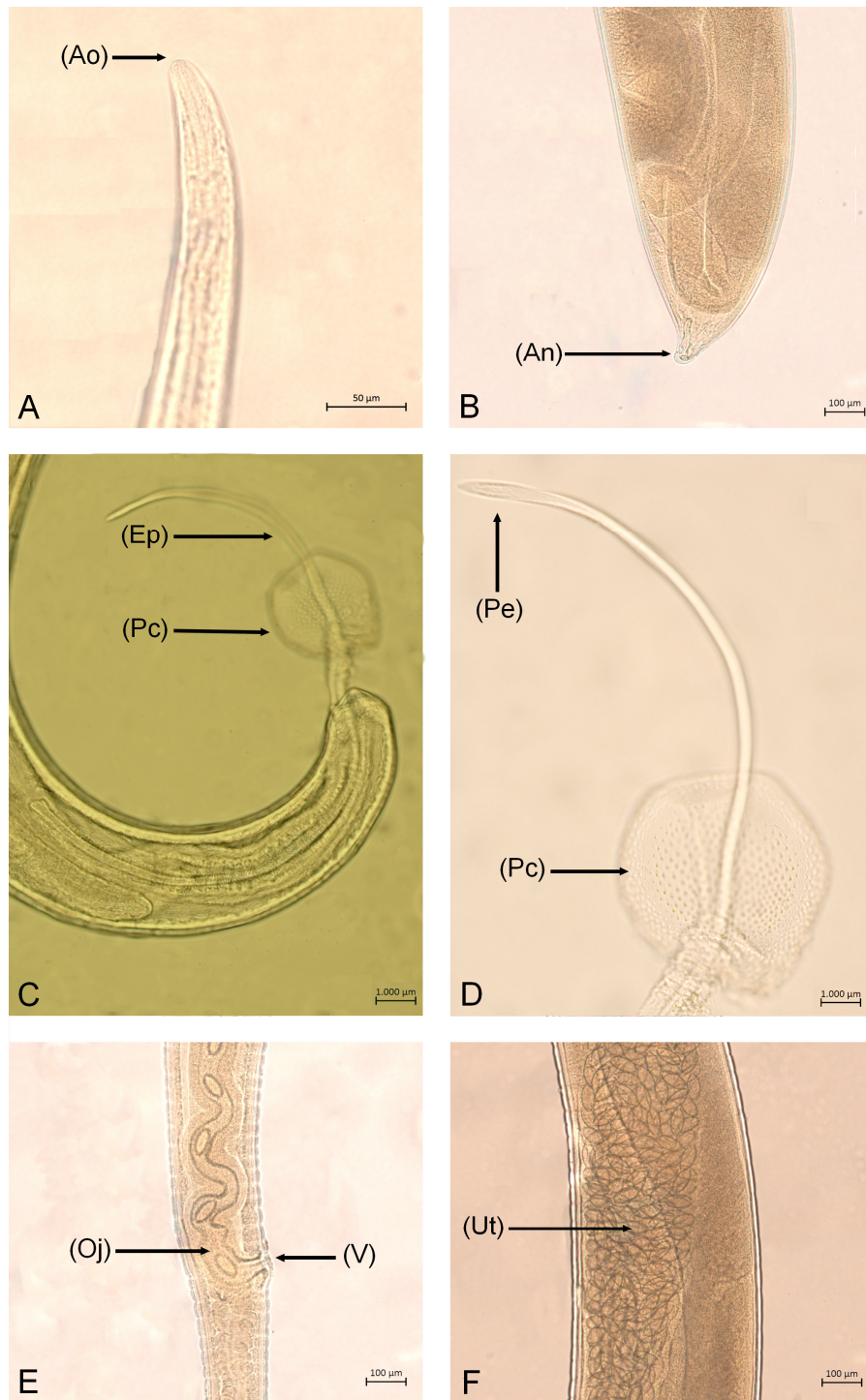


Figura 2: Microscopia óptica (campo claro) de espécimes adultos de *Trichuris didelphis*. (A) Região anterior de espécime fêmea indicando a abertura oral (Ao). (B) Extremidade posterior mostrando a abertura do ânus (An). (C) Região posterior de espécime macho mostrando o espículo (Ep) e a dilatação terminal da bainha prepucial em forma globular (Pc). (D) Detalhe da ponta do espículo em forma de bissel (Pe) e da bainha prepucial ornamentado por espinhos (Pc). (E) Abertura da vulva (V) e ovojector (Oj). (F) Útero muscular repleto de ovos na região média do corpo (Ut).

Espécie: *Globocephalus marsupialis* Freitas & Lent, 1936 (Figura 3)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Chromadorea

Ordem: Rhabditida

Subordem: Strongylida

Superfamília: Ancylostomatoidea Chabaud, 1965

Família: Ancylostomatidae Looss, 1905

Subfamília: Ancylostomatinae Looss, 1905

Tribo: Globocephalinae Travassos & Vogelsang, 1932

Gênero: *Globocephalus* Molin, 1861 (Sinonímia: *Cystocephalus* Railliet, 1895; *Characostomum* Railliet, 1902; *Crassisoma* Alessandrini, 1909; *Raillietostrongylus* Lane, 1923)

Descrição geral: *Globocephalus marsupialis*, extremidade anterior curvada dorsalmente. A morfologia da cápsula bucal do nematoide é subglobosa, profunda, infundibular, com uma lanceta dorso-lateral no seu interior permitindo a caracterização do gênero (Figura 3A). Abertura oral circular, terminal e circundada por vários festões circulares externos (Figura 3A). Dentição na margem oral com dois pares de dentes conspícuos (Figura 3A). Esôfago claviforme. Fêmeas com a vulva na extremidade anterior do corpo (Figura 3B). Ramos uterinos blastomerizados assimétricos. Ânus na extremidade posterior e esta terminando afilada (Figura 3C). Ovos grandes e com casca lisa e hialina. Machos com a bolsa copuladora desenvolvida. Raios ventrais nascem de um tronco comum, assim como os raios laterais. Raio dorsal bifurcado na extremidade distal, onde cada bifurcação divide-se em dois ramos, dos quais o interno é bífido. Espículos iguais não farpados, quitinizados e gubemáculo presente (Figura 3D).

Resumo taxonômico

Espécie: *Globocephalus marsupialis* Freitas & Lent, 1936

Local de infecção: Intestino Delgado

Quantidade de espécimes encontrados: 35 espécimes (14 machos e 21 fêmeas)

Prevalência: 5,5% (4 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 1-23

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 16000).

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca e Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos.

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W

Comentários: Freitas & Lent (1936) descreveram *Globocephalus marsupialis* como um parasito do intestino delgado do marsupial *Metachirops opossum* Temminck, capturado em Petrópolis no estado do Rio de Janeiro, Brasil, e o incluíram na família Ancylostomatidae. Após a descrição original de *G. marsupialis*, a mesma não foi mais relatada, apesar de vários trabalhos terem sido realizados descrevendo a helmintofauna de várias espécies de marsupiais ou de outra espécie de mamíferos no Brasil (Pinto & Gomes, 1976; Gomes, 1984; Silva & Costa, 1999; Gomes *et al.*, 2003; Antunes, 2005; Chagas-Moutinho *et al.*, 2007; Torres, 2007; Torres *et al.*, 2009; Chagas-Moutinho *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015). No mundo, este gênero é encontrado como parasito de diversos mamíferos: *Globocephalus connorfilli* (Lane, 1922) que infecta *Rattus rattus* (Hasegawa *et al.*, 1994) e *Sus scrofa* (Freitas & Lent, 1936); *Globocephalus asmilius* (Railliet; Henry & Joyeux, 1913) parasita de primatas dos gêneros *Erythrocebus*, *Cercopithecus*, *Silenus*, *Nycticebus* (Freitas & Lent, 1936); *Globocephalus urosubulatus* (Alessandrini, 1909) (Freitas & Lent, 1936; Vicente *et al.*, 1997), *Globocephalus longemucronatus* (Molin, 1861) (Freitas & Lent, 1936; Hartwich, 1986), *Globocephalus samoensis* (Lane, 1922) (Freitas & Lent, 1936), *Globocephalus sichuanensis* (Wu, 1984), *Globocephalus maplestoni* (Ortlepp, 1964), *Globocephalus amucronatus* (Smit & Notosoedero, 1926), *Globocephalus versteri* (Ortlepp, 1964) e *Globocephalus madagascariensis* (Chanaid, 1966) (Ahn *et al.*, 2015) que infectam *Sus scrofa* e *Globocephalus macropodis* (Yorke & Maplestone, 1926) (Freitas & Lent, 1936) que infecta o marsupial australiano do gênero *Macropus*.

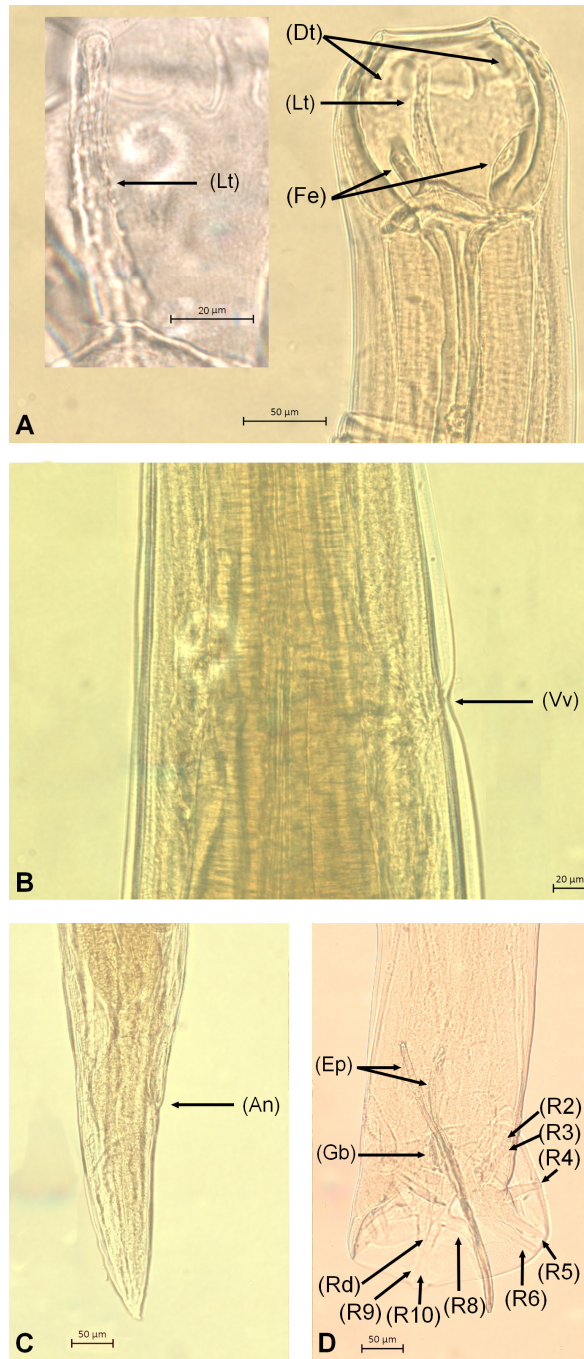


Figura 3: Microscopia óptica de campo claro de espécimes adultos de *Globocephalus marsupialis*. (A) Região anterior da fêmea mostrando abertura oral semiglobosa, circundada por festões, com uma lanceta dorso-lateral munida de espinhos e dois dentes conspícuos na parte anterior da cápsula bucal (Lt). (B) Espécime fêmea com a vulva situada na região anterior do corpo (Vv). (C) Região posterior da fêmea terminando afilada com ânus subterminal. (D) Detalhe da bolsa copulatória em vista ventral da região posterior do macho, raio ventroventral (R2), raio ventrolateral (R3), raio anterolateral (R4), raio mediolateral (R5), raio posterolateral (R6), raio posterodorsal (R8), raio dorsal (Rd), raios dorsais (R9) e (R10), detalhe da ponta do raio dorsal bífido, espículos (Ep) e gubernáculo (Gb).

Espécie: *Heterostrongylus heterostrongylus* Travassos, 1925 (Figura 4)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Chromadorea

Ordem: Rhabditida

Subordem: Strongylida

Superfamília: Metastrongyloidea Lane, 1917

Família: Angiostrongylidae Anderson, 1978

Gênero: *Heterostrongylus* Travassos, 1925

Descrição geral: *Heterostrongylus heterostrongylus*, são helmintos pequenos e delicados, apresentam dimorfismo sexual. os espécimes fêmeas são maiores e mais robustos do que o macho, ambos apresentam uma linha lateral longitudinal discreta ao longo do corpo. A extremidade anterior apresenta estruturas semelhantes em ambos os sexos. A abertura oral é circular e rodeada por um anel, sem cápsula bucal, tendo dois lábios trilobados robustos, sendo cada lobo com uma papila na margem interna. Apresenta um par de papilas na borda externa dos lábios laterodorsal e lateroventral. Amphídeos localizados externamente em relação as papilas laterais. A cutícula cefálica apresenta-se dobrada, formando um colar cefálico (Figura 4A). Esôfago curto, claviforme (Figura 4A). Anel nervoso bem desenvolvido, mas discreto na extremidade anterior na região do meio do esôfago. Poro excretor que leva a um ducto excretor terminal longo seguido por glândulas proeminentes na extremidade anterior. Macho com bolsa copuladora pequena, arredondada, suportada por raios robustos. Lóbulo dorsal grande, arredondado, ovóide, não ramificado se destacando dos lóbulos laterais. Raios ventrais pouco desenvolvidos e curtos. Raios laterais com tronco comum independentes. Raios externo-laterais bem desenvolvidos e maiores juntos ao raio dorsal. Raios médios e postero-laterais pequenos se originando dos raios externo-laterais que também são curtos e robustos. Raios externo-dorsais juntos ao raio dorsal (Figura 4B). Espículos curtos, robustos, subiguais, ligeiramente arqueados expandidos até as extremidades distais de forma irregular (Figura 4B). Gubernáculo presente, bem desenvolvido, com uma estrutura hialina em forma de calha (Figura 4B). Fêmea com a extremidade

posterior digitiforme com a vulva situada transversalmente com borda saliente imediatamente anterior a vulva (Figura 4C). Úteros voltados para frente, ovejector bastante longo e muscular, com esfíncter bem desenvolvido perto da extremidade distal. Ovejector e úteros totalmente preenchidos com ovos grandes, elípticos com a superfície da casca ornamentados por sulcos longitudinais. Ovos embrionados "in utero" ou com larvas rabditóides de primeiro estágio com cutícula lisa (Figura 4D). O esôfago, poro excretor, anel nervoso e primórdio genital não foram observados. Cauda curvada terminando em uma ponta afiada. Ânus na extremidade caudal.

Resumo taxonômico

Espécie: *Heterostrongylus heterostrongylus* Travassos, 1925

Local de infecção: Brônquio e bronquíolos Pulmonar

Quantidade de espécimes encontrados: 145 espécimes (54 machos e 91 fêmeas)

Prevalência: 33 % (23 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 1-36

Espécimes representativos: CHIOC No: 38319 (depósito em meio líquido, LBCE 16000)

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca, Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro-RJ região serrana.

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W e 22°02'09.49"S e 42°39'02.14"W

Comentários: O Nematóide *Heterostrongylus heterostrongylus* Travassos, 1925 foi descrito como um parasito dos brônquios pulmonares de *Didelphis marsupialis aurita* Wied, coletado no município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Em 1949, Dougherty dividiu a família Metastrongylidae em quatro subfamílias: Metastrongylinae, Filaroidinae, Pseudaliinae e Protostrongylinae, colocando as espécies *Metastrongylus* e *Heterostrongylus* na nova subfamília Metastrongylinae devido à semelhança da

estrutura labial bem desenvolvida. Skrjabin *et al.* (1952) criou a subfamília Heterostrongylinae dentro da família Metastrongylidae para *Heterostrongylus*. Posteriormente, Anderson *et al.* (1978) transferiram *H. heterostrongylus* à família Angiostrongylidae, notando afinidades entre este gênero e *Didelphostrongylus hayesi*. Em seguida, Anderson *et al.* (1980) redescreveram *H. heterostrongylus* e compararam através da microscopia de luz com *D. hayesi*, distinguindo estas espécies por diferenças na morfologia dos raios da bolsa copuladora: *H. heterostrongylus* tem raios robustos, raios laterais independentes uns dos outros e raios dorsais não bifurcados, enquanto que *D. hayesi* tem raios dorsais bífidos e tênues, raios ventrais e laterais originando de ramos comuns, e cauda curta e arredondada nas fêmeas. Por outro lado, Anderson *et al.* (1980) também observaram em ambas as espécies seis lábios bem desenvolvidos e concluíram que estas estruturas são equivalentes a seis estruturas oblongas “perityls” encontradas em diversos helmintos pulmonares. Assim, *H. heterostrongylus* e *D. hayesi* foram alocados na família Angiostrongylidae (Anderson *et al.*, 2009). Costa-Neto *et al.* (2016) (Capítulo 2) observaram através das características morfológicas das estruturas cefálica a semelhança de *H. heterostrongylus* e *D. hayesi*, bem com lábios trilobado desenvolvido como descrito para *Metastrongylus* da família Metastrongylidae. Por outro lado, outros caracteres morfológicos observados em *H. heterostrongylus*, tais como os padrões dos raios da bolsa copuladora, a forma dos espículos assim como a posição da abertura anal terminal perto da vulva em fêmeas, confirmam a classificação de *H. heterostrongylus* dentro da família Angiostrongylidae. Contudo, desde a descrição de *H. heterostrongylus* nenhum outro relato foi observado, apesar de alguns trabalhos terem sido publicados relatando a helmintofauna de espécies de marsupiais (Pinto & Gomes, 1976; Silva & Costa, 1999; Gomes *et al.*, 2003; Antunes, 2005; Torres *et al.*, 2007; 2009; 2015), tendo sido a redescrição realizada por Anderson *et al.* (1980) baseada em espécimes depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz.

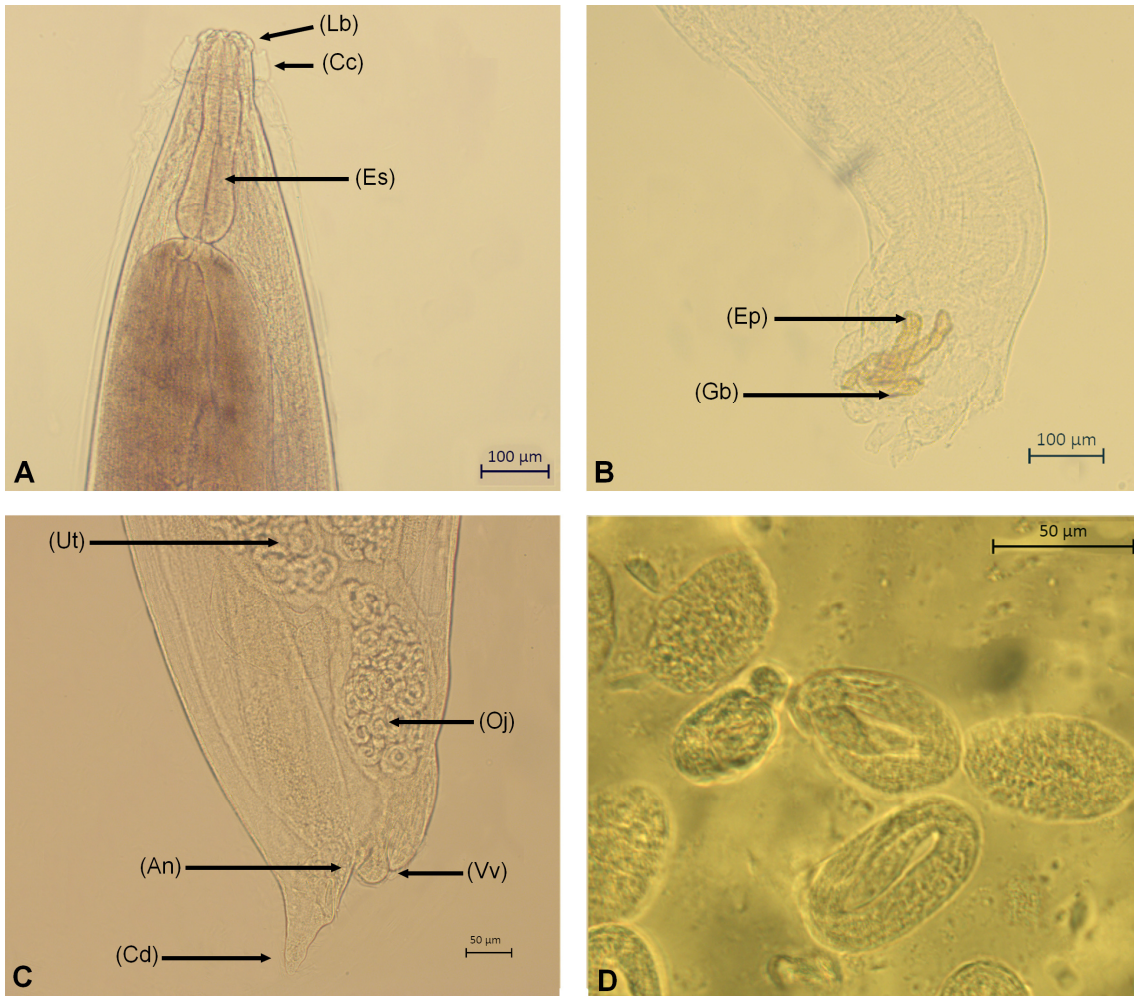


Figura 4: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Extremidade anterior do macho que mostra o esôfago (Es) e, em detalhe, os lábios (Lb) e colar cefálico (Cc). (B) Extremidade posterior do macho com vista lateral, mostrando gubernáculo (Gb) e espículo (Ep). (C) Extremidade posterior da fêmea mostrando útero (Ut), ovejetor (Oj), vulva (Vv), ânus (An) e cauda digitiforme (Cd). (D) Ovos.

Espécie: *Travassostongylus orloffii* Travassos, 1935 (Figura 5)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Chromadorea

Ordem: Rhabditida

Subordem: Strongylida

Superfamília: Trichostrongyloidea

Família: Viannaiidae Durette-Desset & Chabaud, 1981

Subfamília: Viannaiinae Neveau-Lemaire, 1934

Gênero: *Travassostongylus* Orloff, 1933 (Sinonímia: *Camerostrongylus* Wolfgang, 1951)

Descrição geral: *Travassostongylus orloffii*, apresentam extremidade anterior com dilatação cuticular (Figura 5A). Cutícula com estriação transversal e cristas longitudinais. Papilas cervicais não aparentes. Dilatação cefálica presente. Boca com papilas muito reduzidas e cápsula bucal rudimentar. Poro excretor e anel nervoso presente. Esôfago claviforme (Figura 5A). Fêmeas com a vulva situada na metade posterior do corpo, sem a presença de saliência cuticular ou lábios. Aparelho genital do tipo anfidelfo. Ovejeter bem desenvolvido, pequeno e bem musculoso. Úteros divergentes. Ovos de casca fina. Extremidade posterior cônica e terminando por ponta fina. Ânus na extremidade posterior (Figura 5B). Machos com bolsa ampla, constituída por lóbulos laterais muito desenvolvidos e apresentando um espessamento cuticular estriado, situado na área entre o raio ventroventral e lateral médio. Lóbulo posterior muito pequeno. Membrana bursal acessória ausente. Papilas pré-bursais muito reduzidas. Bolsa copuladora com raios ventrais e laterais subiguais. Raios ventrais pouco divergentes e atingindo a margem da bolsa copuladora; raios laterais divergentes desde a base com o raio lateroventral divergindo do laterolateral em ângulo obtuso, terminando em papila cercada de espessamento cuticular; raio laterolateral dirigido para trás e terminando na margem da bolsa copuladora; raio lateroposterior divergindo do lateral médio em ângulo agudo e dirigido posteriormente terminando próximo a margem da bolsa; raios ventrais e laterais apresentam espessura aproximadamente igual; raio dorsal externo nascendo junto à base do tronco dorsal, mais curto e mais

delgado que o lateral posterior e paralelo a ele, não atinge a margem da bolsa copuladora; raio dorsal pequeno bifurcando na porção distal em raios muito delgados de ponta bífida (Figura 5C). Espículos subiguais, complexos terminando em ponta bífida reunidas por uma membrana hialina. Gubernáculo presente, alongado. Telamon presente, cônico.

Resumo taxonômico

Espécie: *Travassostrongylus orloffii* Travassos, 1935

Local de infecção: Intestino Delgado

Quantidade de espécimes encontrados: 1065 espécimes (402 machos e 663 fêmeas)

Prevalência: 55% (38 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 1-163

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 16000)

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca, Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, região serrana.

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W e 22°02'09.49"S e 42°39'02.14"W

Comentários: O nematoide *Travassostrongylus orloffii* Travassos, 1935 foi descrito como um parasito do intestino delgado de *Didelphis marsupialis aurita* Wied, coletado na localidade de Manguinhos no Município de Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Contudo, desde a descrição de *T. orloffii* nenhum outro relato foi observado para *D. aurita*, apesar de alguns trabalhos terem sido publicados relatando a helmintofauna de espécies de marsupiais (Pinto & Gomes, 1976; Gomes *et al.*, 2003; Torres, 2007; Torres *et al.*, 2007; 2009; 2015). Entretanto, foi relatado por Silva & Costa, 1999 e Antunes, 2005 a ampliação da distribuição geográfica para *T. orloffii*, incluindo a cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais e a cidade de Pelotas no Estado do Rio grande do Sul com o parasitismo de um novo hospedeiro, o marsupial *D. albiventris*.



Figura 5: Microscopia óptica (campo claro) de espécimes adultos de *Travassostrongylus orloffii*. (A) Região anterior de espécime macho mostrando a cápsula cefálica (Cp) e esôfago claviforme (Es). (B) Extremidade posterior da fêmea indicando o ânus (An) e cauda cônica digitiforme (Cc). (C) Região posterior do macho mostrando bolsa copuladora (Bc), raio dorsal (Db), raio ventroventral (R2), raio ventrolateral (R3), raio anterolateral (R4), raio mediolateral (R5), raio posterolateral (R6), raio posterodorsal (R8), raios dorsais (R9) e (R10), detalhe da ponta do raio dorsal bífido, espículos (Ep) e gubernáculo (Gb).

Espécie: *Viannaia hamata* Travassos, 1914 (Sinonímia: *Viannaia*
(*Viannaia*) *hamata* Schulz, 1926) (Figura 6)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Chromadorea

Ordem: Rhabditida

Subordem: Strongylida

Superfamília: Trichostrongyloidea

Família: Viannaiidae Durette-Desset & Chabaud, 1981

Subfamília: Viannaiinae Neveau-Lemaire, 1934

Gênero: *Viannaia* Travassos, 1914 (Sinonímia:
Philostrongylus Wolfgang, 1951)

Descrição geral: *Viannaia hamata*, corpo fortemente enrolado em espiral. Cutícula entumescida, com ligeira estriação transversal e cristas longitudinais (quando existem linhas longitudinais estas são reduzidas à face ventral e rudimentares, apenas aparentes na cutícula distendida). Extremidade anterior com dilatação cuticular desenvolvida e separada do resto do corpo por um estrangulamento anular (Figura 6A). Machos com bolsa copuladora muito desenvolvida, de lóbulos laterais ligeiramente assimétricos e de lóbulo dorsal muito desenvolvido (Figura 6B). Papilas pré-bursais muito longas e delgadas. Cone genital muito desenvolvido e sem armadura quitinosa. Bolsa copuladora com raios ventrais contíguos até a metade proximal e pouco divergentes na porção distal do raio. Raio ventrolateral mais longo que os outros, isolado desde a origem e quase atingindo a margem bursal. Raios laterolateral e laterodorsal com curto tronco comum e pouco divergentes. Raios dorsais com curto tronco comum. Raio dorsal bifurcado no terço distal em ramos dicotomizados sendo que o raio dorsal externo não atinge a margem bursal (Figura 6B). Espículos delgados e curtos (Figura 6B). Gubernáculo presente. Fêmeas com a vulva anterior ao ânus (Figura 6C). Aparelho reprodutor simples. Ovejeter musculoso (Figuras 6C e 6D). Ovos relativamente grandes e pouco numerosos (Figura 6D). Extremidade posterior dilatada ao nível das aberturas genital e anal e atenuando-se bruscamente numa cauda curvada, delgada e cônica.

Resumo taxonômico**Espécie:** *Viannaia hamata* Travassos, 1914**Local de infecção:** Intestino Delgado**Quantidade de espécimes encontrados:** 5679 espécimes (1620 machos e 4059 fêmeas)**Prevalência:** 55% (40 infectados / 73 analisados)**Intensidade de infecção:** (mínimo-máximo): 1-1839**Espécimes representativos:** (depósito em meio líquido, LBCE 16000)**Proveniência do hospedeiro:** Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca e Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos**Coordenada:** 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W

Comentários: O Nematóide *Viannaia hamata* foi descrito como um parasito do intestino delgado de *Didelphis (Didelphis) aurita* Wied, foi coletado na localidade de Manguinhos no município de Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Contudo, desde a descrição original de *V. hamata* apenas Freitas & Lent (1935) e Gomes *et al.* (2003) haviam observado este helminto para *D. aurita* da coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz. Apesar de alguns trabalhos terem sido publicados relatando a helmintofauna de espécies de marsupiais, estes helmintos não haviam sido encontrados (Pinto & Gomes, 1976; Torres, 2007; Torres *et al.*, 2007; 2009; 2015). Recentemente, Silva & Costa (1999) em Belo Horizonte-MG e Antunes (2005) em Pelotas-RS relataram que houve ampliação na distribuição de *T. orloffi*, assim como a ocorrência de um novo hospedeiro, sendo este o marsupial *D. albiventris*.

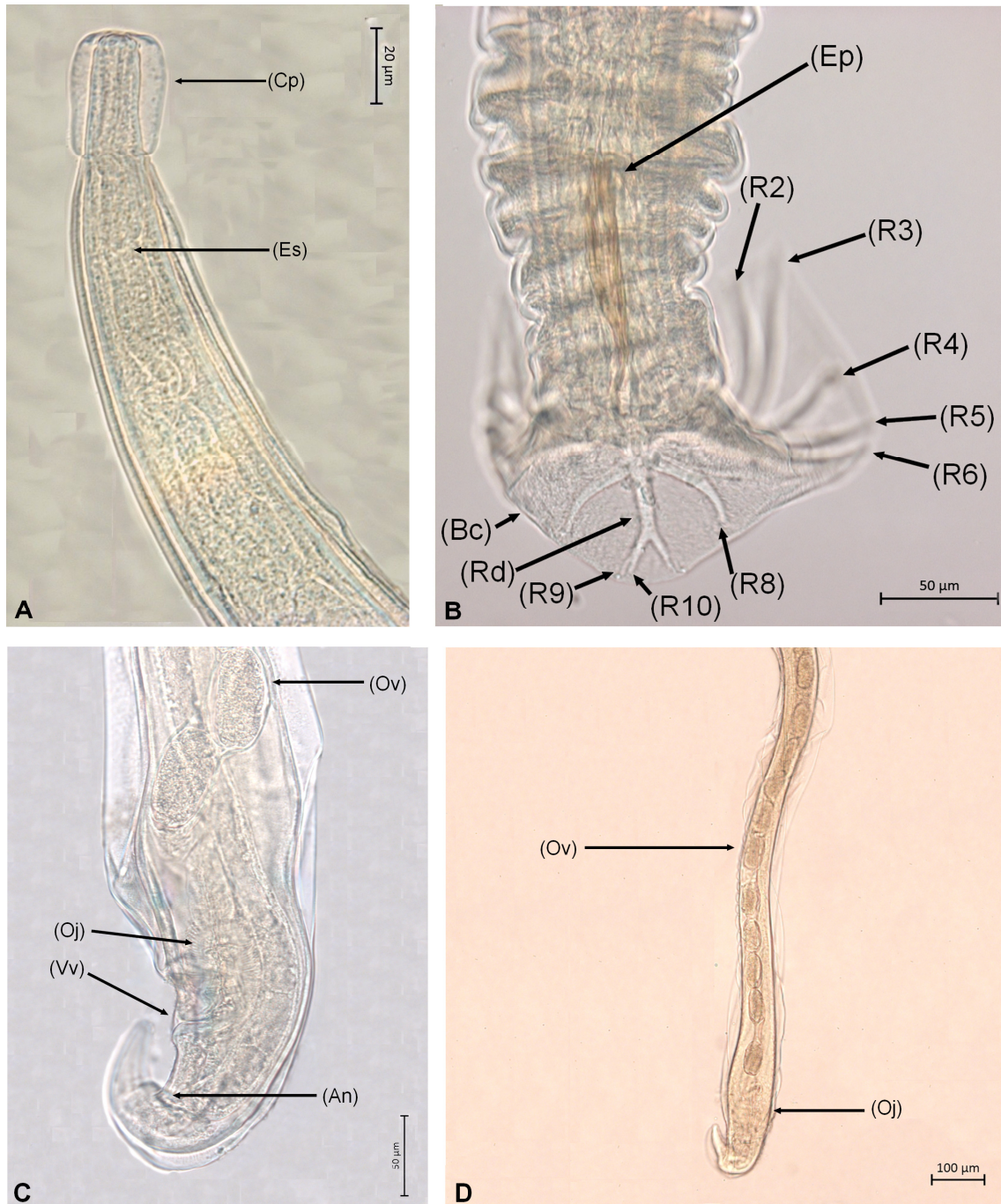


Figura 6: Microscopia óptica (campo claro) de espécimes adultos de *Viannaia hamata*. (A) Região anterior, mostrando a cápsula cefálica (Cp) e esôfago claviforme (Es). (B) Região posterior do macho mostrando bolsa copuladora (Bc), espículos (Ep), raio ventroventral (R2), raio ventrolateral (R3), raio anterolateral (R4), raio mediolateral (R5), raio posterolateral (R6), raio posterodorsal (R8), e raios dorsais (Rd), (R9) e (R10). (C) e (D) Extremidade posterior da fêmea mostrando útero muscular (Ut) com os ovos (Ov), ovejector muscular (Oj), abertura da vulva (Vv) e ânus (An).

Espécie: *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913 (Figura 7)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Chromadorea

Ordem: Ascaridida

Superfamília: Heterakoidea

Família: Aspidoderidae (Freitas, 1956) Skrjabin & Schikhobalova, 1947

Subfamília: Aspidoderinae Skrjabin & Schikhobalova, 1947

Gênero: *Aspidodera* Railliet & Henry, 1912 (Sinonímia: *Sexansodera* Skrjabin & Schikhobalova, 1947)

Descrição geral: *Aspidodera raillieti* apresenta machos e fêmeas com distinto dimorfismo sexual, porém com extremidade anterior semelhante, corpo não muito alongado com cutícula estriada transversalmente. Extremidade anterior do corpo com dilatação cuticular em forma de coifa, apresentando cordões cefálicos que descrevem seis alças de convexidade, anastomosados anteriormente, formando duas curvaturas de convexidade anterior em cada lábio (Figura 7A). A boca com três lábios: dois láteroventrais que apresentam um anfídio posterior e paralelamente um par de papilas, e um lábio dorsal que não apresenta papila nem anfídeo, assim formando o vestibulo oral. O esôfago delgado com bulbo posterior (Figura 7A), o anel nervoso e o poro excretor estão localizados aproximadamente na parte média do esôfago na extremidade anterior (Figura 7A). Os machos não possuem asa caudal, têm extremidade posterior cônica com um espinho curto ao final do corpo, apresentando uma ventosa pré-cloacal circular de bordos espessos (Figura 7B). Papilas em grande número, treze pares de papilas caudais sésseis sendo assim distribuídas: cinco pares pré-anais, um par adanal e sete pares pós-cloacais. Espículos iguais, longos, bastante quitinizados, com a extremidade proximal terminando em formato de bissel, com presença de gubernáculo (Figura 7B). As fêmeas são ovíparas e anfidelfas com vulva situada no terço anterior, aproximando-se bastante do meio do corpo, em forma de fenda transversal e ovos elipsóides de casca espessa, lisa e não embrionados no útero (Figura

7C). Ovários descrevendo alças para frente e para trás e extremidade posterior em formato cônico com ânus (Figura 7D).

Resumo taxonômico

Espécie: *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913

Local de infecção: Intestino Grosso

Quantidade de espécimes encontrados: 1268 espécimes (543 machos e 725 fêmeas)

Prevalência: 77% (55 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 2-308

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 17666)

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca, Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro-RJ região serrana do Estado

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W e 22°02'09.49"S e 42°39'02.14"W

Comentários: Segundo Anderson *et al.* (2009), a superfamília Heterokoidea possui três famílias: Heterakidae Railliet & Henry, 1912, Ascaridiidae Travassos, 1919, Aspidoderidae Skrjabin & Schikhobalova, 1947; a família Aspidoderidae apresenta duas subfamílias: Lauroinae Skrjabin & Schikhobalova, 1951 e Aspidoderinae Skrjabin & Schikhobalova, 1947, esta última é constituída por dois gêneros: *Ansiruptodera* Skrjabin & Schikhobalova, 1947 e *Aspidodera* Skrjabin & Schikhobalova, 1947. No Brasil existem nove espécies pertencentes ao gênero *Aspidodera* que parasitam marsupiais, roedores e xenarthra (Santos *et al.*, 1990; Vicente *et al.*, 1997; Chagas-Mountinho *et al.* (2014), dentre elas *Aspidodera ansirupta* Proença, 1937, *Aspidodera binansata* Railliet & Henry, 1913, *Aspidodera fasciata* (Schneider, 1866) Railliet & Henry, 1913, *Aspidodera lacombeae* Vicente, 1964, *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913, *Aspidodera scoleciformis* (Diesing, 1851) Railliet & Henry, 1912, *Aspidodera subulata* (Molin, 1860) Railliet & Henry, 1912, *Aspidodera vazi* Proença, 1937, *Aspidodera lanfredi* Chagas-Mountinho *et al.*

(2014). No Brasil existem nove espécies, apenas *A. raillieti*, *A. subulata* e *A. lanfredi* foram encontradas parasitando os marsupiais brasileiros do gênero *Didelphis* (Santos *et al.*, 1990; Vicente *et al.*, 1997; Chagas-Mountinho *et al.*, 2007; 2014).

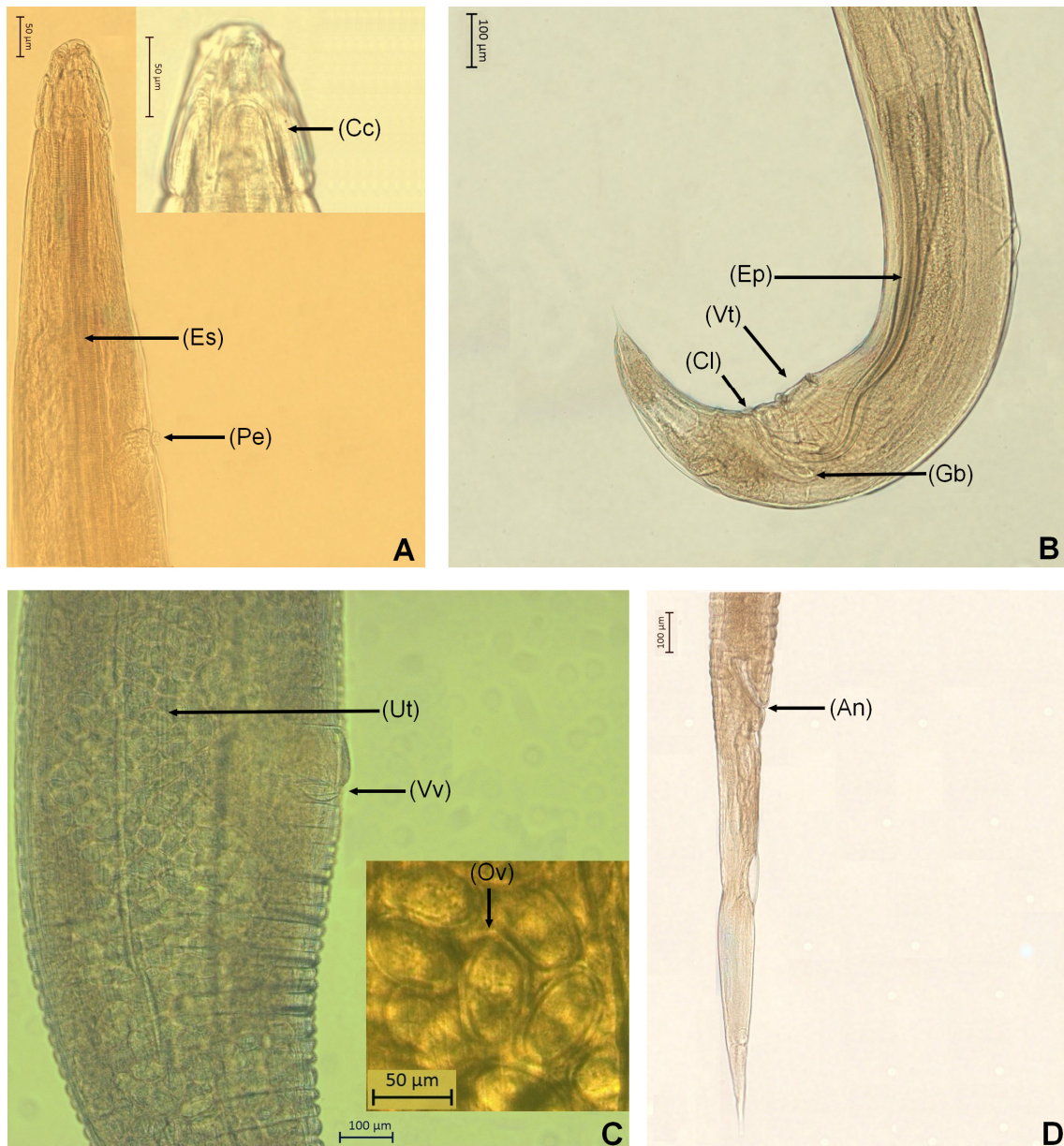


Figura 7: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Aspidodera raillieti*. (A) Visão anterior mostrando: cordões cefálicos (Cc), poro excretor (Pe) e esôfago (Es). (B) Região posterior do macho mostrando espículos (Ep), gubernáculo (Gb), ventosa (Vt) e cloaca (Cl). (C) Detalhe da região posterior da fêmea terminando afilada e mostrando ânus. (D) Detalhe do útero da fêmea (Ut), da vulva (Vv) e ovos (Ov).

Espécie: *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos (1922 (1917 tá errado)), (Sinonímia: *Ascaris tentaculata* Rudolphi, 1819; *Oxysoma tentaculata* Schneider, 1866) (Figura 8)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Chromadorea

Ordem: Ascaridida

Superfamília: Cosmocercoidea

Família: Kathlaniidae Travassos, 1918

Subfamília: Cruzeinae Ortlepp, 1924

Gênero: *Cruzia* (Sinonímia: *Neocruzia*, Yamaguti, 1961) Travassos, (1917)

Descrição geral: *Cruzia tentaculata*, apresentam machos e fêmeas com distinto dimorfismo sexual, porém com a extremidade anterior semelhante. Na parte anterior possui abertura oral “Boca” cercada por três lábios subtriangulares (Figura 8A), um lábio dorsal com um par de papilas laterais e dois lábios látero-ventrais com uma papila e um anfídeo em cada um dos lábios. Pequenos dentes localizados nos três lábios (Figura 8A), faringe com três fileiras de ganchos longitudinais e três estruturas truncadas em forma de dente em sua base (Figura 8A). O esôfago é longo (Figura 8A), cilíndrico, alargado posteriormente, e apresenta uma pequena dilatação pré-bulbar, seguido por um bulbo bem desenvolvido contendo válvulas, o anel nervoso está localizado no final do primeiro quarto do esôfago, e o poro excretor presente (Figura 8A). O divertículo intestinal é projetado para a região anterior ultrapassando o bulbo esofagiano, e o intestino tem ceco anterior. Fêmeas com abertura vulvar situada no terço médio do corpo (Figura 8B) e apresentando um par de papilas em sua lateral. O útero é anfidelfo e apresenta-se repleto de ovos nas fêmeas grávidas (Figura 8B). Ovíparas. Os ovos são relativamente grandes, com casca espessa e rugosa, embrionados quando eliminados. A região posterior das fêmeas é afilada em forma cônica, nela está presente a abertura anal (Figura 8C). Machos com a região posterior ventralmente curvada, a abertura da cloaca está na extremidade caudal, torna-se mais fina, de forma cilíndrica e termina em ponta aguda (Figura 8D). Possui uma papila

sobre o lábio, e nota-se também uma discreta asa caudal. A região caudal possui 10 pares de papilas laterais, sendo três pares equidistantes sobre a asa caudal, três pares de papilas ad-cloacais e quatro pós-cloacais. O gubernáculo tem forma triangular, os espículos são similares alados, longos e côncavos e transversalmente apresentam aspecto poroso e um canal ao longo da porção dorsal (Figura 8D).

Resumo taxonômico

Espécie: *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos (1917)

Local de infecção: Intestino Grosso

Quantidade de espécimes encontrados: 3660 espécimes (1539 machos e 2121 fêmeas)

Prevalência: 77% (56 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 2-509

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 16000)

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca, Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro-RJ região serrana do Estado

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W e 22°02'09.49"S e 42°39'02.14"W

Comentários: A superfamília Cosmocercoidea, apresenta três famílias: Atractidae Travassos, 1919, Kathlaniidae, Travassos 1918 e Cosmocercidae Travassos, 1925 (Vicente *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2009). A família Kathlaniidae, está dividida em três subfamílias: Kathlaniinae Lane, 1914, Oxyascaridinae Freitas, 1958 e Cruzeinae Ortlepp, 1924. Esta última apresenta apenas um gênero: *Cruzia* Travassos, 1918, atrelando a duas espécies assinaladas no Brasil: *Cruzia brasiliensis* Costa, 1965 e *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1922. De acordo com Travassos, 1922 a espécie tipo é *C. tentaculata*, sendo que no Brasil foram assinaladas as seguintes espécies: *C. brasiliensis* parasitando *Sus domesticus*, sendo sua localização no intestino grosso do respectivo hospedeiro; e *C. tentaculata* que parasita o

intestino grosso dos marsupiais *Philander opossum* Linnaeus, 1758, *Didelphis aurita*, *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 e *Metachirus nudicaudus* É. Geoffroy, 1803. Em 2009 Adnet *et al.* redescreveram *C. tentaculata* por microscopia eletrônica de varredura, onde estabeleceram o número de papilas caudais (dez pares de papilas tipo botão, simetricamente localizadas ventro-lateralmente), bem como uma única papila média cloacal anterior e quatro pares de papilas pós- cloacais, a partir de diagnóstico característico desta espécie.

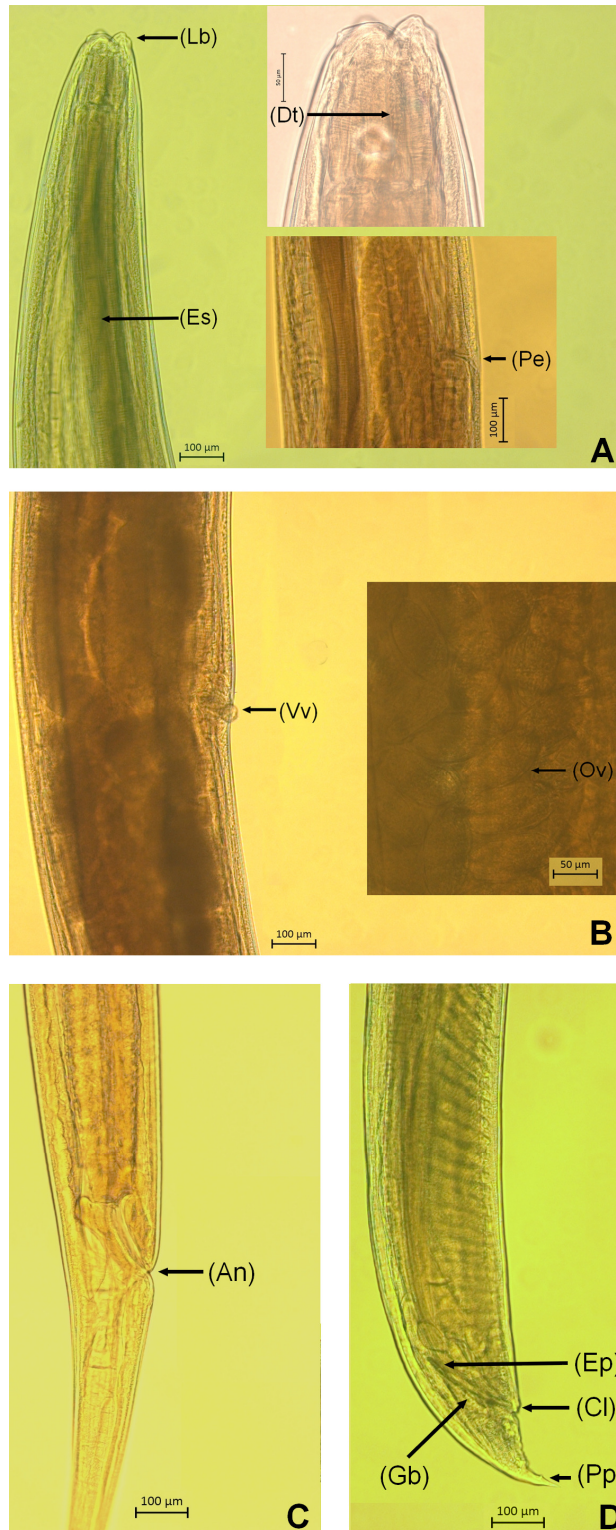


Figura 8: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Cruzia tentaculata*. (A) Visão lateral da região anterior com três lábios (Lb), esôfago (Es), dentículos (Dt) e poro excretor (Pe). (B) Detalhe da vulva (Vv) e Ovo uterino (Ov). (C) Região posterior da fêmea com detalhe do ânus (An). (D) Visão lateral da parte posterior do macho com detalhe de uma papila (Pp), cloaca (Cl), gubernáculo (Gb) e espículos (Ep).

Espécie *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1919 (Sinonímia: *Physaloptera turgida* Rudolphi, 1819; *Spiroptera turgida* Dujardin, 1845; *Physaloptera didelphidis virginiana* Leidy, 1851) (Figura 9)

Filo: Nematoda Rudolphi, 1808

Classe: Chromadorea

Ordem: Spirurida

Superfamília: Physalopteroidea

Família: Physalopteridae Leiper, 1908

Subfamília: Physalopterinae Railliet, 1893

Gênero: *Turgida* (Travassos, 1919) Schulz, 1927

Descrição geral: *Turgida turgida*, são helmintos grandes com dimorfismo sexual. A extremidade anterior é gradualmente cônica tanto nos machos quanto nas fêmeas. O corpo apresenta cutícula com estriação transversal. Boca composta por dois fortes lábios triangulares fundidos que são achatados sobre a parte interior, providos de quatro papilas na face externa (Figuras 9A e 9B). Apresenta três pequenos dentes no ápice na margem interna de cada lábio, sendo o dente externo trifurcado e cercado por um anel cuticular que funciona como ventosa (Figuras 9A e 9B), ainda na parte anterior observa-se a faringe (Figura 9A) e anfídeos (Figura 9B). Nas fêmeas a vulva fica perto da extremidade anterior na parte média ou posterior do corpo. O ânus é subterminal (Figura 9C). Ovejeter constituído por uma vagina claviforme de onde partem de nove a onze vestíbulos que dão origem a igual número de úteros e ovários. Os ovos possuem formato de conchas suaves e grossas, cada uma contendo uma larva de primeiro estágio (Figura 9D). Os machos possuem espículos subiguais pequenos e pouco quitinizados. Na extremidade posterior, os machos apresentam fasmídeos e amplas asas (Figura 9E), formando dobras que são sustentadas por quatro pares de papilas fortemente pedunculadas situadas lateralmente (Figura 9F). A região pericloacal é revestida exteriormente por formações cuticulares salientes, escamadas ou em cristas. A superfície ventral da cauda possui vinte e uma papilas, quatro pares de papilas pedunculadas (Figura 9F), 13 papilas sésseis que são divididas em pré-cloacais e pós-cloacais.

Resumo taxonômico**Espécie** *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1919**Local de infecção:** Estômago**Quantidade de espécimes encontrados:** 615 espécimes (301 machos e 314 fêmeas)**Prevalência:** 75% (55 infectados / 73 analisados)**Intensidade de infecção:** (mínimo-máximo): 1-84**Espécimes representativos:** (depósito em meio líquido, LBCE 16000)**Proveniência do hospedeiro:** Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca, Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro-RJ região serrana do Estado**Coordenada:** 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W e 22°02'09.49"S e 42°39'02.14"W

Comentários: O Nematóide *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1919 (Sinonímia: *Physaloptera turgida* Rudolphi, 1819; *Spiroptera turgida* Dujardin, 1845; *Physaloptera didelphidis virginiana* Leidy, 1851) foi descrito como um parasito do intestino delgado de *Didelphis (Didelphis) aurita* Wied, foi coletado na localidade de Manguinhos no município de Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Travassos em 1920 estudou as espécies do gênero *Turgida* Schulz, 1931 referindo-se como parasito de gambás brasileiros com altas prevalências que provavelmente poderia ser observado no Brasil todo a partir dos seus achados. Segundo Anderson *et al.* (2009) a superfamília Physalopteroidea, do ponto de vista da sistemática, não difere substancialmente de autor para autor. A família Physalopteridae, Leiper, 1908, está dividida em três subfamílias: Thubunaeinae, Proleptinae e Physalopterinae Railliet, 1893. Na subfamília Physalopterinae tem-se os gêneros *Physaloptera* Rudolphi, 1819 e *Turgida* Travassos, 1919. *Turgida turgida* é um parasito comum do estômago de marsupiais do novo mundo. A dentição cefálica em sua grande maioria, é considerada como um carácter valioso para taxonomia, pois apresenta um duplo par de dentes submedianos

presente em cada pseudolábio. Os ovos podem ficar viáveis por longos períodos no ambiente dadas as condições de umidade adequadas. Alicata (1937) foi o primeiro a mostrar que os ovos de *T. turgida* eclodem em baratas (*Blattella germanica*) e as larvas desenvolvem-se em cápsulas no intestino dos insetos.

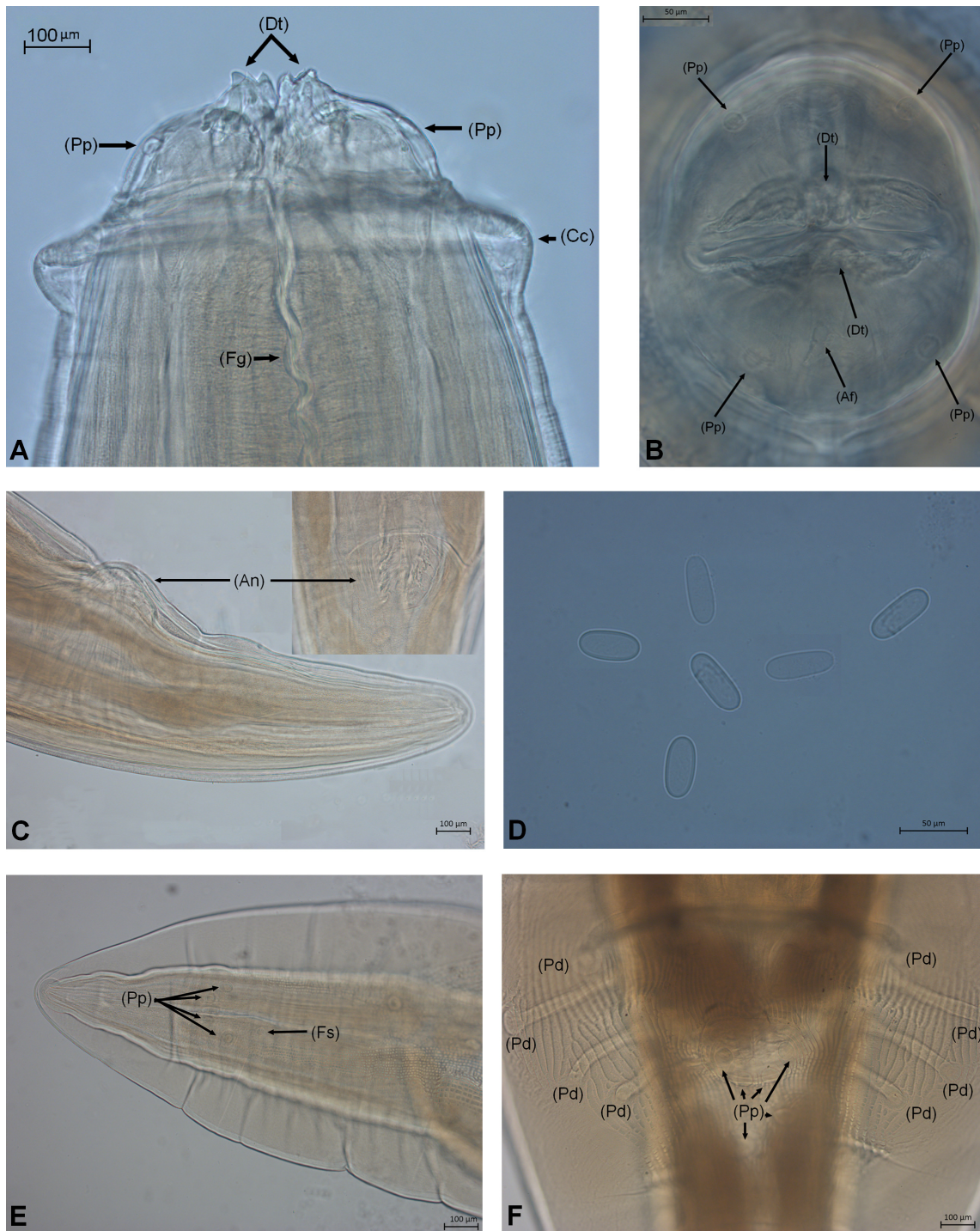


Figura 9: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Turgida turgida*. (A) Região anterior mostrando as papilas (Pp), dentículos (Dt), colar cefálico (Cc) e faringe (Fg). (B) Detalhes da região anterior mostrando papilas (Pp), dentículos (Dt) e anáfideo (Af). (C) Região posterior de uma fêmea mostrando o ânus. (D) Ovos uterinos. (E) e (F) Região posterior de um macho, em detalhes a bolsa mostrando papilas (Pp), papilas penduculadas (Pd) e fasmídeo (Fs).

4.1.2 Taxonomia das espécies de platelmintos de *Didelphis aurita*

Espécie *Duboisella proloba* Baer, 1938 (Figura 10)

Filo: Platyhelminthes

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Strigeidida

Superfamília: Diplostomoidea Poirier, 1886

Família: Strigeidae Railliet, 1919

Subfamília: Duboisellinae Baer, 1938

Gênero: *Duboisella* Baer, 1938

Descrição geral: *Duboisella proloba* apresenta corpo longo, cilíndrico ou claviforme, não claramente dividido em anterior e posterior, ligeiramente recurvado dorsalmente, com extremidade anterior tubular, com cavidade longa que se estende até o testículo anterior. A extremidade da cavidade delimita o corpo posterior curto e a extremidade posterior menor é fusiforme (Figura 10A). Glândula vitelinas distribuídas lateralmente no meio do corpo (Figura 10A). Órgão tribocítico grande, para retenção, situado na extremidade proximal da cavidade do corpo, estendendo-se da ventosa oral até ovário (Figura 10B). A ventosa oral subterminal apresenta esfíncter posterior (Figura 10C), ventosa ventral rudimentar, visível apenas em seções, faringe grande e volumosa (Figura 10C), esôfago curto, cecos intestinais que se prolongam até a extremidade posterior (Figura 10A). Vesícula seminal tubular com extremidade proximal alargada, seguida de canal ejaculador muito desenvolvido, grande, posteriormente com parede muscular rodeado de glândulas prostáticas. Testículos multilobados um atrás do outro no último terço do corpo e situados no mesmo campo (Figuras 10A e 10D). O ovário é arredondado semiesférico, pré-testicular e dorsal (Figuras 10B e 10D). Ootipo com glândula de Mehlis, pós-ovariano. A vesícula vitelínica fica perto do testículo anterior, com folículos vitelínicos distribuídos lateralmente na extremidade anterior. O útero que se estende longitudinalmente na parte ventral do corpo anterior, alcança o primeiro

terço do comprimento do corpo. O poro excretor é subterminal dorsal (Figura 10E) e os ovos são numerosos, grandes e operculados (Figuras 10A e 10F).

Resumo taxonômico

Espécie *Duboisella proloba* Baer, 1938

Local de infecção: Intestino Delgado

Quantidade de espécimes encontrados: 181 espécimes

Prevalência: 15% (11 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 1-88

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LABPMR 17666)

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W

Comentários: A família Strigidae abrange um grupo distinto de espécies com um corpo característico em forma de copo e um órgão de fixação rápida sob a forma de dois lóbulos (ventral e dorsal). O trabalho de Railliet (1919) criou a família Strigeidae para todas as espécies bisegmentadas e Cythocotyylidae para as espécies não segmentadas. Dubois (1938) restringiu a família Stigeidae a gêneros com corpo em forma de copo bilobado com órgão de fixação rápida e distinguiu as Subfamílias Strigeinae e Duboisellinae de acordo com os seus respectivos grupos de hospedeiros (Aves e mamíferos). A família Strigeidae é de parasitos de aves. Apenas o gênero *Duboisella* Baer, 1938, ocorre em mamíferos, e para esta razão está colocado separadamente na Subfamília Duboisellinae Baer, 1938.

O órgão de fixação rápida de *Duboisella* é composto por lóbulos dorsal e ventral, e situa-se na extremidade proximal de uma cavidade do corpo anterior muito longa que chega de volta ao testículo anterior. O útero localiza-se anteriormente no corpo e se estende até o primeiro quarto de seu comprimento. De todos os Strigeidae descritos, este é o único com tal distribuição uterina, o útero geralmente não se estende para o corpo anterior.

O trematódeo *Duboisella proloba* Baer, 1938 foi descrito como um parasito do intestino delgado de *D. aurita* coletado na localidade de Santos,

estado do São Paulo, Brasil. Dubois no mesmo ano redescreveu a espécie e em 1970 conduziu a espécie para os estrigídeos. Em 1977, Gomes redescreveu, novamente, adicionando medidas novas de caracteres diagnóstico para esta espécie de helminto. Nesta mesma redescrição, o autor relata *D. prolaba* parasitando *D. marsupialis* da Mata Atlântica, mas aqui fazemos uma correção na espécie do hospedeiro. Cerqueira; Lemos (2000) diferenciam as espécies e o local de distribuição no Brasil, mostrando que *D. marsupialis* ocorre na floresta amazônica e *D. aurita* ocorre na floresta Atlântica. Contudo, desde a sua última redescrição de *D. prolaba* no Brasil, nenhum outro relato havia sido observado, apesar de vários trabalhos terem sido publicados relatando a helmintofauna de espécies de marsupiais (Gomes, 1984; Silva & Costa, 1999; Gomes *et al.*, 2003; Antunes, 2005; Torres, 2007; Chagas-Moutinho *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015).

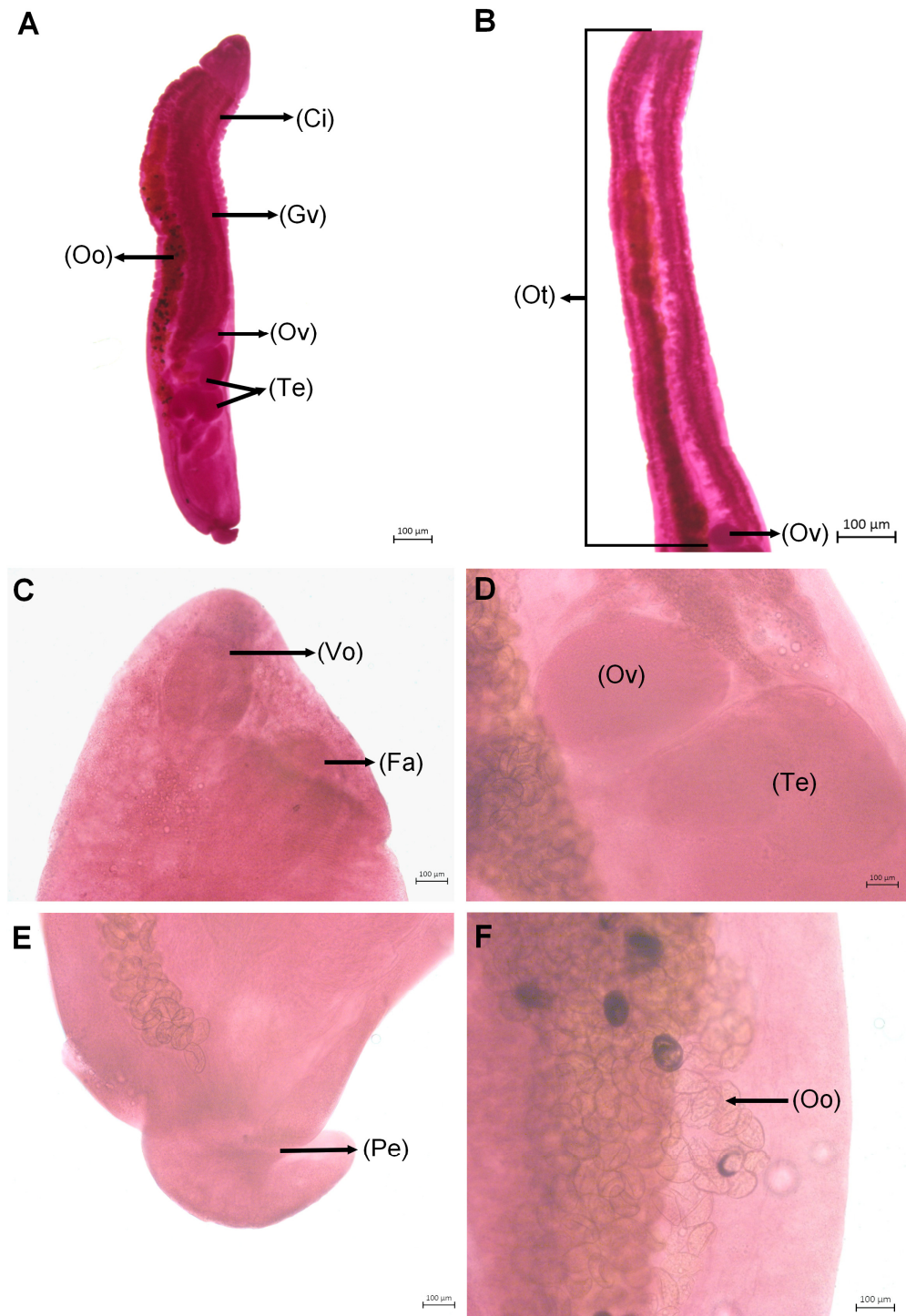


Figura 10: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Duboisella proloba*. (A) Vista total do helminto, mostrando Cecos intestinais (Ci), Glândulas vitelinas (Gv), Ovos (Oo), Ovário pretesticular (Ov), Testículos multilobados no mesmo campo (Te). (B) Órgão tribocítico (Ot) estendendo-se da ventosa oral até o nível do ovário (Ov). (C) Ventosa oral (Vo), Faringe (Fa). (D) Ovário elíptico (Ov) e Testículos (Te). (E) Poro excretor subterminal. (F) Útero repleto ovos (Oo) grandes e operculados.

Espécie: *Brachylaima advena* Dujardin, 1843, (Sinonímia: *Brachylaima (Brachylaima) advena* Dujardin, 1843; *Brachylaima opisthotrias* Lutz, 1895; *Brachylaima migrans* Dujardin, 1845) (Figura 11)

Filo: Platyhelminthes

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Brachylaemiformes

Superfamília: Brachylaimoidea Joyeux & Foley, 1930

Família: Brachylaimidae Joyeux & Foley, 1930

Subfamília: Brachylaiminae Joyeux & Foley, 1930

Gênero: *Brachylaima* Dujardin, 1843 (Sinonímia: *Brachylaime* Dujardin, 1843; *Brachylaimus* Dujardin, 1845; *Brachylaemus* Blanchard, 1847; *Harmostomum* Braun, 1899; *Heterolope* Loss, 1899; *Entosiphosnus* Sinitsin, 1931; *Cetrodes* Travassos & Kohn, 1964; *Mazzantia* Travassos & Kohn, 1964; *Rallitrema* Travassos & Kohn, 1964)

Descrição geral: *Brachylaima advena* apresenta o corpo alongado, com extremidades arredondadas e tegumento com pequenos espinhos. Apresenta ventosa oral subterminal, faringe musculosa, ausência de esôfago e ventosa ventral próxima a parte central do corpo (Figura 11A). O poro genital, geralmente, está situado no limite anterior do testículo anterior. Os cecos intestinais são retilíneos ou pouco sinuosos com dilatações irregulares e terminando na extremidade posterior do corpo (Figura 11A). Bolsa do cirro pequena com cirro, testículos arredondados no mesmo campo, um após o outro, situados no terço posterior do corpo (Figura 11A). Ovário mediano ou submediano mais ou menos arredondado, útero ultrapassando a zona acetabular com alças sinuosas com ovos operculados (Figura 11A). As glândulas vitelinas laterais ficam próximas ao testículo anterior e começam em níveis variados, constituídos por folículos, apresentando poro excretor terminal.

Resumo taxonômico

Espécie: *Brachylaima advena* Dujardin, 1843

Local de infecção: Intestino Delgado

Quantidade de espécimes encontrados: 214 espécimes

Prevalência: 16% (12 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 2-106

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 17666)

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca, Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W

Comentários: A história dessa família é complicada e tem sido confusa desde o começo. Mesmo na primeira publicação ligada a estes digenéticos, Dujardin (1843) usou dois nomes similares e genéricos: *Brachylaima* e *Brachylaima*. Mais tarde em 1945 Dujardin mudou o nome do gênero para *Brachylaimus*. Blanchard (1847) relatou que o nome genérico estava ortograficamente errado. Stiles & Hassall (1888) retornaram o nome do gênero para *Brachylaima* e Joyeux & Foley, 1930 elevaram a família Brachylaimidae Joyeux & Foley, 1930 e a subfamília Brachylaiminae Joyeux & Foley, 1930 à superfamília Brachylaimoidea Joyeux & Foley, 1930, baseado na ortografia de Blanchard. Esta nomenclatura foi aceita por Skrjabin (1948), Yamaguti (1958), Mehra (1962) e Travassos & Kohn (1964; 1966).

Travassos & Kohn (1966) consideraram que esse gênero *Brachylaima* Dujardin, 1843 desdobra-se em cinco subgêneros: *Brachylaima* Dujardin, 1843, *Centrodes* Travassos & Kohn, 1964, *Mazzantia* Travassos & Kohn, 1964, *Rallitrema* Travassos & Kohn, 1964 e *Maxtrema* Travassos, Freitas & Kohn, 1969, ainda ressaltaram que estes podem parasitar mamíferos silvestres e sinantrópicos, além de aves e raramente anfíbios. Freitas *et al.* (1967) também estudaram esta mesma espécie. *Rallitrema* Travassos & Kohn, 1964, foi rebaixado a subgênero por Yamaguti (1971), porém atualmente é considerado sinônimo de *Brachylaima*, porque os dois caracteres propostos por Yamaguti para separar este subgênero (posição do poro genital e a extensão do vitelino), ocorrem em todas as espécies deste gênero e, portanto, não é adequado para distinguir dois grupos.

O trematódeo *Brachylaima advena* Dujardin, 1843 foi redescrito por Gomes (1977) parasitando *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 da Mata

Atlântica, mas aqui fazemos uma correção na espécie do hospedeiro. Cerqueira & Lemos (2000) diferenciaram as espécies e o local de distribuição no Brasil, mostrando que *D. marsupialis* ocorre na floresta amazônica e *D. aurita* ocorre na floresta Atlântica. Contudo, desde a sua última redescoberta de *D. prolobo* no Brasil, nenhum outro relato havia sido observado, apesar de vários trabalhos terem sido publicados relatando a helmintofauna de espécies de marsupiais (Gomes, 1984; Silva & Costa, 1999; Gomes *et al.*, 2003; Antunes, 2005; Torres, 2007; Chagas-Moutinho *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015).

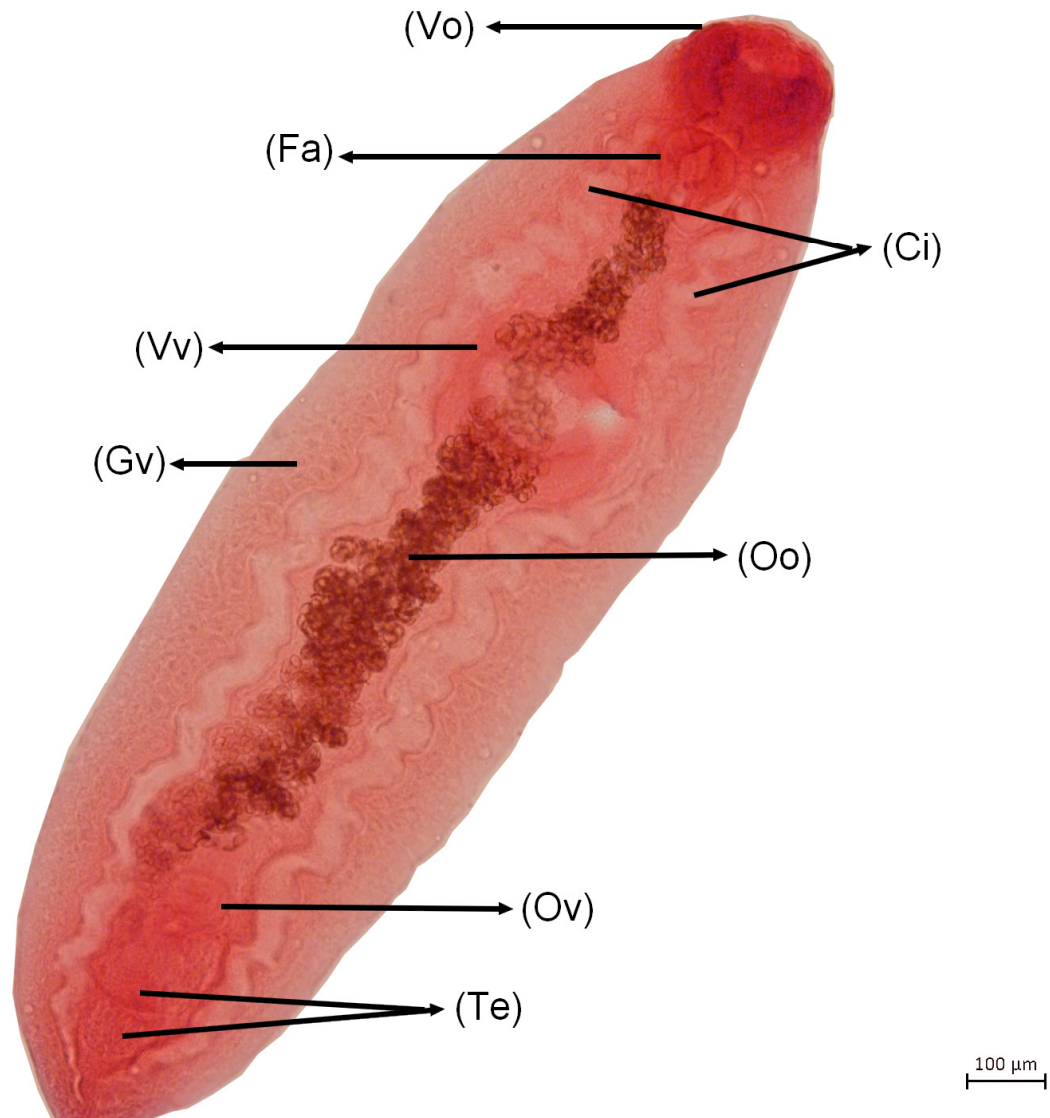


Figura 11: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Brachylaima advena*. (A) Vista total do helminto, mostrando Ventosa oral (Vo), Faringe (Fa), Cecos intestinais (Ci), Ventosa ventral (Vv), Glândulas vitelinas (Gv), Ovos (Oo), Ovário (Ov) e Testículos (Te).

Espécie: *Rhopalias coronatus* (Rudolphi, 1819) Stiles; Hassall, 1898
(Sinonímia: *Distoma coronatus* Rudolphi, 1819; *Rhopalophorus coronatus*
Diesing, 1850; 1851) (Figura 12)

Filo: Platyhelminthes

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Plagiorchiida

Subordem: Echinostomata

Superfamília: Echinostomatoidea Looss, 1899

Família: Rhopaliidae Looss, 1899 (Sinonímia: Rhopaliadae
Looss, 1899; Rhopaliadinae Braun, 1901; Rhopaliasidae Yamaguti, 1958;
Rhopaliasinae Travassos, Freitas & Kohn, 1969)

Gênero: *Rhopalias* Stiles; Hassall, 1898 (Sinonímia:
Rhopalophorus Diesing, 1850; *Rhopalocepholus* Lutz, 1895)

Descrição geral: *Rhopalias coronatus* apresenta o corpo alongado, expandido lateralmente na extremidade anterior chegando muitas vezes a ser arredondado e atenuado, pontiagudo, ventralmente côncavo na extremidade posterior pós-ventosa ventral (Figura 12A). Terço anterior do corpo armado com espinhos pequenos, uniformemente dispostos, tornando-se mais escasso posteriormente, com tegumento recoberto com pequenos espinhos, iniciando na parte posterior do colar se estendendo até a extremidade posterior do corpo (Figura 12A). Na porção anterior do corpo existe um grupo de espinhos que formam um colar bem desenvolvido com espinhos evidentes. Na extremidade anterior, ainda existe um par de probóscide retrátil, bilateralmente simétrica armada com espinhos, com bainhas grandes, estendendo-se lateralmente da ventosa oral, passando pela faringe e esôfago até a ventosa ventral (Figuras 12A e 12B). A ventosa oral é subterminal oval (Figura 12A). A pré-faringe está presente e bem desenvolvida, faringe muscular e esôfago de dimensões variáveis, mas geralmente curto (Figura 12A). A ventosa ventral está situada próximo à extremidade anterior do corpo, sendo maior que a ventosa oral (Figura 12A). Os cecos intestinais são simples terminando cegamente perto da extremidade posterior. O poro genital é mediano logo acima da ventosa ventral.

Bolsa do cirro bem desenvolvida, alongada e claviforme, mais ou menos curva, estendendo-se após a região acetábular até a região ovariana. Apresenta vesícula seminal bilobada, estreita e recurvada para trás, bem desenvolvida rodeada por numerosas células da glândula da próstata, cirro musculoso e região prostática, dois testículos alongados de forma oval, elípticos, medianos um atrás do outro no meio do corpo (Figuras 12A e 12D). Ovário elíptico a oval, pré-testicular (Figuras 12A e 12D). Glândulas de Mehlis presentes, vitelinos laterais, dispostos na porção posterior do corpo, folículos vitelínicos extra e intercecais, ocupando a região pós-testicular (Figura 12A). Um útero longo ou curto e pouco desenvolvido, localizado entre o ovário e o poro genital. Uma vesícula excretora tubular, alongada, usualmente grande, poro excretor terminal ou subterminal, ovo operculado, de ovais a elípticos de casca fina e lisa (Figuras 12A e 12C).

Resumo taxonômico

Espécie: *Rhopalias coronatus* (Rudolphi, 1819) Stiles; Hassall, 1898

Local de infecção: Intestino Delgado

Quantidade de espécimes encontrados: 93 espécimes

Prevalência: 5% (4 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 2-79

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 19444)

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca, Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S e 43°04'50.20"W

Comentários: Membros da família Rhopaliidae Looss, 1899 incluem trematóides digenéticos que são parasitos de marsupiais nas regiões Neotropical e Neoártica. Estas formas são caracterizadas por terem duas probóscides armadas com espinhos retráteis situadas lateralmente à ventosa oral. A família foi estabelecida primeiramente por Looss (1899) como Rhopaliadae.

Braun (1901) incorretamente escreveu o nome da subfamília como Rhopaliadinae. Estes trematóides foram ainda estudados e redescritos por Fühmann (1928) e Bresslau (1932), enquanto Pratt (1902) parece ter sido o primeiro a considerar o grupo como sendo relacionado aos equinóstomas. Viana (1924) escreveu o nome de família como Rhapaliidae. Skrjabin (1948) acompanhou o nome da espécie e considerou um sinônimo de Rhopiliadae. A ortografia Rhopaliasidae foi usada por Yamaguti (1958). Travassos *et al.* (1969) estabeleceu a subfamília Rhopaliasinae e Yamaguti (1971) sinonimizou Rhopaliasidae com Rhopaliidae.

O nome *Rhopalias* foi estabelecido por Stiles & Hassall (1898) para substituir *Rhopalophorus* Diesing, 1850, com *Distomum coronatum* Rudolphi, 1819 como espécie tipo, contudo o gênero *Ropalophorus* Westwood, 1840 (*Hymenoptera*) já vinha sendo utilizado. *Rhopalophorus* é sinônimo de *Rhopalias* Stiles & Hassall, 1898.

Lutz (1895) usou o nome *Rhopalocephalus*, sem citar uma autoridade de táxon, conjuntamente com os nomes das espécies *R. coronatus* (Rudolphi, 1819) e *R. horridus* (Diesing, 1850). Stiles & Hassall (1898) não mencionaram *Rhopalocephalus* e, presumivelmente, não sabiam disso. Esta nomenclatura parece não ter sido utilizado por outros autores anteriormente. Embora *Rhopalocephalus* seja o nome mais antigo, *Rhopalias* está bem estabelecido na literatura. Jones; Bray & Gibson, entraram com uma petição no ICZN (International Code of Zoological Nomenclature) para declarar *Rhopalocephalus* um *nomen oblitum*.

Os trabalhos dos autores abaixo seguiram a nomenclatura usada por Stiles & Hassall (1898) para nomear esta espécie: Braun, 1900; 1901; Travassos, 1916; Viana, 1924; Caballero, 1946; Skrjabin, 1946; Caballero & Monteiro Gei, 1961; Skrjabin, 1964; Prod'hon, 1968; Travassos *et al.*, 1969; Yamaguti, 1971; Gomes & Vicente, 1972; Lombardeiro & Moriena, 1973; Castro & Grisi, 1974; Komma & Alves, 1974.

O trematódeo *Rhopalias coronatus* (Rudolphi, 1819) Stiles; Hassall, 1898 foi estudado no Brasil por Gomes & Vicente (1972) parasitando *Philander opossum* Linnaeus, 1758, onde fizeram um estudo do gênero, com chave para identificação das espécies. Em 1977, Gomes relata *R. coronatus* parasitando *D. marsupialis* da Mata Atlântica, mas aqui fazemos uma correção na espécie

do hospedeiro. Cerqueira & Lemos (2000) diferenciaram as espécies e o local de distribuição no Brasil, mostrando que *D. marsupialis* ocorre na floresta amazônica e *D. aurita* ocorre na floresta Atlântica.

Segundo Gomes & Vicente, 1972, esta espécie apresenta várias sinônimas (*Distoma coronatum* Rudolphi, 1819; *Rhopalophorus coronatus* Diesing, 1850; 1851; *Distomum coronatum* Creplin, *R. coronatus* Diesing 1851; 1855; 1858; Cobbold, 1860; Carus, 1863; Linstow, 1878; 1879; Braun, 1892; 1893; *Echinostomum coronatum* Stossich, 1892; *R. coronatus* Monticelli, 1893; Kaiser, 1893; Stiles; Hassall, 1894; Lutz, 1895; Perrier, 1897; *Rhopalias coronatus* Stiles; Hassall, 1898; *Echinostoma coronatus* Stossich, 1892; Looss, 1899; *D. coronatum* Braun, 1900; *R. coronatus* Braun, 1900, *E. coronatus* Braun, 1900; *R. coronatus* Braun, 1901; Benham, 1901; Mola, 1907; Travassos, 1916; Viana, 1924; Lutz, 1928; Chandler, 1932; Hearin, 1938; Caballero, Bravo Hollis & Cerecero, 1944; Caballero, 1946; Skrjabin, 1948; Caballero & Vogelsang, 1949; Wolfgang, 1951, Caballero, Brenes Madrigal & Jimenez Quiroz, 1957; Sandars, 1958; Caballero & Diaz Ungria, 1958; Yamaguti, 1958; Caballero & Montero-Gei, 1961; Lumssem & Zischke, 1961; Skrjabin, 1964; Prod'Hon, 1968; *Rhopalias dobbini* Prod'Hon, 1968; *Rhopalias coronatus* Travassos *et al.*, 1969). Apesar de vários trabalhos terem sido publicados relatando a helmintofauna de marsupiais no Brasil (Silva & Costa, 1999; Gomes *et al.*, 2003; Antunes, 2005; Torres *et al.*, 2009; 2015; Chagas-Moutinho *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2014), desde a sua última redescrção, nenhum outro relato desta espécie foi observado em *D. aurita*. No Brasil ainda ocorrem mais duas espécies deste gênero: *Rhopalias horridus* (Diesing, 1850) Stiles; Hassall, 1898 e *Rhopalias baculifer* Braun, 1900 parasitando outros marsupiais.

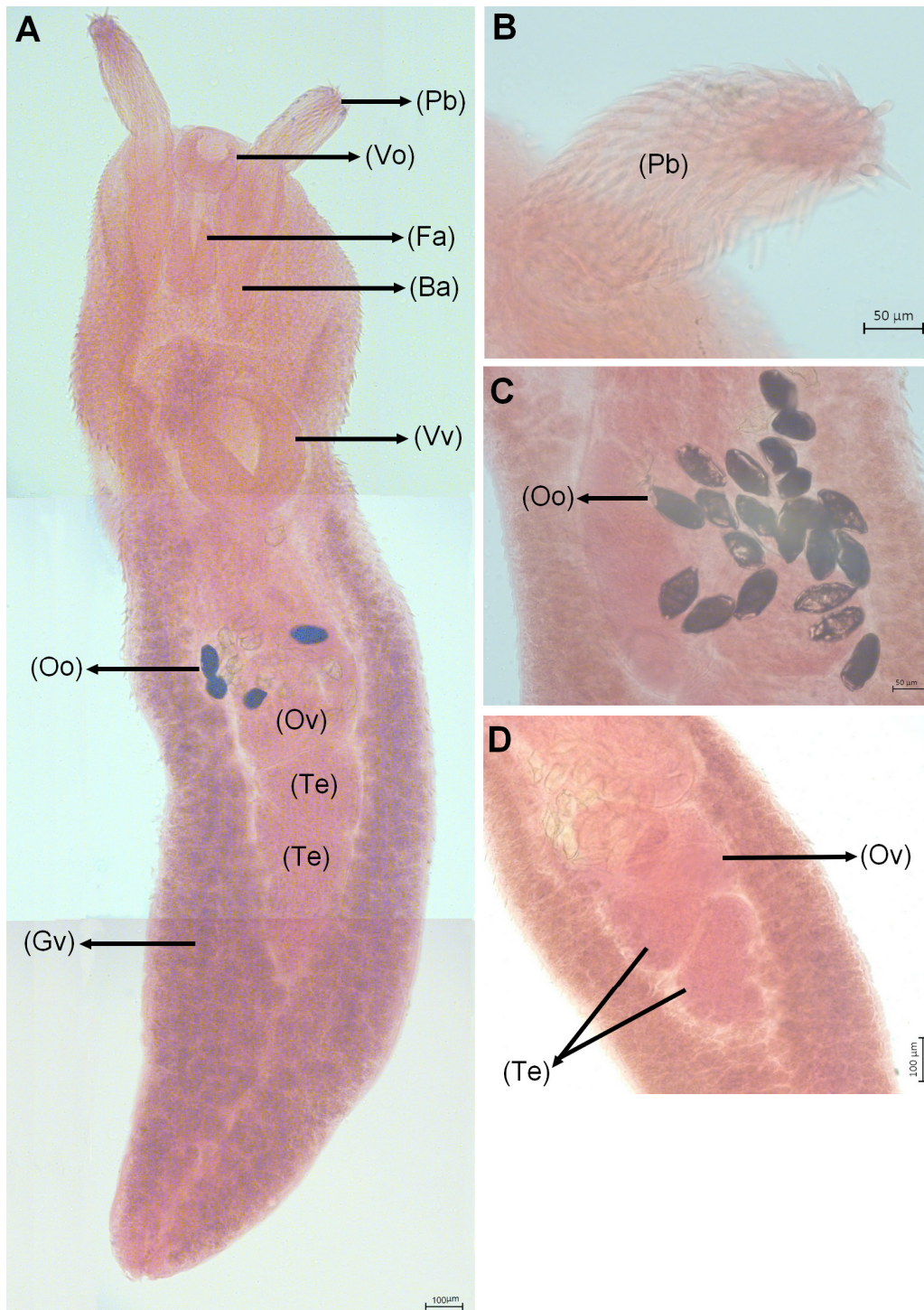


Figura 12: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Rhopalias coronatus*. (A) Vista total do helminto, mostrando a probóscide (Pb), Ventosa oral (Vo), Faringe (Fa), Bainha da Probocísce (Ba), Ventosa ventral (Vv), Ovos (Oo), Ovário (Ov), Testículos (Te), Glândulas vitelinas (Gv). (B) Detalhe da probóscide (Pb). (C) Região do meio do corpo com Útero repleto de ovos (Oo), (D) com Ovário elíptico (Ov) a oval, pretesticular e dois testículos ovais (Te) um atrás do outro.

Filo: Platyhelminthes

Classe: Cestoda (Figura 13)

Descrição geral: Este cestoda apresenta escólice com quatro ventosas, sem rostelo armado com ganchos, ventosas sem espinhos (Figura 13A). Os proglotes maduros são mais largos do que longos, havendo ao longo do corpo uma diminuição crescente da largura e aumento do comprimento (Figura 13B), sendo os proglotes grávidos ligeiramente mais longos do que largos (Figura 13B). Não foi possível observar os testículos. Bolsa do cirro e Ovário. Ovos com embriões (Figura 13C).

Resumo taxonômico

Local de infecção: Intestino Delgado

Quantidade de espécimes encontrados: 4 espécimes

Prevalência: 1,36% (1 infectado / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 4

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 19477)

Proveniência do hospedeiro: Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos

Coordenada: 22°28'58.51"S, 43°04'50.20"W

Comentários: Foi encontrado apenas 4 espécimes, o que impossibilitou a morfometria para fazer o diagnóstico desta espécie. Apesar da Classe Cestoda apresentar apenas a família Anoplocephalidae (Furhmann, 1907) parasitando os marsupiais brasileiros (Thatcher, 2006), não foi possível fazer o resultado final do diagnóstico.

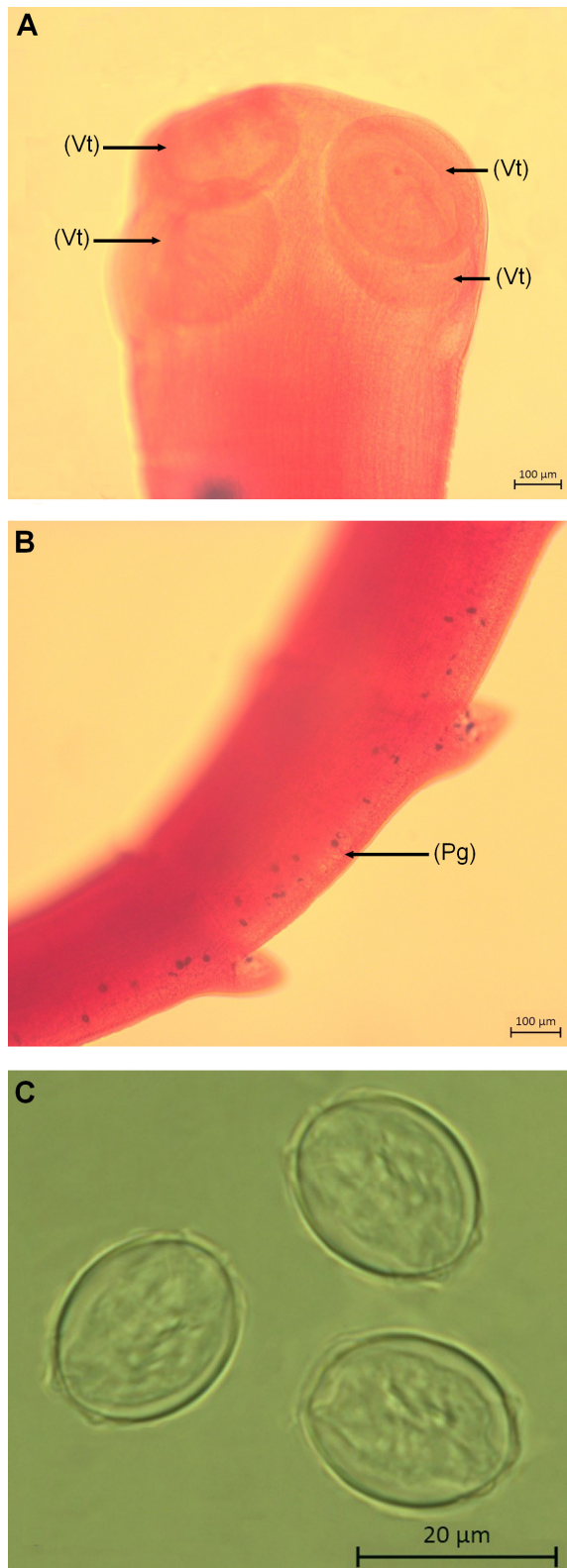


Figura 13: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de Cestoda. (A) Região anterior, mostrando os escólices sem rostelo e as ventosas (Es). (B) Proglótides jovens imaturas (Pg). (C) Ovos maduros.

4.1.3 Taxonomia da espécie de acantocefala de *Didelphis aurita*

Espécie *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972 (Figura 14)

Filo: Acanthocephala Rudolphi, 1802

Classe: Archiacanthocephala Meyer, 1931

Ordem: Oligacanthorhynchida Petrochenko, 1956

Família: Oligacanthorhynchidae Southwell & Macfie, 1925

Gênero: *Oligacanthorhynchus* (Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972

Descrição Geral: *Oligacanthorhynchus microcephalus*, apresenta machos e fêmeas com uma probóscide globular armada com ganchos, sustentada por um pescoço livre de espinhos e na base deste são encontrados os lemniscos, receptáculo da probóscide presente (Figura 14A). Corpo cilíndrico e espesso, opaco e mostrando rugas transversais; lemnisco filiforme curto, geralmente não ultrapassa a região anterior do corpo. Machos apresentam testículos elipsoides um após o outro na região posterior ou na região média do corpo, oito glândulas de cimento em forma de ovoíde com formato reniforme, bolsa copulatória em forma elipsoide. Fêmeas possuem ovejeter alongado com bordas sulcadas, apresentando um grande esfíncter próximo à vagina e com gonoporo subterminal na região posterior, trato reprodutivo (a partir da borda anterior do sino uterino para poro genital), poro genital ligeiramente subterminal. Os ovos são elipsoides, na sua grande maioria embrionados, possuem três membranas com uma mais externa e mais espessa esculpida. A probóscide consiste de seis séries espirais com seis diferentes ganchos, morfologicamente de tamanhos diferentes com forma semifalciforme (Figuras 14B e 14C), variando de um gancho robusto no topo da probóscide a ganchos simples na base da mesma (Figura 14C). Os ganchos possuem tamanhos similares em ambos os sexos.

Resumo taxonômico

Espécie *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972

Local de infecção: Intestino Delgado

Quantidade de espécimes encontrados: 112 espécimes (42 machos e 70 fêmeas)

Prevalência: 37% (27 infectados / 73 analisados)

Intensidade de infecção: (mínimo-máximo): 1-42

Espécimes representativos: (depósito em meio líquido, LBCE 17666)

Proveniência do hospedeiro: Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Estadual da Pedra Branca, Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro-RJ, Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro-RJ região serrana do Estado

Coordenada: 22°56'18.00"S e 43°24'10.13"W e 22°28'58.51"S, 43°04'50.20"W e 22°02'09.49"S e 42°39'02.14"W

Comentários: O acantocefalo *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972 foi originalmente descrito como *Echinorhynchus microcephalus* por Rudolphi (1819) parasitando o intestino delgado de *Caluromys philander* (Linnaeus, 1758). Leidy (1850), originalmente descreveu *Oligacanthorhynchus tortuosa* como *Echinorhynchus tortuosa* de *Didelphis virginiana*. Leidy (1856) considerou *E. tortuosa* como sinônimo de *E. microcefalia*. A sinonímia de *E. tortuosa* e *E. microcefalia* foi reconhecida por Porta (1909) e Travassos (1917). Travassos (1915) transferiu *E. microcephalus* ao gênero *Hamanniella*. Van Cleave (1924) reconheceu a validade de *E. tortuosa* unicamente com base na comparação com ovos retirados de um suposto espécime de acantocéfalo *H. microcephalus* coletado de um *Didelphis aurita* por Travassos no Brasil. Infelizmente, Van Cleave (1924) parece não ter examinado o espécime tipo de *O. microcephalus*, sobre o qual Rudolphi baseou sua descrição original. Southwell & Macfie (1925) determinaram que o gênero *Hamanniella* era sinônimo júnior de *Oligacanthorhynchus*, embora esta sinonímia não tenha sido amplamente aceita até sua aprovação por Schmidt (1972) em sua revisão da classe Archiacanthocephala. Até a redescrição de *O. microcephalus* por Richardson *et al.* (2014), a maioria dos trabalhos reconhecia

duas espécies de *Oligacanthorhynchus* de gambás do Novo Mundo: *O. microcephalus* proveniente dos gambás Sul Americanos e *O. tortuosa* do gambá Norte Americano. Neste trabalho, Richardson *et al.* (2014) confirmou que *O. microcephalus* é a única espécie válida, sendo *O. tortuosa* seu sinônimo.

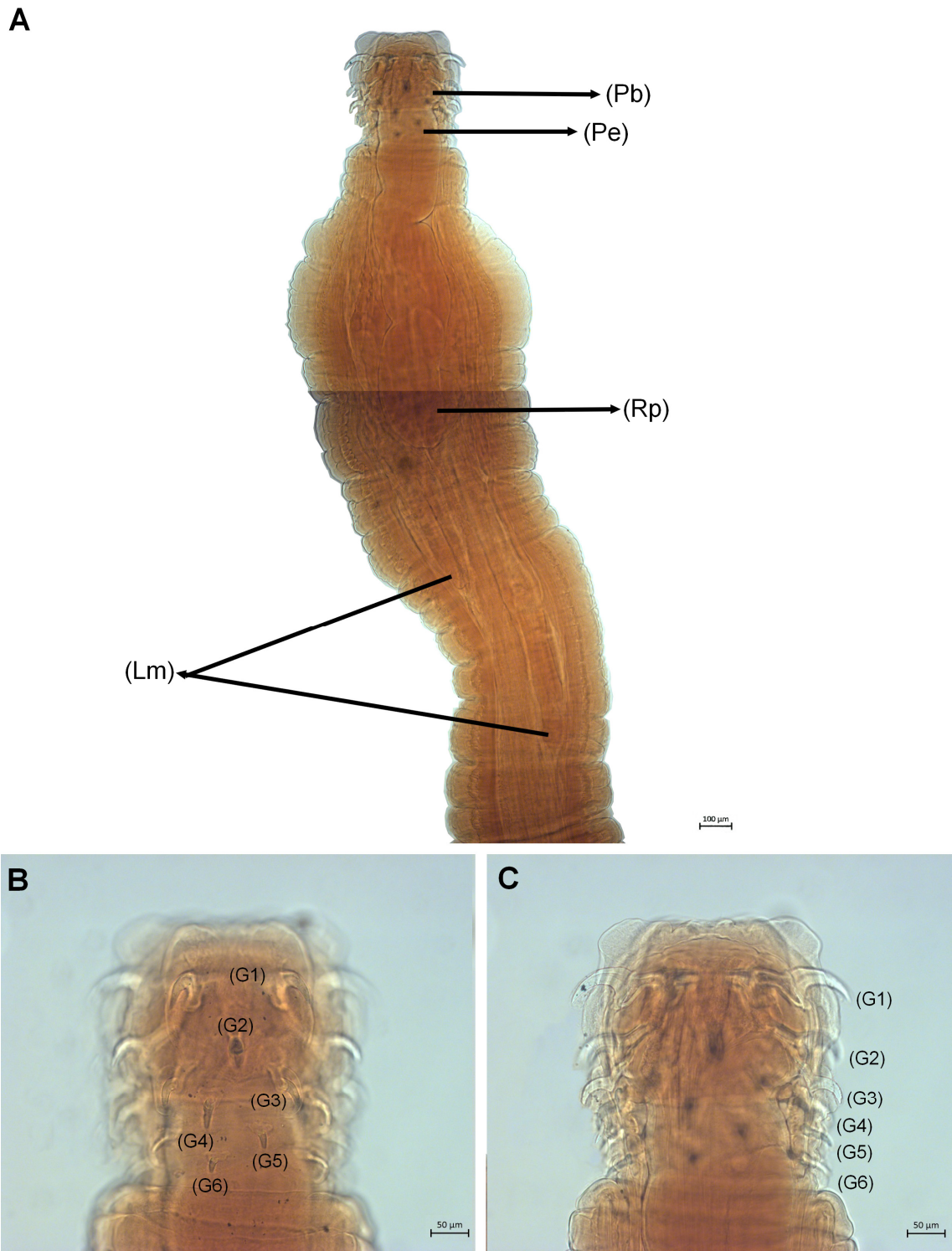


Figura 14: Microscopia óptica (campo claro) de helmintos adultos de *Oligacanthorhynchus microcephalus*. (A) Região anterior, mostrando probóscide globular armada com ganchos (Pb), pescoço livre de espinhos (Pe), receptáculo da probóscide presente (Rp) e lemniscos (Lm). (B e C) Detalhe da probóscide com seis séries de seis ganchos, com forma semifalciforme, ganchos variando de tamanho do topo até a base da probóscide (G1, G2, G3, G4, G5 e G6).

4.2 Comentários e discussão geral sobre a helmintofauna

Conforme observado neste estudo, a relação parasito-hospedeiro em *D. aurita* ainda não foi estudada, assim como a intensidade desse parasitismo nesta espécie de mamífero e os efeitos sobre a expectativa de vida e saúde. Pesquisas adicionais são necessárias para avaliar a presença desses helmintos em outros mamíferos, a fim de elucidar o papel do gambá na propagação das helmintíases para outros mamíferos nas áreas periurbanas.

O filo Nematoda foi o mais abundante dentre toda a helmintofauna de *D. aurita*. Outros estudos desenvolvidos com helmintos de pequenos mamíferos na Mata Atlântica também registraram este mesmo padrão (Brouat *et al.*, 2007; Navone *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2011), sugerindo que os nematoides sejam o principal filo de helmintos parasitos de mamíferos (Politz & Philipp, 1992).

Dentre as quatorze espécies de helmintos encontradas no presente estudo, oito apresentam ciclos de vida direto e seis, ciclos indiretos. Considerando-se somente o Filo Nematoda, que foi o que apresentou maior número de espécies, sete dentre as nove espécies encontradas têm ciclo direto de transmissão. Estes resultados corroboram o estudo de Jiménez *et al.* (2011), que também encontraram maior número de espécies de helmintos com ciclo direto em comunidades de helmintos *D. marsupialis*. De acordo com Combes (1991), uma alta diversidade de itens alimentares, como é o caso apresentado pelo gambá, pode reduzir as chances do hospedeiro definitivo se infectar com parasitos que utilizam hospedeiros intermediários no seu ciclo de vida.

A espécie *Heterostrongylus heterostrongylus* foi a única espécie encontrada que apresenta especificidade de hospedeiro para *D. aurita*, segundo registros de literatura (Travassos, 1925; Anderson *et al.*, 1980; Vicente *et al.*, 1997). Todas as outras espécies já haviam sido registradas para outras espécies do gênero *Didelphis* ou outros gêneros de mamíferos. Este estudo constitui o primeiro registro das espécies de *Globocephallus marsupialise* e *Trichuris didelphis* para o gambá *D. aurita*.

5 CAPÍTULO 2

Este capítulo já foi publicado

Sócrates Fraga da Costa Neto, Raquel de Oliveira Simões, Éster Maria Mota,
Roberto do Val Vilela, Eduardo José Lopes Torres, Helene Santos Barbosa,
Rosana Gentile, Arnaldo Maldonado Junior

Veterinary Parasitology 228 (2016) 144–152

**Helminto de pulmão *Heterostrongylus heterostrongylus* Travassos, 1925 do
gambá de orelha preta da América do Sul: aspectos morfológicos,
histopatológicos e filogenéticos**

1 INTRODUÇÃO

Nematoides parasitos do sistema cardiopulmonar de mamíferos despertaram interesse na comunidade científica e nos médicos veterinários devido aos seus efeitos patológicos graves em animais de produção (Silva *et al.*, 2005), animais de companhia (Traversa *et al.*, 2014), animais silvestres (Veronesi *et al.*, 2016) e animais sinantrópicos (Simões *et al.*, 2011). Como exemplos, podemos citar *Muellerius capillaris* e *Protostrongylus rufencens* que parasitam as vias respiratórias de cabras e ovelhas (Berrag & Urguhart, 1996); *Aelurostrongylus abstrusus*, *Troglostrongylus* spp. e *Angiostrongylus chabaudi* que afetam gatos domésticos e felinos silvestres europeus (Brianti *et al.*, 2012; Di Cesare *et al.*, 2015); e *Angiostrongylus cantonensis* que parasitam *Rattus norvegicus* (Simões *et al.*, 2014).

Embora a infecção por helmintos possa influenciar as populações de mamíferos silvestres através de uma forte ação debilitante promovida pelos efeitos patológicos (Lamberski *et al.*, 2002), pouco se sabe sobre as consequências do parasitismo por infecção de angiostrongilídeos em mamíferos silvestres. Em relação aos nematoides do sistema cardiopulmonar de marsupiais, *Didelphostrongylus hayesi* (Prestwood, 1976) e *Heterostrongylus heterostrongylus* (Travassos, 1925) têm sido relatadas parasitando *Didelphis marsupialis* e *D. aurita*, respectivamente. No entanto, apenas *Didelphis virginiana* teve alterações patológicas relatadas devido à infecção por *D. hayesi*, que incluem alterações pulmonares e reações de células inflamatórias difusas (Prestwood *et al.*, 1977).

Travassos (1925) descreveu o helminto de pulmão *H. heterostrongylus* como um nematoide parasito do sistema pulmonar do marsupial *D. aurita* no estado do Rio de Janeiro, Brasil, e atribuiu este à família Metastrongylidae. Anderson *et al.* (1980) redescreveu *H. heterostrongylus* e transferiu para a família Angiostrongylidae com base na morfologia dos lábios. No entanto, dois pontos principais persistem em relação a este helminto. O primeiro ponto é a necessidade de se estabelecer caracteres diagnósticos que levaram à classificação atual. Em segundo lugar, há uma falta de compreensão das

afinidades filogenéticas deste nematoide dentro da família Angiostrongylidae, particularmente em relação a sua ligação com *D. hayesi*.

Em vista disso, nós aqui detalhamos a morfologia do *H. heterostrongylus* por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz e realizamos análises filogenéticas moleculares, a fim de se determinar as suas relações dentro da família Angiostrongylidae. Adicionalmente, reportamos consequências patológicas desta infecção por helmintos em gambás *D. aurita* naturalmente infectados, coletados em uma floresta urbana na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo e descrição do habitat

Os gambás foram capturados no Campus Fiocruz Mata Atlântica: 22° 56'S 43° 24'W), na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Este campus está localizado nos arredores do Parque Estadual da Pedra Branca, que é a maior floresta urbana do Brasil. A área de estudo é composta por um mosaico de diferentes habitats, incluindo áreas preservadas e perturbadas, florestas e áreas de interface entre os ambientes silvestre e habitações humanas no perímetro urbano.

2.2 Coleta e identificação dos marsupiais

As capturas ocorreram a cada quatro meses, entre julho de 2012 e abril 2014 em seis transectos com 20 pontos cada, representando os diferentes habitats descritos acima. Em cada ponto, foi colocada uma armadilha Tomahawk® (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm) no chão. Cada sessão durou cinco dias consecutivos.

Os marsupiais foram capturados, anestesiados e realizado eutanásia a fim de se recuperar os helmintos e outras amostras. O material testemunho foi depositado na coleção científica do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Museu Nacional, UFRJ). Todos os procedimentos seguiram as normas para a captura, manuseio e cuidados de acordo com o Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (número de licença CEUA L – 066/08; L-049/08 e LW81/12). As licenças para captura de animais foram concedidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio número de autorização 13373-1) e pelo Instituto Estadual do Ambiente do Estado do Rio de Janeiro (INEA-020/2011) de acordo com a regulamentação brasileira. Os profissionais foram treinados e procederam de acordo com as práticas e técnicas de biossegurança, havendo equipamentos de proteção individual durante todos os procedimentos que envolveram a

manipulação de animais e de coleta de amostra biológica, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (Lemos & D'Andrea, 2014).

2.3 Recuperação de helmintos e análises morfológicas

As cavidades torácica e abdominal dos marsupiais foram examinadas quanto à presença de helmintos. Os órgãos foram separados em placas de Petri e dissecados usando-se um microscópio estereoscópico para remover pequenos helmintos. Os espécimes de helmintos recolhidos foram lavados duas vezes em solução salina (0,9% de cloreto de sódio em água destilada), a fim de se remover os detritos de tecido. Parte das amostras dos helmintos foram fixadas em AFA quente (2% de ácido acético glacial, 3% de formaldeído e 95% de etanol) (Amato *et al.*, 1991). Outras amostras foram mantidas em 70% de etanol para análise molecular. Para microscopia de luz, foram clarificados dez espécimes machos e dez fêmeas em 80% de fenol, colocados em lâminas temporárias, e examinados utilizando-se um microscópio de luz Zeiss standard 20. O material testemunho dos helmintos foi depositado na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (número CHIOC: 38319).

Foram utilizadas duas técnicas diferentes de preparação de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): 1ª. Os helmintos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 4% preparado com tampão fresco de cacodilato 0,1 M com pH 7,2, posteriormente lavados em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2), em seguida foram pós-fixados durante 2 h em tetróxido de ósmio OsO₄ a 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% K₃Fe (CN)₆ pH 7,2, desidratados numa série gradual de etanol (20-100° GL) durante 20 min cada passo, secos em ponto crítico com CO₂, montados em bases metálicas e revestidos com uma camada 20-25 nm ouro (Torres *et al.*, 2013.); 2ª. Os helmintos foram fixados em AFA, lavados em tampão de cacodilato de sódio 0,1 mM (pH 7,4) três vezes durante 15 min, e pós-fixados durante 2 h em tetróxido de ósmio OsO₄ a 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% K₃Fe (CN)₆ no mesmo tampão com pH 7,2, posteriormente lavados três vezes durante 15 min de cada vez, desidratados numa série ascendente de etanol durante 20 min cada (30-100° GL), secos utilizando-se o método do ponto crítico com CO₂ líquido, montados em bases de alumínio e revestidos com uma camada de 25

nm de ouro (Mafra & Lanfredi, 1998). As amostras foram examinadas usando-se microscópio modelo JEOL JSM-6390 na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, PDTIS/FIOCRUZ, e modelo JEOL JSM 5310 na Plataforma de Microscopia Eletrônica CENABIO-UFRJ (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

2.4 Recuperação das larvas

As larvas L₁ foram obtidas a partir de fezes de gambás naturalmente infectados de acordo com a técnica de Baermann-Moraes (Baermann, 1917; Moraes, 1948). Posteriormente, espécimes de *Biomphalaria glabrata* foram expostos individualmente a 30 larvas L₁ de um dia para o outro. Quarenta dias após a exposição, os moluscos foram colocados numa solução de HCl a 0,7% para a digestão durante seis horas, a fim de se recuperar as larvas L₃, pela metodologia de Baermann (1917) e Moraes (1948).

2.5 Análise histopatológica

Os tecidos pulmonares foram lavados em solução salina, segmentados, e fixados em formalina de Carson Millionig de um dia para o outro. Posteriormente, os tecidos pulmonares foram desidratados em concentrações progressivas de álcool etílico, diafanizados usando xilol e embebidos em blocos de parafina para proporcionar cortes seriados de 5µm. As secções de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina e examinadas sob um microscópio de luz (Humason, 1979).

2.6 Análises moleculares e filogenéticas

Amostras de DNA genômico foram isoladas a partir de seis helmintos individualizados, usando-se o Kit Qiagen QIAamp DNA Mini, de acordo com o protocolo do fabricante.

A amplificação parcial do gene nuclear da subunidade pequena do RNA ribossômico (18S) foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase

(PCR) utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores “primers” senso 47 (5'-CCCGATTGATTCTGTCCGGC) e anti-senso 112 (5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC); senso 135 (5'-CGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGC) e anti-senso 136 (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC) para produzir dois fragmentos sobrepostos (Carreno & Nadler, 2003).

Os fragmentos amplificados foram submetidos a reações cíclicas de sequenciamento, utilizando-se o Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) em ambas as cadeias com os “primers” mencionados acima, resultando em sequenciamento bidirecional para uma melhor precisão de dados. A leitura do sequenciamento foi realizada utilizando-se o analisador de DNA ABI 3730. Ambos os procedimentos, bem como a precipitação dos produtos da reação de sequenciamento, foram realizados na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz, PDTIS/FIOCRUZ. Os fragmentos foram reunidos em sequências contíguas e editados para ambiguidades usando-se o software ChromasPro 1,5 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>), resultando numa sequência de consenso. A sequência de consenso foi depositada no banco de dados GenBank com o número de acesso: KX426262.

As sequências de consenso foram alinhadas com sequências de representantes da família Angiostrongylidae obtidos no Genbank (Tabela 1). Como grupo externo, foram adicionadas sequências de *Ancylostoma caninum* e *Necator americanus*, também do Genbank (Tabela 1). Produzimos o alinhamento para as sequências do gene 18S utilizando-se o programa de alinhamento incremental “online” SILVA (SINA v1.2.11) (Pruesse *et al.*, 2012). Os resultados dos alinhamentos foram cortados nas regiões mal alinhadas usando o pacote Mesquite (MADDISON; MADDISON, 2015).

Usamos o programa PAUP* versão 4.0a147 (Swofford, 2002) para calcular as distâncias entre pares corrigidos sob o modelo de máxima verossimilhança HKY+I, escolhido pelo critério de informação Bayesiano (BIC) (Schwarz, 1978) e teoria da decisão (DT) (Minin *et al.*, 2003), usando o mesmo programa.

Também foi utilizado o programa PAUP* para produzir reconstruções filogenéticas usando máxima parcimônia (MP) como critério de otimização. Os

suportes dos ramos na árvore de MP foram obtidos por percentagens de “bootstrap” não paramétrico (MP-BP), calculadas sobre 10.000 pseudoreplicações.

Reconstruções filogenéticas usando máxima verossimilhança (ML) como critério de otimização foram realizadas usando o programa Treefinder versão de março 2011 (Jobb, 2011). O modelo evolutivo foi escolhido pelo BIC usando o mesmo software. Os suportes dos ramos na árvore de ML foram obtidos pelas probabilidades esperadas aplicadas aos pesos dos rearranjos locais da topologia da árvore (LR-ELW) calculadas sobre 1.000 repetições, e pelas percentagens de “bootstrap” não paramétricas (ML-BP) calculadas sobre 1.000 pseudoreplicações.

Tabela 1: Números de acesso das sequências obtidas no GenBank e os hospedeiros dos parasitos.

Espécies de Nematoides	Números de acesso GenBank	Hospedeiro
	18S	
<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	AJ920366	<i>Felis catus</i>
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	AY295804	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Angiostrongylus costaricensis</i> 1	LK942974	<i>Sigmodon hispidus</i>
<i>Angiostrongylus costaricensis</i> 2	DQ116748	<i>Sigmodon hispidus</i>
<i>Angiostrongylus costaricensis</i> 3	EF514913	<i>Sigmodon hispidus</i>
<i>Angiostrongylus dujardini</i>	EF514915	<i>Myodes glareolus</i>
<i>Angiostrongylus malaysiensis</i>	EF514914	<i>Rattus tiomanicus</i>
<i>Angiostrongylus vasorum</i> 1	EF514916	<i>Vulpes vulpes</i>
<i>Angiostrongylus vasorum</i> 2	AJ920365	<i>Vulpes vulpes</i>
<i>Didelphostrongylus hayesi</i>	AY295806	<i>Didelphis virginiana</i>
<i>Heterostrongylus heterostrongylus</i>	KX426262	<i>Didelphis aurita</i>
<i>Ancylostoma caninum</i>	AJ920347	<i>Canis familiaris</i>
<i>Necator americanus</i>	AJ920348	<i>Homo sapiens</i>

A inferência filogenética Bayesiana foi realizada usando-se o programa MrBayes versão 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) em XSEDE no servidor CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). As análises Bayesianas foram realizadas

utilizando-se o modelo GTR+I+ Γ . Reamostragens pelo método Monte Carlo, baseado em cadeias Markovianas (MCMC) foram realizadas por 10.000.000 gerações, com quatro cadeias simultâneas, em duas corridas. A robustez dos ramos na árvore Bayesiana foi avaliada pelas probabilidades posteriores Bayesianas (BPP), calculadas a partir de amostras de árvores a cada 100 gerações, após a remoção de uma fração de 25% “burn-in”. Para avaliar a adequação de nossa amostragem, utilizamos o programa Tracer versão 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) para calcular o tamanho da amostra efetiva (ESS) de cada parâmetro. Valores acima de 100 amostras efetivamente independentes foram considerados suficientes.

3 RESULTADOS

3.1 Descrições da morfologia por microscopia eletrônica de varredura e de luz

Os helmintos adultos apresentam dimorfismo sexual. O corpo da fêmea era maior e mais robusto do que o do macho, e ambos tinham uma linha lateral longitudinal discreta ao longo do corpo (Figura 1A). As extremidades anteriores tinham estruturas semelhantes em ambos os sexos, e uma abertura oral, tendo dois lábios robustos trilobados, cada lobo com uma papila abobadada interna. Além disso, havia um par de papilas na borda externa dos lábios laterodorsal e latroventral. Anfídeos foram localizados externamente às papilas laterais (Figura 1B e a Figura 3A). A abertura bucal era circular e visível. (Figura 1C). A cutícula cefálica dobrou-se, formando um colar cefálico (Figura 1 D). A bolsa copulatória era arredondada e robusta com o lóbulo direito visualizada, mostrando os raios ventrais, laterais, posterodorsal, e dorsal na margem (Figuras 2A e 3B). A extremidade posterior da fêmea era digitiforme com a vulva situada transversalmente com uma borda saliente e perto da extremidade do corpo, com o ânus localizado numa fenda transversal na extremidade posterior (Figuras 2B e 3C). Os ovos elípticos eram ornamentados por sulcos longitudinais na superfície da casca (Figura 2C), ovos embrionados com uma concha hialina foram vistos sob o microscópio de luz (Figura 3D). Foram vistas larvas rabditóides L₁ com cutícula lisa. O comprimento total foi de 201.5 µm e 16.4 µm de largura. O esôfago foi de 85 µm de comprimento. O poro excretor, anel nervoso e primórdio genital não foram observados. A cauda era curvada, terminando em uma ponta afilada (Figura 3D). O ânus tinha 21 µm a partir da extremidade caudal (Figura 3D). As larvas de terceiro estágio, eram filiformes com cutícula lisa. O comprimento total foi de 1,010 µm e 54 µm de largura (Figura 2D). O esôfago tinha 425 µm de comprimento. Uma estrutura em formato de bastão apresentava 0,7 µm de comprimento. O poro excretor tinha 143 µm a partir da extremidade anterior. Não foi observado anel nervoso e primórdio genital. Uma protuberância ventral em forma de botão estava

localizada 34 µm a partir da extremidade posterior. O ânus tinha 83 µm (Figura 3E).

3.2 Histopatologia

Os aspectos macroscópicos dos pulmões revelaram numerosas áreas de aglutinação, regiões multifocais, e irregularidades na superfície do órgão, indicando alterações em todo o tecido pulmonar devido à infecção. Não houve alteração na morfologia dos helmintos, mesmo em amostras recuperadas associadas com o desenvolvimento de granuloma no pulmão. Foram observados brônquios congestionados com exsudato catarral esverdeado e espessamento do parênquima, mostrando áreas hemorrágicas multifocais e sugerindo broncopneumonia lobular (Figura 4A). A histopatologia do lobo pulmonar dos gambás revelou infiltrados inflamatórios que variaram de um processo de reação sutil para reações graves, com a ocorrência maciça de infiltrados com células inflamatórias (Figuras 4B e 4C), presença de células gigantes de corpo estranho, neutrófilos, monócitos, macrófagos, e predominantemente, eosinófilos em lesões teciduais do parênquima. Além disso, foram observados ruptura do músculo dos brônquios e extravasamento de células inflamatórias para dentro do lúmen dos brônquios, formando aglomerados de células inflamatórias e muco catarral exsudativo, coincidindo com a presença de helmintos adultos no trato respiratório, resultando em oclusão parcial dos brônquios (Figuras 4D e 4F). Os helmintos adultos foram encontrados no trato respiratório com cutícula preservada, muco, e células inflamatórias dentro dos seus aparelhos digestórios, sugerindo que os helmintos ingeriram células inflamatórias (Figuras 4D, 4E e 4F). Na luz dos bronquíolos, a primeira fase larvar (L_1) foi associada com exsudato catarral esverdeado e com hiperplasia das glândulas brônquicas (Figura 4F).

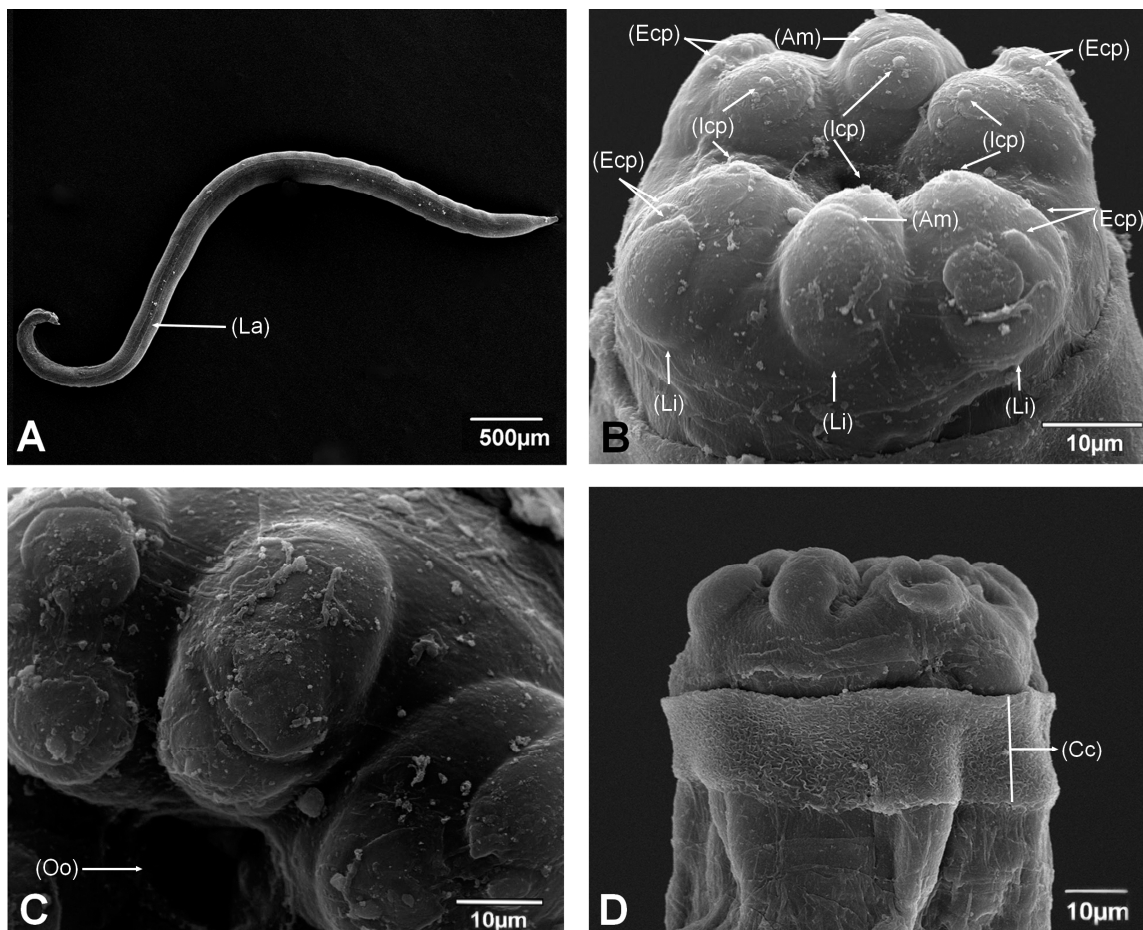


Figura 1: Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Corpo da fêmea apresentando a Linha lateral (La). (B) Extremidade anterior do macho apresentando seis lábios desenvolvidos (Li), quatro pares de papilas cefálicas externas (Ecp), seis papilas internas (Icp), e dois anófeos (Am). (C) Detalhe da abertura oral (Oo). (D) Parte anterior do Macho, vista lateral, mostrando colar cefálico (Cc).

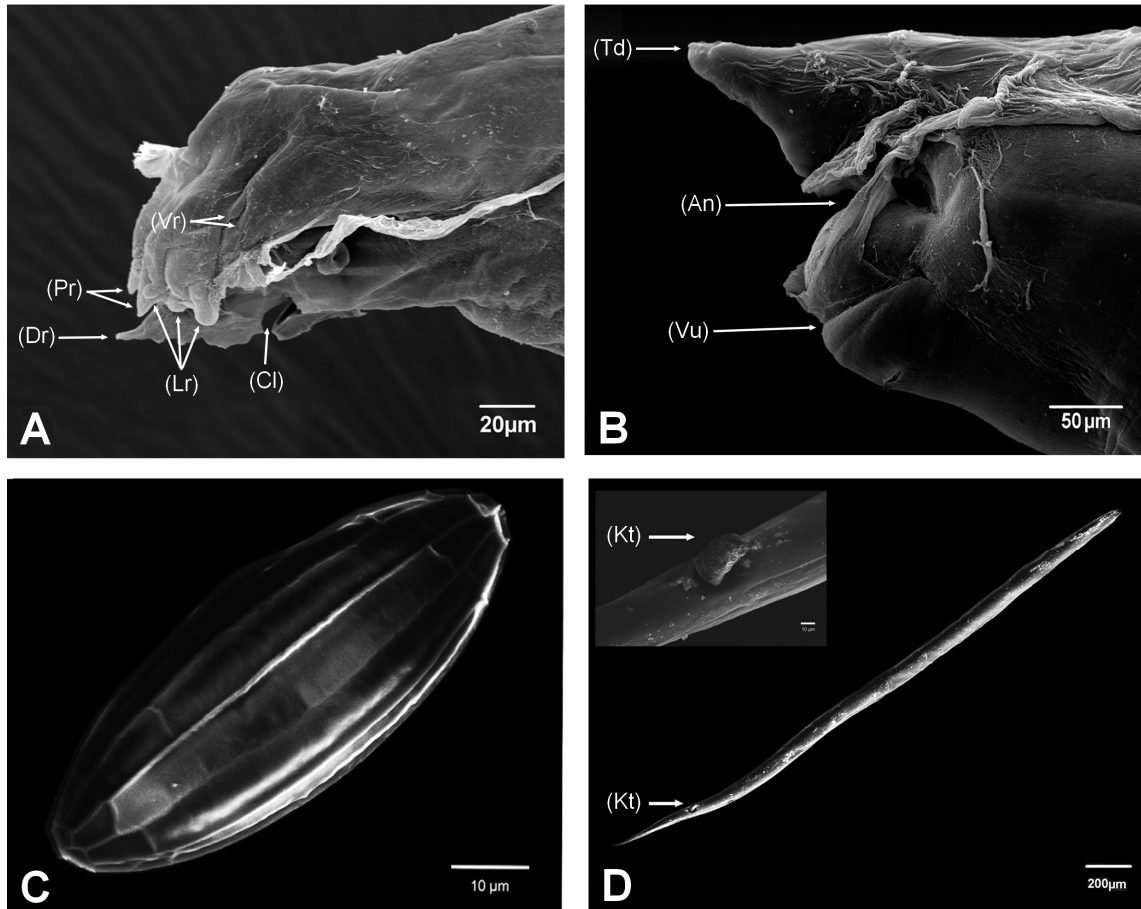


Figura 2: Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) extremidade posterior do macho que mostra bolsa copulatória com raios ventral (Vr), raios laterais (Lr), raios posterodorsal (Pr), raio dorsal (Dr), e cloaca (Cl). (B) Extremidade posterior da fêmea mostrando a vulva (Vu), ânus (An), e cauda digitiforme (Td). (C) Ovos em forma elíptica, mostrando estrias longitudinais. (D) larvas L₃ em detalhe, mostrando uma protuberância em forma de botão (Kt) na ponta ventral na extremidade posterior.

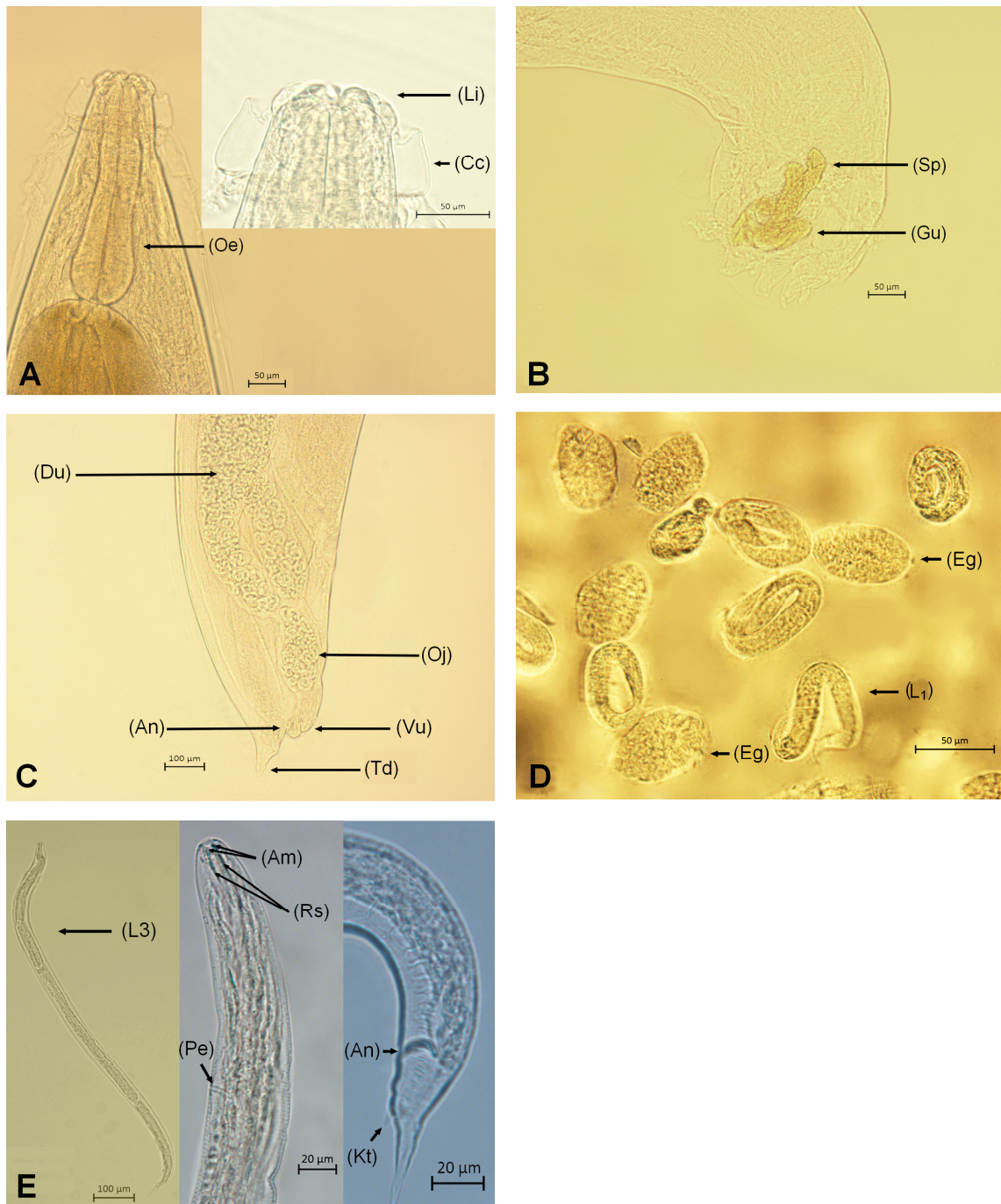


Figura 3: Microscopia de luz de *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Extremidade anterior do macho que mostra o esôfago (Oe), e em detalhe, os lábios (Li) e colar cefálico (Cc). (B) Extremidade posterior do macho, vista lateral, mostrando gubernaculum (Gu) e espículo (Sp). (C) Parte posterior da fêmea mostrando útero didelfo (Du), ovejeter (Oj), vulva (Vu), ânus (An) e cauda digitiforme (Td). (D) Ovos (Eg) e primeira fase larval (L₁). (E) Extremidade anterior das larvas L3 mostrando poro excretor (Pe), anáfideos (Am) apresentando uma estrutura em formato de haste (Rs), e no final da extremidade posterior apresenta um ânus (An) e ponta em formato de botão (Kt).

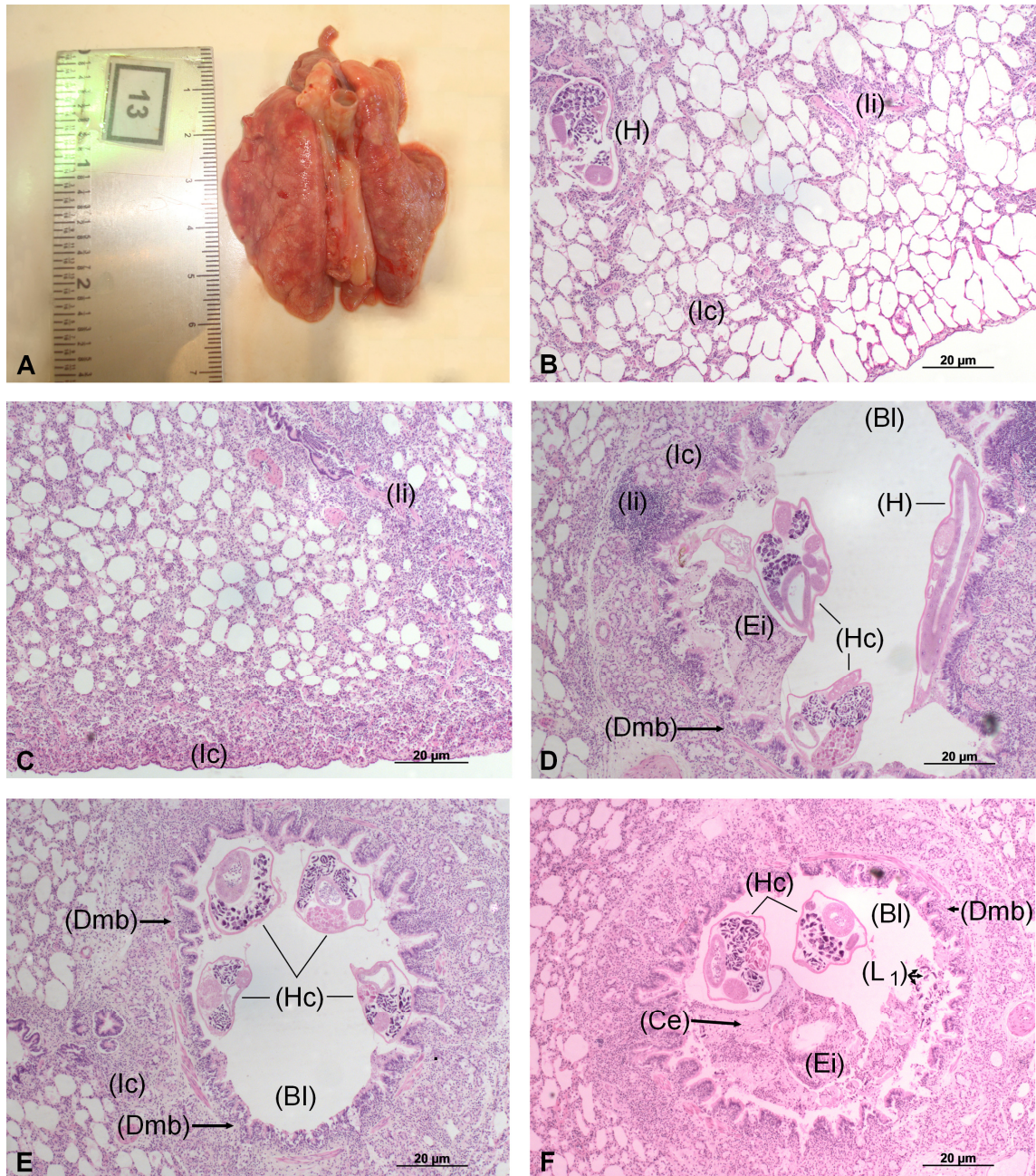


Figura 4: Histopatologia do lóbulo pulmonar de *Didelphis aurita* naturalmente infectadas com *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Aspecto macroscópico do pulmão com numerosas áreas aderidas, regiões multifocais e irregularidades na superfície do órgão. (B) Parênquima pulmonar mostrando processo de reação sutil com células inflamatórias (Ic), infiltrados inflamatórios (Ii) e presença de helmintos (H). (C) Respostas graves com ocorrência maciça de células de infiltrados inflamatórios. (D) Ruptura do músculo liso dos brônquios (Dmb) com extravasamento de células inflamatórias para saída do brônquio do (Bl), presença de helmintos adultos com muco e células inflamatórias dentro de seus aparelhos digestivos (Hc). (E) Helmintos dentro do lúmen do brônquio. (F) Primeiro estágio larvar (L₁) associado com exsudato catarral esverdeado (Ce) e com hiperplasia das glândulas brônquicas no lúmen dos bronquíolos.

3.3 As análises moleculares e filogenéticas

Obtivemos seis sequências de consenso do gene 18S de adultos de *H. heterostrongylus* recuperados de diferentes espécimes de *D. aurita*. Após o alinhamento e corte das extremidades mal alinhadas, todas as seis sequências de 18S de *H. heterostrongylus* foram sequências idênticas de 1.624 pares de bases, o que representa um único haplótipo. Portanto, utilizou-se uma única sequência *H. heterostrongylus* 18S.

A matriz alinhada era composta por 13 táxons e 1.625 caracteres, incluindo indels. 1.511 caracteres foram constantes, 38 caracteres variáveis foram variáveis parcimônio-uninformativos, e 76 foram parcimônio-informativos. As lacunas foram tratadas como "quinta base" no MP.

O modelo de melhor ajuste escolhido pela BIC no programa Treefinder, para nossa matriz de gene 18S foi o modelo de substituição de nucleotídeos HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) com parâmetros de taxa e frequência otimizadas, um discreto modelo de heterogeneidade Gamma com formato α otimizado e cinco categorias de taxa.

As topologias das árvores produzidas com diferentes critérios de otimização foram idênticas, porém com suportes de nós diferentes. A árvore filogenética para a inferência Bayesiana é apresentada na Figura 5. As EEEs para todos os parâmetros das análises Bayesianas foram acima de 100 amostras efetivamente independentes e para a maioria dos parâmetros. As EEEs foram muito acima de 200. Portanto, as amostras foram consideradas suficientes.

As distâncias interespecíficas dentro de *Angiostrongylus* variaram de 0,5% entre *A. cantonensis* e *A. malaysiensis* para 1,3% entre *A. malaysiensis* e *A. dujardini*. As distâncias intergenéricas dentro de Angiostrongylidae variaram de 2% entre *Didelphostrongylus* e *Heterostrongylus*, 4,4% entre *Aelurostrongylus* e *Heterostrongylus*, para 5,5% entre *Aelurostrongylus* e *Didelphostrongylus*. As distâncias entre *Heterostrongylus* e sequências de espécies *Angiostrongylus* variaram de 2,5% a 3%.

As sequências dos genes 18S de *Angiostrongylus*, *Didelphostrongylus* e *Heterostrongylus* formaram um grupo monofilético bem embasado (MP-BP = 90%, LR-ELW = 86%, ML-BP = 88%, BPP = 100%), irmão de *Aelurostrongylus*

abstrusus, que foi basal principalmente para outros angiostrongilídeos em todas as topologias.

As sequências de espécies de *Angiostrongylus* formaram um grupo monofilético em todas as topologias, embora fracamente suportado (MP-BP 61%, LR-ELW = 66%, ML-BP = 71%, BPP = 88%). *Heterostrongylus heterostrongylus* é grupo irmão de *D. hayesi* com forte apoio em todas as topologias (MP-BP = 100%, LR-ELW = 100%, ML-BP = 100%, BPP = 100%).

As sequências de *H. heterostrongylus* foram monofiléticas, e os valores de distância intra-específicos em 18S variaram de 1,7% entre *H. heterostrongylus* e *D. hayesi*, para 3,7% entre *H. heterostrongylus* e *Aelurostrongylus abstrusus*.

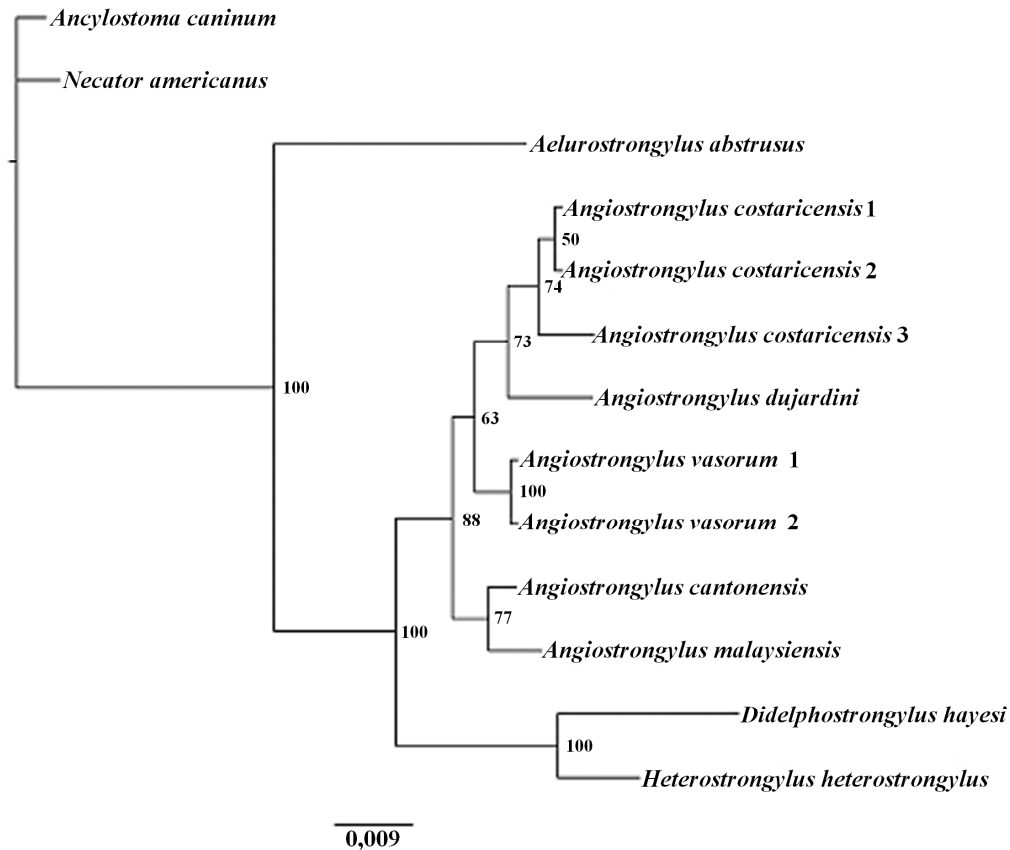


Figura 5: Árvore Bayesiana usando o gene ribossomal 18S nucleotídeos. Os valores de probabilidades posteriores da Bayesiana são representados nos nós.

4 DISCUSSÃO

Em 1949, Dougherty dividiu a família Metastrongylidae em quatro subfamílias: Metastrongylinae, Filaroidinae, Pseudaliinae e Protostrongylinae, colocando as espécies de *Metastrongylus* e a monoespecífica *Heterostrongylus* na nova subfamília Metastrongylinae devido à semelhança na estrutura labial bem desenvolvida. Além disso, Skrjabin *et al.* (1952) criou a subfamília Heterostrongylinae para *Heterostrongylus* dentro da família Metastrongylidae. Mais tarde, Anderson *et al.* (1978) transferiu *H. heterostrongylus* para a família Angiostrongylidae, notando afinidades entre este gênero e *D. hayesi*. Depois, Anderson *et al.* (1980) redescreveu *H. heterostrongylus* e comparou-o em microscopia de luz com *D. hayesi*, distinguindo estas espécies por diferenças na posição dos raios: *H. heterostrongylus* tem raios robustos na bolsa copulatória, raios laterais independentes uns dos outros, e raios dorsais não bifurcados, enquanto que *D. hayesi* tem raios dorsais bífidos, raios mais delicados como dedos, raios ventrais e laterais decorrentes de ramo comum, e uma cauda curta e arredondada nas fêmeas. Por outro lado, Anderson *et al.* (1980) também observaram em ambas espécies seis lábios bem desenvolvidos e concluíram que estas estruturas são equivalentes para as seis estruturas alongadas “perityls” encontradas em diversos helmintos pulmonares. Assim, *H. heterostrongylus* e *D. hayesi* foram transferidas à família Angiostrongylidae (Anderson *et al.*, 2009).

As características morfológicas observadas no presente estudo confirmam a semelhança das estruturas cefálicas de *H. heterostrongylus*, com lábios trilobados bem desenvolvidos como descrito para *Metastrongylus* da família Metastrongylidae. Por outro lado, outros caracteres morfológicos observados em *H. heterostrongylus*, tais como os padrões de raios da bolsa copulatória, a forma dos espículos, e a posição da abertura posterior anal perto da vulva nas fêmeas, colocam *H. heterostrongylus* dentro da família Angiostrongylidae.

O primeiro e o terceiro estágios larvares de *H. heterostrongylus* foram morfológicamente semelhantes às larvas de *D. hayesi*, *Angiostrongylus* spp., *Aelurostrongylus abstrusus*, *Troglostrongylus brevior*, e *T. subcrenatus* (Brianti

et al., 2012), tendo estruturas em forma de haste e uma estrutura em formato de botão, comuns em Metastrongyloidea. No entanto, larvas L₃ de *H. heterostrongylus* tinham uma protuberância ventral observada apenas em *Aelurostrongylus abstrusus*, um parasito de gatos, também colocada dentro de Angiostrongylidae (Brianti *et al.*, 2012). Em contraste, era distinta de todos os outros angiostrongilídeos por ter maior comprimento do corpo.

Este helminto de pulmão provoca pneumonia verminótica e bronquiolite com muco e hipertrofia do músculo liso brônquico. Assim, as lesões microscópicas produzidas por *H. heterostrongylus* foram semelhantes às relatadas por *D. hayesi* (Prestwood *et al.*, 1977; Duncan *et al.*, 1989; Lamberski *et al.*, 2002). No entanto, as lesões pulmonares atribuíveis a *H. heterostrongylus* foram distinguidas pela ruptura de músculos lisos brônquicos e pela sua ausência na subpleura.

No presente estudo, também foram realizadas as primeiras análises de dados moleculares de *H. heterostrongylus*, aumentando-se a base de dados para a identificação molecular deste helminto. As maiores distâncias genéticas corrigidas para ML foram entre *D. hayesi* e as sequências do grupo externo. Estas distâncias foram 6,4% - 6,7% maiores do que a segunda maior distância (de 5,5% entre *A. abstrusus* e *D. hayesi*), e maior do que as distâncias entre *H. heterostrongylus* e as sequências do grupo externo (4,9%). Isto indica que, embora *D. hayesi* fosse grupo irmão de *H. heterostrongylus*, o primeiro tem sido, aparentemente, submetido a taxas evolutivas mais elevadas do que qualquer outro angiostrongilídeo em nossa amostra.

A distância intergenérica entre *Didelphostrongylus* e *Heterostrongylus* foi 2,0% maior do que as maiores distâncias interespecíficas dentro de *Angiostrongylus* (0,5-1,3%), enquanto que a menor distância entre sequências de espécies de *Heterostrongylus* e *Angiostrongylus* foi de 2,5%. Isso corrobora a atribuição de *Heterostrongylus* e *Didelphostrongylus* a gêneros diferentes, ao mesmo tempo demonstrando que eles estão intimamente relacionados. As análises filogenéticas do gene 18S concordaram com estes resultados, recuperando *Heterostrongylus* e *Didelphostrongylus* a um grupo monofilético fortemente embasado.

Apesar de termos estabelecido que *Aelurostrongylus*, *Angiostrongylus*, *Didelphostrongylus* e *Heterostrongylus* formam um grupo monofilético em

nossas análises filogenéticas, Eamsobhana *et al.* (2014) detectou polifilia para a família Angiostrongylidae em um estudo para se determinar as relações filogenéticas das espécies de *Angiostrongylus* e outros Metastrongyloidea usando sequências do gene 18S. Além disso, *Angiostrongylus* é monofilético e foi fracamente embasado em nossas análises, sugerindo que este gênero pode ser polifilético também. Estudos adicionais com mais gêneros e marcadores genéticos para Metastrongyloidea seriam necessários, a fim de se elucidar estas perguntas sobre estes grupos.

O presente estudo detalhou algumas características morfológicas de *H. heterostrongylus* utilizando-se MEV e microscopia de luz, e contribuindo com novos detalhes da extremidade anterior dos adultos, das primeira e terceira fases larvares, e dos ovos. Além disso, as alterações patológicas associadas com a infecção natural do helminto de pulmão *H. heterostrongylus* no gambá *D. aurita* foram descritos, sugerindo a gravidade da doença. Nossos novos dados de DNA confirmaram afinidades de *H. heterostrongylus* com *D. hayesi*, podendo ser útil em estudos futuros. Além disso, o ciclo de vida natural deste parasito é desconhecido e o risco de transmissão para os animais domésticos e silvestres deve ser considerado, uma vez que *D. aurita* é comumente relatado habitando a interface entre ambientes silvestres e áreas peri-urbanas, devido a atividades antrópicas, e à natureza bastante generalista deste gambá.

6 **CAPÍTULO 3**

Estrutura das comunidades de helmintos do gambá *Didelphis aurita* em três ambientes: periurbano, silvestre e rural, no Estado do Rio de Janeiro

1 INTRODUÇÃO

A substituição dos habitats naturais por áreas cultivadas, áreas de pasto para criação de animais de produção e para ocupação humana afeta diretamente a biodiversidade e, conseqüentemente, resulta em mudanças na composição, abundância e na estrutura das comunidades das espécies de animais e vegetais. A redução ou perda da biodiversidade provoca diversos efeitos em cascata na regulação das populações naturais e nos processos ecológicos, podendo levar a um aumento do risco de transmissão ou emergência de doenças infecciosas e parasitárias em humanos (Mills, 2006; Begon, 2008; Allan *et al.*, 2009; Ostfeld, 2009; Johnson & Thieltges, 2010). Quando as espécies favorecidas pelo processo de antropização dos ambientes forem as mais competentes para a transmissão de um dado patógeno, poderá haver uma facilitação e maior eficiência da transmissão deste patógeno, aumentando as taxas de prevalência entre as espécies de reservatórios e, por consequência, o risco de transmissão a seres humanos (Xavier *et al.*, 2014). Desta forma, as questões referentes às alterações nos ambientes e à diversidade de espécies naturais estão diretamente relacionadas ao risco de infecção de doenças parasitárias nas populações humanas.

Mais da metade das espécies conhecidas no mundo compreende indivíduos parasitos (Begon *et al.*, 2007; Wood & Jonhson, 2015). O parasitismo é uma relação biológica frequente e nenhuma espécie está livre de parasitos (Price, 1980). O parasitismo, assim como a fragmentação de habitats, pode alterar os padrões populacionais das espécies, a estrutura das comunidades, as relações biológicas (ex. competição e predação) e o padrão de evolução dos organismos (ex. especiação e extinção). Por sua vez, o processo de antropização de habitats naturais altera as taxas de dispersão das espécies (Smith & Hellmann, 2002), podendo facilitar a dispersão ou a manutenção de focos naturais de parasitos e aumentar o contato destes em áreas de interface de ambientes urbano e silvestre.

A compreensão da dinâmica de transmissão dos ciclos de parasitos torna-se de fundamental importância para subsidiar a solução dos problemas epidemiológicos, de saúde pública e de saúde animal dentro do antigo conceito

de “um mundo, uma saúde” (“one world, one health”), resgatado nas últimas décadas pela Organização Mundial da Saúde (Cardiff *et al.*, 2008; Osburn *et al.*, 2009). De acordo com esta visão, a saúde deve ser vista de maneira integrada para prevenir ou controlar as doenças, através de abordagens multidisciplinares envolvendo estudos da biodiversidade e relação das espécies com a saúde e o ambiente (Gentile & D’Andrea, 2016). Dentro desse contexto, a importância do parasitismo nos estudos relacionados à biodiversidade foi negligenciada durante muito tempo, sendo que somente nas últimas décadas estes passaram a ser considerados e sua importância na evolução dos organismos hospedeiros e na estrutura dos ecossistemas começou a ser compreendida (Thomas *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2016). Além disso, os estudos de comunidades biológicas conduzidos ao longo das últimas décadas mostram uma menor atenção para as espécies de parasitos em relação aos organismos de vida livre (Bellocq *et al.*, 2003; Krasnov *et al.*, 2006; Krasnov *et al.*, 2010a; Krasnov *et al.*, 2011).

As comunidades parasitárias, que apresentam bastante variação na composição de espécies e riqueza de espécies (Dogiel, 1964; Pence, 1990; Jiménez *et al.*, 2002; Poulin, 2003; González *et al.*, 2006; Poulin & Dick, 2007), podem ser estudadas em três níveis de organização: infracomunidades, comunidade componente e fauna de parasitos (Poulin & Dick, 2007) (ver introdução). Uma das formas de se compreender as respostas dos organismos às alterações ecológicas em diferentes escalas espaciais é através da abordagem de metacomunidades (Winegardner *et al.*, 2012). Estas podem ser definidas como um conjunto de comunidades locais ligadas pela dispersão de múltiplas espécies que potencialmente podem interagir (Gilpin & Hanski, 1991; Leibold *et al.*, 2004). Esta é uma abordagem recente, mas bastante promissora para estudos de comunidades de parasitos (Richgels *et al.*, 2013) ou de doenças zoonóticas (Suzán *et al.*, 2015), por exemplo, devido à natureza fragmentada das populações destes organismos, onde cada indivíduo hospedeiro engloba uma infracomunidade. Esta estrutura permite a dispersão das espécies, principalmente no caso de hospedeiros que apresentam grandes deslocamentos, como o gambá, podendo formar gradientes ambientais, populações isoladas de parasitos ou populações contínuas. Desta forma, a

estrutura do conjunto das comunidades componentes de uma dada região pode ser compreendida através da abordagem de metacomunidade.

O estabelecimento de cada parasito em seu hospedeiro pode ser atribuído a heterogeneidade entre os hospedeiros individuais em termos de exposição aos parasitos (Combes, 1991; Poulin *et al.*, 2013). Além disso, os fatores extrínsecos, como por exemplo, temperatura e umidade, podem determinar a distribuição destes parasitos, influenciando também na sobrevivência de algumas fases de vida dos parasitos, especialmente as espécies cujos ovos permanecem no solo (Jiménez *et al.*, 2011, Simões *et al.*, 2016). Deste modo, os estudos locais podem apresentar diferenças entre si nos parâmetros que são analisados e nos processos ecológicos que atuam localmente, e estudos em maiores escalas de espaço ou realizados em um conjunto de comunidades ecológicas em diferentes locais podem permitir a compreensão de padrões ecológicos gerais, como por exemplo a estrutura de uma metacomunidade (Leibold *et al.*, 2004).

No Brasil, a maioria dos estudos realizados sobre helmintos de *Didelphis aurita*, são de descrição taxonômica e registro de ocorrência (Gomes *et al.*, 2003; Chagas-Moutinho *et al.*, 2014). Existem poucos estudos que descrevem a estrutura da comunidade helmíntica do gênero *Didelphis* (Antunes, 2005; Jiménez *et al.*, 2011). Além disso, não há estudos sobre os fatores que determinam a estrutura das comunidades de helmintos em *Didelphis aurita*.

O objetivo deste capítulo foi analisar a composição e estrutura das comunidades de helmintos de *Didelphis aurita*, nas escalas de infracomunidade e comunidade componente, em três ambientes com diferentes características de alteração antrópica (periurbana, rural e silvestre), assim como investigar os fatores relacionados aos parâmetros parasitológicos de cada espécie de helminto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise estatística da estrutura das comunidades parasitárias

3.1.1 Análise dos dados

Os parâmetros parasitológicos foram calculados para cada espécie de nematoide de acordo com Combes (2001). A abundância média foi considerada como o número total de nematoides de uma espécie dividido pelo número de hospedeiros analisados. A intensidade média foi calculada como o número total de nematoides de uma espécie dividido pelo número de animais infectados pela espécie. A prevalência foi considerada como sendo a razão entre o número de animais infectados e o número total de animais analisados. A agregação parasitária foi calculada a partir da razão entre a variância e a média de cada espécie de helminto. A riqueza de espécies foi calculada para cada Município considerando-se a média entre as infracomunidades de cada área.

As abundâncias, intensidades e prevalências foram comparadas em relação ao ambiente onde o hospedeiro foi capturado (Periurbano no Município do Rio de Janeiro, Rural no Município de Sumidouro e Silvestre no Município de Petrópolis), gênero do hospedeiro (macho e fêmea) e estação do ano (seca ou chuvosa) para cada espécie de nematoide. As intensidades e abundâncias foram comparadas utilizando-se modelos lineares generalizados (GLM) somente para as espécies mais abundantes, onde os melhores modelos foram escolhidos pelo critério de informação Akaike corrigido (AICc), considerando-se como modelos plausíveis os que tiveram o valor de Delta (Δ) AICc ≤ 2 . Somente foram considerados os modelos cujos efeitos mostraram-se significativos. As taxas de prevalência foram comparadas pelo teste de qui-quadrado de contingência.

O sinergismo ou segregação entre espécies de helmintos foi investigado através de correlação de Spearman somente para as espécies mais abundantes e com similaridades em relação ao ciclo biológico e sítio de infecção no hospedeiro, partindo-se de uma hipótese a priori de que são

esperadas interações interespecíficas entre espécies de nichos similares, ou elas podem responder de forma semelhante aos fatores ambientais.

A estrutura da comunidade foi caracterizada de acordo com Thul *et al.* (1985), com base em um índice de importância para classificar cada espécie de helminto a partir do número de hospedeiros infectados e número de indivíduos de cada espécie de parasito para cada ambiente. Se o índice é maior que 1 ($I \geq 1$), a espécie é considerada como dominante; $0,01 \leq I \leq 1$ considerada co-dominante; $0 < I < 0,01$ considerada subordinada e $I=0$ considerada pioneira sem sucesso.

A estrutura da metacomunidade de helmintos foi investigada em dois níveis: infracomunidade, considerando-se cada hospedeiro infectado como um sítio tanto para o total quanto para as infracomunidades de cada município separadamente, e comunidade componente, considerando-se cada ambiente como um subconjunto de hospedeiros para o total de localidades. Foram avaliados três elementos da estrutura de uma metacomunidade, segundo Leibold & Mikkelsen, 2002; Presley *et al.*, 2010: coerência, substituição de espécies (“turnover”) e limite de distribuição de espécies. A coerência é uma medida que testa se as espécies respondem a um mesmo gradiente ambiental, ou seja, o grau pelo qual um padrão pode ser agrupado em uma única dimensão, sendo quantificada pelo número de interrupções na ocorrência de uma espécie (ausências embutidas) numa matriz de incidência; a substituição de espécies representa o número de substituições de espécies nesta dimensão; e o limite de distribuição representa como o limite de ocorrência de cada espécie está distribuído entre os sítios ao longo do gradiente ambiental (Leibold & Mikkelsen, 2002). Quando a coerência é significativa e positiva (número de ausências embutidas é maior que o da matriz gerada ao acaso), os outros parâmetros também são analisados. Quando a coerência não é significativa, ou seja, $p > 0,05$, a distribuição das espécies no gradiente ambiental é aleatória. Quando a coerência é negativa (número de ausências embutidas é menor que o da matriz gerada ao acaso), indica uma distribuição em tabuleiro de damas (“checkboard”), indicando exclusão competitiva entre as espécies (Tabela 1) (Leibold & Mikkelsen, 2002).

Tabela 1: Resumo das estruturas idealizadas de metacomunidade e seus respectivos resultados de análises de coerência, substituição de espécies e limite de distribuição.

Padrão	Definição	Coerência	Substituição	Distribuição
Aleatório	Distribuição das espécies não segue um gradiente ou outro padrão definido	NS	+, -, NS	+, -, NS
Tabuleiro de damas	Pares de espécie tem distribuições mutuamente excludentes	-	+, -, NS	+, -, NS
Aninhado	Distribuição das espécies tem um padrão aninhado onde os sítios formam subconjuntos do total de espécies	+	- NS (quase-aninhado)	+, -, NS
Uniforme	Distribuição das espécies é uniforme ao longo do gradiente	+	+ NS (quase-uniforme)	-
Gleasoniano	Distribuição de espécies segue um gradiente, porém de forma independente para cada espécie	+	+ NS (quase-gleasoniano)	NS
Clementsiano	Distribuição de espécies forma grupos que se substituem ao longo do gradiente	+	+ NS (quase-clementsiano)	+

A diversidade de espécies foi comparada entre as localidades (CFMA, Pau-da-Fome, Uricanal, Bonfim, Águas do Imperador, Pamparrão e Porteira Verde, ver tabela 1 da seção Área de Estudo) através da análise de Escalonamento Multidimensional não-Métrico (nMDS). Nesta análise foram utilizados os dados de presença / ausência de espécies e a medida de distância de Jaccard.

Os testes de qui-quadrado foram realizados usando a versão 3:09 do software PAST (Hammer *et al.*, 2001) e a análise de GLM com o software PASW STAT versão 18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). A análise de estrutura da metacomunidade foi realizada através do programa MATLAB R2017b (MathWorks, 2017) e a nMDS com o pacote *stats* (R Core Team, 2017) no software RStudio versão 1.0.136. O nível de significância utilizado foi de 5% em todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos parâmetros parasitológicos

Foram capturados 73 espécimes de *Didelphis aurita* durante todo o estudo, 18 fêmeas e 55 machos, 48 no ambiente periurbano, 13 no silvestre e 12 no rural. A helmintofauna foi composta por espécies pertencentes aos três filos, sendo nove espécies do filo Nematoda, quatro do filo Platyhelminthes (três espécies de Trematoda e uma de Cestoda) e uma do filo Acanthocephala (ver capítulo 1) (Tabela 2). Oito espécies ocorreram no intestino delgado, quatro no intestino grosso, uma no estômago e uma no pulmão (capítulo 1). Hospedeiros capturados no ambiente periurbano apresentaram maior riqueza de parasitos ($s=5,32$; total = 13 espécies), seguido pelo ambiente silvestre ($s=3,92$; total = 12 espécies) e ambiente rural ($s=2,08$; total = 5 espécies).

Nenhum hospedeiro estava infectado com todas as espécies de helmintos, apenas 4,1% não estavam infectados, e 95,9 % estavam infectados com os sete helmintos analisados. Foram recuperados um total de 145 helmintos adultos de *Heterostrongylus heterostrongylus*, 615 de *Turgida turgida*, 3660 de *Cruzia tentaculata*, 1268 de *Aspidodera raillieti*, 5679 de *Viannaia hamata*, 1065 de *Travassostrongylus orloffii* e 112 *Oligacanthorhynchus microcephalus*, sendo *V. hamata* e *C. tentaculata* as espécies mais abundantes do estudo. As espécies que apresentaram maiores prevalências foram *C. tentaculata* e *T. turgida* (Tabela 2)

Todas as espécies apresentaram altos índices de agregação total considerando-se cada ambiente estudado (Tabela 3). Os nematoides *T. turgida*, *C. tentaculata* e *A. raillieti* foram dominantes nos três ambientes quando comparados com os outros helmintos que foram co-dominantes ou subordinados (Tabela 4). *Heterostrongylus heterostrongylus* só foi dominante no ambiente silvestre, *V. hamata* foi dominante nos ambientes silvestre e periurbano, *T. orloffii* apenas no periurbano, *O. microcephalus* apenas no rural e *R. coronatus* apenas no silvestre (Tabela 4).

Em *H. heterostrongylus* foram observadas diferenças significativas somente na prevalência entre ambientes. Esta foi maior no ambiente silvestre em relação aos demais (Tabela 5).

Turgida turgida apresentou diferença marginalmente significativa nas prevalências entre os ambientes. Esta foi maior no ambiente periurbano (Tabela 5).

Cruzia tentaculata apresentou os segundos maiores valores de intensidade e abundância, considerando todas as espécies coletadas. Foram observados valores significativamente maiores de abundância desta espécie no ambiente periurbano (Tabelas 2 e 6). A prevalência apresentou diferença marginalmente significativa em relação ao ambiente, sendo maiores no periurbano e silvestre (Tabela 5).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas abundâncias de *T. orloffii* entre machos e fêmeas do hospedeiro, entre ambientes e estações do ano, sendo maiores para machos, no ambiente periurbano e na estação seca (Tabelas 2 e 6). Diferenças significativas também foram observadas na prevalência entre o sexo do hospedeiro, sendo maior para machos, e entre ambientes, sendo maior para o periurbano (Tabela 5).

Para *A. raillieti*, *O. microcephalus* e *V. amata* não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação aos parâmetros analisados (Tabelas 2 e 5). Nenhuma espécie apresentou diferença significativa nas intensidades em relação as variáveis analisadas, uma vez que nenhum modelo com variável foi significativo.

A razão sexual de *T. turgida*, *H. heterostrongylus*, *O. microcephalus* não diferiu de 1: 1. *Cruzia tentaculata*, *A. raillieti*, *V. hamata* e *T. orloffii* apresentaram significativamente mais fêmeas do que os machos ($\chi^2 = 51,39$ e $p = 0,0$; $\chi^2 = 21,35$ e $p = 0,0$, respectivamente).

Foi investigada correlação entre os helmintos de ciclo direto *C. tentaculata* e *A. raillieti*, coletados no intestino grosso, e *V. hamata* e *T. orloffii*, coletados no intestino delgado. Apenas *T. orloffii* e *V. hamata*, mostraram co-ocorrência no hospedeiro ($r_s=0,50$, $p=0$, $N=47$).

Em relação a análise da diversidade, com exceção da localidade rural da Porteira Verde do Município de Sumidouro, localidades com maior impacto antrópico foram agrupadas no centro da nMDS, enquanto aquelas distribuídas nas margens do gráfico representaram ambientes com menor nível de perturbação, tais como Águas do Imperador e Uricanal no PARNASO (Figura 1).

A abordagem de elementos de estrutura da metacomunidade indicou uma estruturação em função do gradiente ambiental (coerência com $p<0,05$) somente quando todas as localidades foram incluídas na análise (Tabela 8 -

total). Considerando-se todas as localidades juntas, a análise para infracomunidades mostrou-se quase-aninhada com perda de espécies ao acaso (substituição de espécies e limite de distribuição não significativos) e para comunidade componente, aninhada com perda de espécies ao acaso (substituição de espécies negativa – SUB<MR, com $p < 0,0001$ e limite de distribuição não significativo) (Tabela 7). Para ambos os níveis, nota-se que sítios pobres em espécies formam subconjuntos de sítios mais ricos (Figuras 2A e 2B).

Considerando-se cada município separadamente, a estrutura das metacomunidades considerando-se as infracomunidades mostrou-se aleatória para o Rio de Janeiro e Sumidouro (área urbana e rural) (coerência não significativa) e em tabuleiro de damas para Petrópolis (área silvestre) (coerência significativa negativa) (Tabela 7).

Tabela 2: Abundância e intensidade (\pm DP), prevalência (intervalo de confiança de 95%) em relação ao tipo de ambiente, sexo do hospedeiro e estação para seis espécies de nematoides e uma de acantocéfala (*H. heterostrongylus*, *T. turgida*, *C. tentaculata*, *A. rillieti*, *V. hamata*, *T. orloff* e *O. microcephalus*) recuperadas de *Didelphis aurita* nos Municípios do Rio de Janeiro, Sumidouro e Petrópolis, RJ, Brasil.

Parâmetros\espécies	<i>H. heterostrongylus</i>	<i>T. turgida</i>	<i>C. tentaculata</i>	<i>A. rillieti</i>	<i>V. hamata</i>	<i>T. orloff</i>	<i>O. microcephalus</i>
Intensidade	6,125 \pm 4,96	11,25 \pm 11,89	71,09 \pm 108,38	29,93 \pm 32,17	141,98 \pm 252,38	28,03 \pm 30,25	4,15 \pm 5,17
Macho	4,94 \pm 3,30	9,98 \pm 7,80	82,66 \pm 120,66	31,13 \pm 33,52	146,87 \pm 276, 69	29,52 \pm 32,76	1,60 \pm 5,86
Fêmea	9,67 \pm 11, 41	16,36 \pm 20,52	36,35 \pm 51,38	27,15 \pm 27,89	122,37 \pm 128,91	15,25 \pm 13,44	3,14 \pm 2,27
Periurbano	5,31 \pm 3,21	10,17 \pm 8,26	95 \pm 128,04	33,86 \pm 36,48	144,46 \pm 306, 18	28,62 \pm 35,15	4,66 \pm 6,31
Rural	2 \pm 0	14,87 \pm 24,47	8 \pm 7,08	16,4 \pm 15,60			2,4 \pm 1,77
Silvestre	8,57 \pm 9,74	13,29 \pm 8,43	20,72 \pm 11,73	24,77 \pm 26,42	132 \pm 137,52	6 \pm 0	2 \pm 0
Seca	3,88 \pm 2,10	8,12 \pm 6,04	70,16 \pm 94,97	31,38 \pm 31,45	233,25 \pm 356,41	34,19 \pm 40,55	2,5 \pm 1,74
Chuva	7,25 \pm 6,33	13,87 \pm 14,82	71,78 \pm 118,94	28,88 \pm 33,10	81,12 \pm 94,72	20,41 \pm 14,71	5,93 \pm 7,06
Abundância	2,01 \pm 4,93	8,48 \pm 11,89	54,53 \pm 108,38	17,63 \pm 32,16	77,79 \pm 245,99	14,58 \pm 29,45	1,53 \pm 5,10
Macho	1,58 \pm 2,98	7,83 \pm 7,80	62 \pm 119,86	16,67 \pm 33,52	83,92 \pm 274,40	17,93 \pm 32,35	1,61 \pm 5,72
Fêmea	3,41 \pm 8,72	10,58 \pm 22,10	29,94 \pm 55,29	20,76 \pm 27,89	57,59 \pm 113,54	3,59 \pm 11,83	1,29 \pm 2,14
Periurbano	1,77 \pm 3,19	8,47 \pm 8,25	77,18 \pm 128,04	20,45 \pm 36,48	96,31 \pm 294,33	22,06 \pm 34,09	2,04 \pm 6,19
Rural	0,16 \pm 0,57	9,91 \pm 23,54	4 \pm 6,67	6,83 \pm 13,93			1 \pm 1,59
Silvestre	4,61 \pm 9,74	7,15 \pm 8,35	17,53 \pm 11,73	17,15 \pm 25,81	81,23 \pm 127,78	0,46 \pm 1,66	0,15 \pm 0,55
Seca	0,96 \pm 1,94	6,34 \pm 6,03	52,62 \pm 94,97	17,65 \pm 31,45	116,62 \pm 356,41	22,43 \pm 40,55	1,09 \pm 1,74
Chuva	2,83 \pm 6,27	10,14 \pm 14,82	56,02 \pm 118,94	17,60 \pm 33,10	47,48 \pm 91,24	8,46 \pm 14,12	1,87 \pm 6,64
Prevalência	32,87 (32,84 - 32,91)	75,34 (75,26 - 75,43)	76,71 (75,92 - 77,51)	58,90 (58,66 - 59,14)	54,79 (52,98 - 56,59)	52,05 (51,83 - 52,27)	36,99 (36,94 - 37,02)
Macho	32,14 (32,11 - 32,16)	78,57 (78,50 - 78,63)	75 (73,99 - 76,00)	53,57 (53,29 - 53,85)	57,14 (54,84 - 59,44)	60,71 (60,44 - 60,98)	35,71 (35,66 - 35,76)
Fêmea	35,29 (35,16 - 35,42)	64,70 (64,36 - 65,04)	82,35 (81,51 - 83,19)	76,47 (76,04 - 76,89)	47,05 (45,33 - 48,78)	23,53 (23,34 - 23,70)	41,17 (41,14 - 41,20)
Periurbano	33,33 (33,30 - 33,36)	83,33 (83,25 - 83,40)	81,25 (80,09 - 82,40)	60,41 (60,08 - 60,74)	66,66 (64,00 - 69,33)	77,08 (76,77 - 77,39)	43,75 (43,69 - 43,80)
Rural	8,33 (8,32 - 8,34)	66,66 (66,24 - 67,09)	50 (49,87 - 50,12)	41,66 (41,41 - 41,91)			41,66 (41,66 - 41,69)
Silvestre	53,84 (53,67 - 54,01)	53,84 (53,70 - 53,99)	84,61 (84,41 - 84,81)	69,23 (68,02 - 70,43)	61,53 (59,31 - 63,76)	7,69 (7,66 - 7,72)	7,69 (7,68 - 7,70)
Seca	25 (24,97 - 25,01)	78,12 (78,05 - 78,19)	75 (73,94 - 76,05)	56,25 (55,90 - 56,59)	50 (46,04 - 53,95)	65,62 (65,17 - 66,07)	43,75 (43,73 - 43,76)
Chuva	39,02 (38,96 - 39,08)	73,17 (73,02 - 73,31)	78,05 (76,88 - 79,21)	60,97 (60,65 - 61,29)	58,53 (57,64 - 59,43)	41,46 (41,32 - 41,60)	31,70 (31,64 - 31,77)

Tabela 2: Continuação

	<i>D. proloba</i>	<i>B. advena</i>	<i>T. minuta</i>	<i>G. marsupialis</i>	<i>R. coronatus</i>	Cestoda	<i>T. didelphis</i>
Intensidade		17,83± 16,69	10,16± 8,32	8,75± 3,13	23,25± 13,97	4± 1	2,5± 0,59
Macho	3,23± 13,03	3,62± 16,21	2,17±8,09	0,51± 0,69		0,07± 0,54	0,01± 0,13
Fêmea		11±0		6±1,6	13,28± 20,95		4± 1,06
Periurbano	16,45± 13,94	17,83± 17,36	11± 8,65	9,66± 0,74	2± 0,29		0,14± 0,02
Rural							
Silvestre			1± 0	6± 2	30,33±25,98	4± 0	4±1,33
Seca	18,22± 16,66	18±19,02	9,16± 4,58	1± 0,17			1± 0,17
Chuva	2,66± 0,41	8,99± 1,65	8,99±1,63	1,28± 0,82	13,18± 2,26	0,66±0,09	0,66±0,09
Abundância		2,93± 14,01	1,67± 7,0	0,47± 2,84	1,27± 9,34	0,05± 0,47	0,06± 0,48
Macho	3,23± 12,81	3,62± 15,92	2,17± 7,95	0,51± 3,16		0,07± 0,53	0,01± 0,13
Fêmea		0,64±2,75		0,35±1,5	5,47± 19,63		0,23±1
Periurbano	3,85± 13,80	4,55±17,19	2,57±8,56	0,61±3,41	0,04±0,29		0,02±0,14
Rural							
Silvestre			0,07±0	0,43±1,17	7±22,62	0,30±1,15	0,30±1,15
Seca	5,12± 16,66	4,5± 19,02	1,71± 4,58	0,03±0,17			0,03±0,17
Chuva	2,53± 4,87	8,66± 7,31	8,54± 14,63	3,79± 7,31	12,51± 9,75	0,63± 2,43	0,63± 2,43
Prevalência	15,06 (15,15 - 14,98)	16,43(16,54 - 16,33)	16,43(16,48 - 16,38)	5,47(5,50 - 5,45)	5,47(5,54 - 5,41)	1,36(1,37 - 1,36)	2,73(2,74 - 2,73)
Macho	19,64(19,75 - 19,53)	19,64(19,77 - 19,50)	21,42(21,49 - 21,36)	5,35(5,38 - 5,33)		1,78(1,79 - 1,78)	1,78(1,78 - 1,78)
Fêmea		5,88(5,92 - 5,84)		5,88(5,90 - 5,85)	41,17(41,47 - 40,87)		5,88(5,89 - 5,86)
Periurbano	23,40(24,53 - 23,27)	25,53(25,68 - 25,37)	23,40(23,48 - 23,32)	6,38(6,41 - 6,35)	2,12(2,13 - 2,12)		2,12(2,12 - 2,12)
Rural							
Silvestre				7,69(7,72 - 7,66)	23,07(23,47 - 22,68)	7,69(7,71 - 7,67)	7,69(7,71 - 7,67)
Seca	28,12(28,30 - 27,94)	25(25,21 - 24,78)	18,75(18,80 - 18,69)	3,12(3,12 - 3,12)			3,12(3,12 - 3,12)
Chuva	4,87(4,90 - 4,85)	7,31(7,40 - 7,23)	14,63(14,71 - 14,55)	7,31(7,35 - 7,27)	9,75(9,87 - 9,63)	2,43(2,44 - 2,43)	2,43(2,44 - 2,43)

Tabela 3: Índices de agregação em relação aos três ambientes para todas as espécies de helmintos recuperadas de *Didelphis aurita*, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Espécies	Índice de Agregação		
	Rio de Janeiro - Periurbano	Petropolis - Silvestre	Sumidouro -Rural
<i>H. heterostrongylus</i>	12,25983487	20,56666667	15,21302326
<i>T. turgida</i>	16,76269323	9,758064516	21,34096124
<i>D. prolaba</i>	50,4464244	-	-
<i>B. advena</i>	66,03843622	-	-
<i>T. minuta</i>	28,95359039	-	-
<i>C. tentaculata</i>	214,401293	7,845760234	54,41345787
<i>G. masupialis</i>	16,6305835	6	-
<i>A. raillieti</i>	59,57435465	38,86248132	57,87748505
<i>R. coronatus</i>	67,65879146	67,66666667	-
Cestoda	-	4	-
<i>V. hamata</i>	776,8969219	975,0266849	-
<i>T. orloffii</i>	59,27954771	58,44561699	-
<i>T. didelphis</i>	3,377464789	4	-
<i>O. microcephalus</i>	16,94768612	2	23,41860465

Tabela 4: Índices de Importância para os helmintos recuperados de *Didelphis aurita* nos três ambientes estudados, RJ, Brasil.

	<i>H. heterostrongylus</i>	<i>T. turgida</i>	<i>C. tentaculata</i>	<i>A. rallieti</i>	<i>V. hamata</i>	<i>T. orloffii</i>	<i>O. microcephalus</i>
Rio de Janeiro - Periurbano	0,356472	4,327052	35,42599452	7,496376228	39,7101	10,5178	0,5524239
	Co-dominante	Dominante	Dominante	Dominante	Dominante	Dominante	Co-dominante
Sumidouro - Rural	0,121729	57,94279	14,24223981	24,04139	-	-	3,65185636
	Co-dominante	Dominante	Dominante	Dominante	Sem sucesso	Sem sucesso	Dominante
Petropolis - Silvestre	2,932142	4,54482	17,50908	14,01145	58,97794	0,006981	0,00698129
	Dominante	Dominante	Dominante	Dominante	Dominante	Subordinada	Subordinada
	<i>D. prolobo</i>	<i>B. advena</i>	<i>T. minuta</i>	<i>G. marsupialis</i>	<i>R. coronatus</i>	Cestoda	<i>T. didelphis</i>
Rio de Janeiro - Periurbano	0,534439255	0,689321952	0,357277	0,023353	0,000536855	-	0,000268
	Co-dominante	Co-dominante	Co-dominante	Co-dominante	Subordinada	Sem sucesso	Subordinada
Sumidouro - Rural	-	-	-	-	-	-	-
	Sem sucesso	Sem sucesso	Sem sucesso	Sem sucesso	Sem sucesso	Sem sucesso	Sem sucesso
Petropolis - Silvestre	-	-	0,006981	0,041888	1,905892209	0,027925161	0,027925
	Sem sucesso	Sem sucesso	Subordinada	Co-dominante	Dominante	Co-dominante	Co-dominante

Tabela 5: Valores de Qui-Quadrado e p para comparação das prevalências entre ambientes, sexo dos hospedeiros e estações para as espécies mais abundantes de helmintos de *Didelphis aurita* no estudo.

<i>H. heterostrongylus</i>		
Parâmetros	Qui-Quadrado	P
Prevalência entre Ambientes	5,870	0,05
Prevalência Macho/Fêmea	0,021	0,88
Prevalência entre Estações	1,029	0,31
<i>C. tentaculata</i>		
Parâmetros	Qui-Quadrado	P
Prevalência entre Ambientes	5,800	0,05
Prevalência Macho/Fêmea	0,090	0,76
Prevalência entre Estações	0	0,98
<i>A. raillieti</i>		
Parâmetros	Qui-Quadrado	P
Prevalência entre Ambientes	2,091	0,35
Prevalência Macho/Fêmea	1,958	0,16
Prevalência entre Estações	0,028	0,87
<i>T. turgida</i>		
Parâmetros	Qui-Quadrado	P
Prevalência entre Ambientes	5,369	0,07
Prevalência Macho/Fêmea	0,706	0,40
Prevalência entre Estações	0,045	0,83
<i>V. hamata</i>		
Parâmetros	Qui-Quadrado	P
Prevalência entre Ambientes	0	0,99
Prevalência Macho/Fêmea	0,205	0,65
Prevalência entre Estações	0,240	0,62
<i>T. orloffii</i>		
Parâmetros	Qui-Quadrado	P
Prevalência entre Ambientes	18,12	<0,01
Prevalência Macho/Fêmea	5,811	0,02
Prevalência entre Estações	3,291	0,07

Tabela 6: Valores de AICc e seleção de modelos para o parâmetro de abundância dos helmintos em relação ao tipo de ambiente, sexo do hospedeiro e estação de nematoides (*C. tentaculata* e *T. orloffii*), recuperados de *Didelphis aurita*.

Espécies	Modelos	AICc	Delta	peso	GI	P
<i>C. tentaculata</i>	Ambiente	892,3	0	0,553	4	0,042
	Nulo	894,4	2,18	0,186	2	-
<i>T. orloffii</i>	Estação + Ambiente	697,9	0	0,367	5	0,005
	Ambiente	698,9	1	0,222	4	0,009
	Ambiente + Sexo	699,6	1,76	0,152	5	0,012
	Estação + Ambiente + Sexo	699,7	1,81	0,148	6	0,011
	Estação	702,2	4,32	0,042	3	0,043

Tabela 7: Resultados da análise de estrutura de metacomunidade de helmintos de *Didelphis aurita* em duas escalas (infracomunidades e comunidades componentes) com os valores de coerência, substituição de espécies e limite de distribuição de espécies. AE= Ausências embutidas; P= Significância; MA= Matrizes geradas ao acaso; DP= Desvio padrão; SUB= Substituições de espécies; IM= Índice de Distribuição de Morisita.

Áreas	Escala	Coerência				Substituição de espécies				Limite de distribuição	
		AE	P	MA	Desv Pad	SUB	P	MA	Desv Pad	IM	P
Total	Comunidade componente	12,0	<0,001	29,39	4,91	52	<0,007	181,73	48,65	1,14	0,26
	Infracomunidade	292,0	<0,026	370,34	35,20	2799,0	<0,336	4245,7	1506,6	1,6,1	0,14
RJ	Infracomunidade	185,0	<0,55	197,96	21,76						
Petrópolis	Infracomunidade	50,0	<0,001	27,52	6,55						
Sumidouro	Infracomunidade	2	<0,19	4,80	2,16						

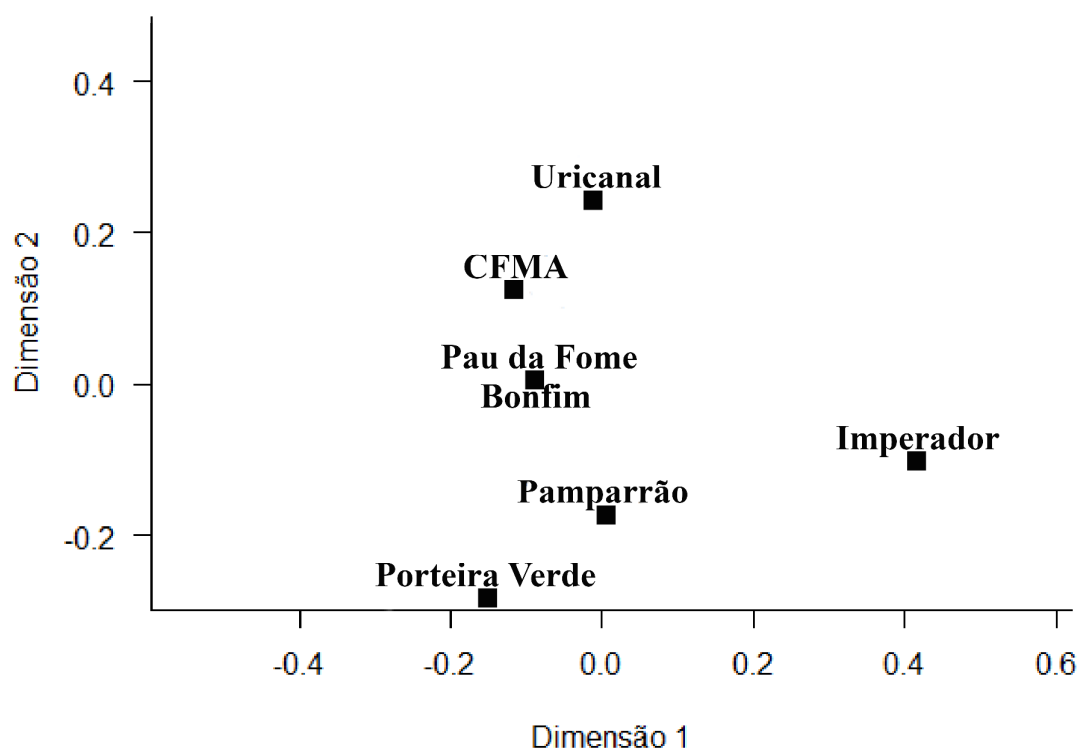


Figura 1. Análise da diversidade de espécies de helmintos do gambá *Didelphis aurita* utilizando-se escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) entre as localidades investigadas.

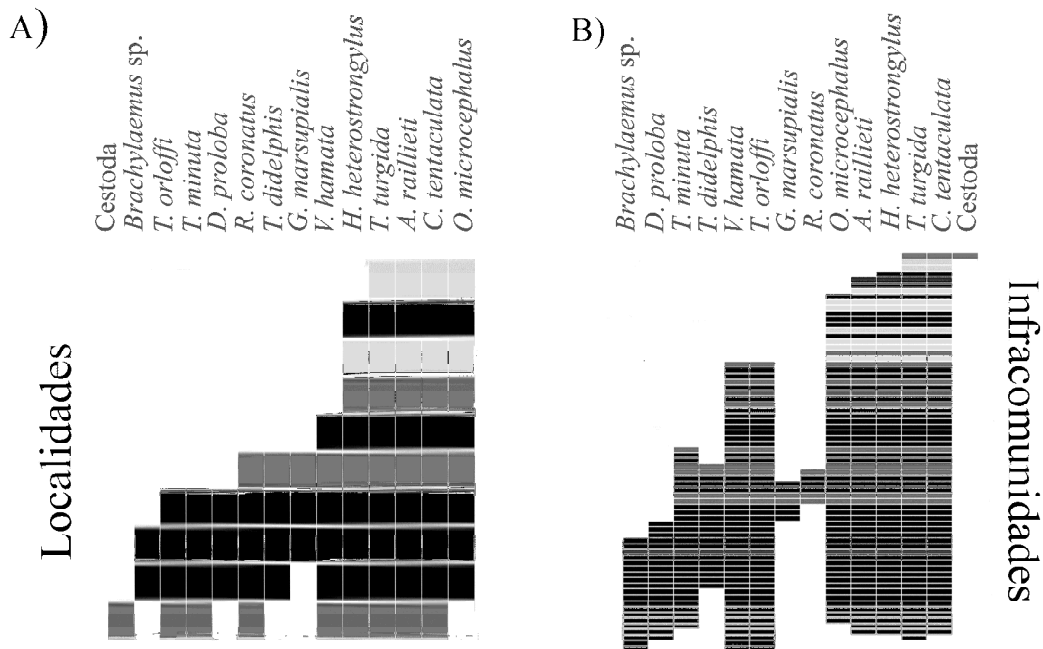


Figura 2. Matrizes ordenadas da análise da metacomunidade de helmintos de *Didelphis aurita* incluindo todas as áreas. A - Escala de Comunidade Componente onde as linhas correspondem aos transectos de todas as localidades e a colunas às espécies; B - Escala de Infracomunidade onde as linhas correspondem aos hospedeiros e as colunas às espécies. ■ Rio de Janeiro-RJ, ■ Petrópolis-RJ e ■ Sumidouro-RJ.

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo sobre estrutura de comunidades de helmintos realizado para o gambá *Didelphis aurita*. Apenas um estudo foi reportado em literatura sobre estrutura de comunidades de helmintos para outras espécies do gênero *Didelphis*, tendo sido realizado na Guiana com uma abordagem de comunidades componentes (Jiménez *et al.*, 2011).

As espécies mais abundantes do presente estudo (*V. hamata*, *C. tentaculata*, *A. raillieti* e *T. orloffii*) já foram comumente encontradas em outros estudos de helmintofauna do gênero *Didelphis*. Antunes (2005) encontrou para a helmintofauna de *D. albiventris* no Rio Grande do Sul a espécie *C. tentaculata* como a mais abundante (185,43) e prevalente (93,3%), seguida de *A. raillieti* com abundância de 68,87 e prevalência de 83,3% e *T. turgida* com abundância de 4,6 e prevalência de 70%. Gomes *et al.* (2003) encontraram como espécies mais abundantes da helmintofauna de *D. aurita* no Estado do Rio de Janeiro, *C. tentaculata* com intensidade média de 75,6 e prevalência de 68%, *A. raillieti* com intensidade média 51,2 e prevalência de 32% e *V. hamata* com intensidade média de 16,2 e prevalência de 16%, além de *T. turgida* com intensidade média de 12,6 e prevalência de 56%. Silva & Costa (1999) encontraram maiores abundâncias e prevalências de helmintos de *D. albiventris* em Belo Horizonte, *C. tentaculata* com prevalência de 91% e intensidade média de 246,1, *A. raillieti* com prevalência de 45% e intensidade média de 34,4, *V. hamata* com prevalência de 27% e intensidade média 14,3, *T. orloffii* com prevalência de 14% e intensidade média de 5,3, *T. turgida* com prevalência de 73% e intensidade média de 21,7, *T. didelphis* com prevalência de 36% e intensidade média de 5,8%, *R. coronatus* com prevalência de 18% e intensidade média de 36. Jiménez *et al.* (2011) encontraram para a helmintofauna de *D. marsupialis* na Guiana Francesa como espécies mais abundantes *A. raillieti* com prevalência de 100% e intensidade média 566,3 e *C. tentaculata* com prevalência de 25% e intensidade média de 4.

O maior valor de prevalência de *H. heterostrongylus* no ambiente silvestre, pode ser relacionado às características mais preservadas deste ambiente. Esta espécie pertence à família Angiostrongylidae, cuja maioria das espécies estudadas apresentam ciclo de vida heteroxeno, sendo os hospedeiros intermediários moluscos gastrópodes (Anderson, 2000). Desta forma, ambientes mais preservados poderiam favorecer a ocorrência de uma maior diversidade de recursos de hospedeiros

intermediários, contribuindo para a transmissão destes parasitos entre os seus hospedeiros.

O ambiente periurbano influenciou a prevalência e abundância de *C. tentaculata*, *T. turgida* e de *T. orloffii*, indicando a presença abundante destas espécies em áreas de interface entre ambientes urbanos e silvestres. Castro *et al.* (2017), com a mesma base de dados do presente estudo para a localidade do CFMA, encontraram maiores intensidade e abundância de *T. turgida* nas áreas de borda de floresta perturbada. Um outro estudo com helmintos de gambá em uma área periurbana também encontrou maiores prevalências e abundâncias em *C. tentaculata* (Antunes, 2005). Este último gênero já foi registrado também em porco doméstico (Vicente *et al.*, 1997), animal já visto nas áreas de estudo, levantando a importância médico-veterinária deste gênero.

A única espécie que apresentou diferenças significativas nas abundâncias e prevalências quanto ao sexo foi *T. orloffii*, sendo os maiores valores em hospedeiros machos. De acordo com Poulin (1996) altos níveis de testosterona podem provocar uma imunossupressão em machos, tornando-os mais suscetíveis a parasitos do que fêmeas. Além disso, há registro de uma maior infecção de nematoides em machos do que em fêmeas de mamíferos (Poulin, 1996). Contudo, Antunes (2005) encontrou maior abundância e prevalência de *T. orloffii* em fêmeas de *D. albiventris*.

As maiores abundância e prevalência de *T. orloffii* observadas em períodos mais secos sugerem que estes períodos possam favorecer o ciclo de vida desta espécie. Sendo *T. orloffii* um tricostrongilídeo de ciclo direto, a época de chuvas poderia carrear os ovos encontrados no solo, diminuindo sua disponibilidade para infectar o hospedeiro.

A maior abundância de fêmeas observada nas espécies *C. tentaculata*, *A. raillieti*, *V. hamata* e *T. orloffii* sugere uma estratégia ecológica na reprodução de nematoides, favorecendo a manutenção do ciclo destes organismos, onde o aumento na produção de ovos pode contribuir para a infecção do hospedeiro (Oliveira-Menezes *et al.*, 2011). Em sistemas de acasalamento poligâmico a razão sexual favorecendo fêmeas pode aumentar a probabilidade de acasalamento (Poulin, 2007).

Todas as espécies de helmintos analisadas apresentaram elevados índices de agregação. Sabe-se que parasitos utilizam apenas uma parte dos hospedeiros individuais em uma população ou comunidade de espécies, exibindo um comportamento agregado onde muitos hospedeiros infectados abrigam poucos

parasitos e poucos hospedeiros abrigam muitos parasitos (Poulin, 1997; Bush, 2001; Poulin, 2007). A heterogeneidade entre hospedeiros em relação a exposição aos parasitos pode ser considerada como um dos principais fatores associados à agregação parasitária (Poulin *et al.*, 2013).

A correlação positiva entre *T. orloffii* e *V. hamata* pode estar relacionada a similaridades na aquisição destes parasitos pelo hospedeiro, favorecendo a ocorrência de ambas as espécies no intestino delgado dos espécimes de *D. aurita*. O hospedeiro geralmente se infecta com estas espécies alimentando-se de itens contaminados por larvas destes helmintos, porém a infecção também pode ocorrer por via percutânea (Anderson, 2000). *Travassostrongylus orloffii* e *V. hamata* apresentam ciclo direto (Vicente *et al.*, 1997) e os gêneros *Travassostrongylus* e *Viannaia* já foram apontados anteriormente como dois grupos que compreendem nematoides tricostrongilídeos parasitando marsupiais americanos (Durette-Desset, 1968; Gomes *et al.*, 2003).

As análises de diversidade de espécies feitas através de nMDS indicam que uma maior proximidade entre localidades na figura da ordenação está relacionada a uma maior similaridade na composição de espécies (Valentin, 2012), sugerindo que as localidades agrupadas possam apresentar características comuns que favoreçam uma composição de espécies mais semelhante. A análise realizada entre as localidades estudadas mostra um agrupamento central de localidades que se situam numa interface de ambientes urbano e silvestre. O CFMA está localizado na área de amortecimento do PEPB e engloba tanto áreas de residências, quanto áreas de floresta em regeneração, assim como o Pau da Fome, que faz parte do PEPB, porém em meio a um centro urbano. A localidade do Bonfim, apesar de estar situada em um ambiente silvestre e fazer parte do PARNASO, pode estar inserida neste agrupamento mais central na figura da ordenação por apresentar no seu entorno pousadas, moradias e áreas de turismo de aventura que podem estar afetando a biodiversidade local.

As localidades mais preservadas (Uricanal e Águas do Imperador) ficaram mais distantes do centro da figura podendo apresentar as mesmas espécies. Devido as suas localizações dentro do PARNASO, estas localidades encontram-se em áreas distantes de habitações, com difícil acesso. Sabe-se que algumas espécies de helmintos podem estar relacionadas a ambientes mais preservados (Cardoso *et al.*, 2016), contudo, duas espécies não foram encontradas nas localidades silvestres e apenas uma não foi encontrada na localidade periurbana. O ambiente periurbano

apresentou a maior riqueza de espécies, mesmo considerando-se as riquezas médias, uma vez que o esforço amostral poderia estar influenciando no resultado de riquezas totais. Uma vez que este ambiente está numa interface de ambientes urbano e silvestre, as localidades deste ambiente parecem apresentar uma maior heterogeneidade de habitats (Castro *et al.*, 2017) o que pode proporcionar uma maior diversidade de espécies de helmintos numa escala local.

As localidades do Pamparrão e Porteira Verde que representam o ambiente rural, também se situaram na periferia da figura da ordenação. Estas localidades passaram por dois desastres ambientais e sofrem constantes mudanças devido a ação antrópica, o que pode explicar a menor riqueza encontrada no ambiente rural.

Os resultados aninhado e quase-aninhado obtidos para a estrutura da metacomunidade considerando-se comunidades componentes e infracomunidades, respectivamente, indicam que áreas com uma menor riqueza de espécies formam subconjuntos de áreas mais ricas, quando todas as localidades foram incluídas na análise. Estruturas quase-aninhadas indicam um padrão de estruturação mais fraco que o aninhado, porém com as mesmas características. A perda de espécies ao acaso observada (limite de distribuição não significativo), ocorre quando os limites de distribuição das espécies são determinados por tolerâncias ambientais espécie-específicas (Presley *et al.*, 2010), ou seja, quando cada espécie irá responder às variações do ambiente de forma diferente. Este fato é mais fácil de ser observado em grandes escalas espaciais. Quando analisados separadamente ao nível de infracomunidades, as comunidades dos ambientes urbano e rural apresentaram padrões aleatórios, sugerindo relações parasito-hospedeiro específicas a cada ambiente, onde para uma espécie que apresenta grandes deslocamentos, comportamento generalista e oportunista como *D. aurita*, apenas seria possível observar uma estruturação em função do gradiente em uma escala mais ampla. O padrão de tabuleiro de damas encontrado para as infracomunidades da área silvestre indica a possível existência de competição interespecífica entre os helmintos como mecanismo estruturador da metacomunidade (Presley *et al.*, 2010). A presença de uma espécie de cestoda e a baixa abundância de *T. orloff* na área silvestre, que apresentou correlação positiva com *V. hamata* para o conjunto das áreas, podem sugerir a ocorrência de competição interespecífica.

A ocorrência de espécies dominantes de maiores abundâncias e prevalências, tais como *C. tentaculata*, *T. turgida* e *A. raillieti*, nas localidades com menor riqueza, indicam que estes parasitos formam a comunidade central de todas

as comunidades componentes, contribuindo para a estruturação da metacomunidade investigada. Espécies como *D. prolobo*, *B. advena* e o Cestoda, que ocorreram em apenas uma comunidade componente e em abundâncias e prevalências mais baixas, podem ser consideradas como espécies “satélites”, também contribuindo para um padrão aninhado de estruturação. Um terceiro grupo de espécies, tais como *T. minuta*, *G. marsupialis*, *T. didelphis*, representam espécies que ocorreram em algumas comunidades e normalmente foram subordinadas ou codominantes, formando um grupo intermediário dentro do padrão aninhado.

A compreensão de padrões ecológicos só pode ser estudada em escalas regionais, sendo a abordagem de metacomunidades um exemplo. Este estudo foi o primeiro a analisar a estrutura das comunidades de helmintos do gambá *D. aurita* e também pioneiro a investigar a estrutura da metacomunidade de helmintos de um marsupial Neotropical.

7 CONCLUSÃO GERAL

Didelphis aurita é novo relato de hospedeiros para as espécies de nematoides *G. marsupialis* e *T. didelphis*.

O município do Rio de Janeiro é nova área de distribuição geográfica para os helmintos *G. marsupialis*; *H. heterostrongylus*; *T. orloffii*; *T. minuta*; *T. didelphis*; *D. prolaba*.

O município de Petrópolis é nova área de distribuição geográfica para os helmintos *A. raillieti*; *C. tentaculata*; *H. heterostrongylus*; *T. orloffii*; *T. minuta*; *T. didelphis*; *T. turgida*; *V. hamata* e *O. microcephalus*.

O município de Sumidouro é nova área de distribuição geográfica para os helmintos *H. heterostrongylus* e *O. microcephalus*.

Este estudo redescreveu *H. heterostrongylus* contribuindo com novos detalhes na sua ultraestrutura através de microscopia eletrônica de varredura e confirmando que *Didelphostrongylus hayesi*, apresenta afinidades filogenéticas por DNA com *H. heterostrongylus*.

A estrutura da metacomunidade indicou que as áreas com uma menor riqueza de espécies formaram subconjuntos de áreas mais ricas, ou seja, seguem um padrão em função do gradiente ambiental.

Tanto nas infracomunidades quanto na comunidade componente total, os limites de distribuição das espécies foram determinados por tolerâncias ambientais espécie-específicas.

O padrão de estruturação da comunidade de helmintos só foi observado na escala regional, indicando que nesta relação parasito-hospedeiro, as respostas a um gradiente ambiental se dão em uma escala espacial mais ampla do que em nível local.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. S. L.; CHRISTOFF, A. U.; VIEIRA, E. M. Identificação de marsupiais do Rio Grande do Sul através da microestrutura dos pelos-guarda. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 3, p. 1-10, 2011.
- ADNET, F. A. O.; ANJOS, D. H. S.; MENEZES-OLIVEIRA, A.; LANFREDI, R. M. Further description of *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1917 (Nematoda: Cruzidae) by light and scanning electron microscopy. **Journal of Parasitology Research**, v. 104, p. 1207–1211, 2009.
- AGUIAR, A. P.; CHIARELLO, A. G.; MENDES, S. L.; MATOS, L. N. Os corredores Central e da Serra do Mar na Mata Atlântica Brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (Ed.). Mata atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. Belo Horizonte: S.O.S. Mata Atlântica e Conservação Internacional. 2005.
- ALBUQUERQUE, H. G.; MARTINS, P. F.; PESSÔA, F. S.; MODESTO, T. C.; LUZ, J. L.; RAÍCES, D. S. L.; ARDENTE, N. C.; LESSA, I. C. M.; ATTIAS, N.; JORDÃO-NOGUEIRA, T.; ENRICI, M. C.; BERGALLO, H. G. Mammals of a forest fragment in Cambuci municipality, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Check List**. v. 9, n. 6, p. 1505–1509, 2013.
- ALDEN, K. J. Helminths of the Opossum, *Didelphis virginiana*, in Southern Illinois, with a Compilation of All Helminths Reported from This Host in North America. **The Helminthological Society of Washington**, v. 62, n. 2, p. 197-208, 1995.
- ALICATA, J. E. Larval development of the spirurid nematode *Physaloptera turgida* in the cockroach, *Blattella germanica*. Papers on Helminthology Published in Commemoration of the 30th year Jubileum K.I. Skrjabin and 15th Anniversary. All-Union Institute of Helminthology, 1937; p. 11–14.
- ALLAN, B. F.; LANGERHANS, B.; RYBERG, W. A.; LANDESMAN, W. J.; GRIFFIN, N. W.; KATZ, R. S.; OBERLE, B. J.; SCHUTZENHOFER, M. R.; SMYTH, K. N.; MAURICE, A.; CLARK, L.; CROOKS, K. R.; HERNANDEZ, D. E.; MCLEAN, R. G.; OSTFELD, R. S.; CHASE, J. M. Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. **Oecologia**, v. 158, p. 699-708, 2009.
- AMATO, J. F. R.; WALTER, A. B.; AMATO, S. B. **Protocolo para Laboratório. Coleta e Processamento de Parasitas do Pescado**. 1º ed. Rio de Janeiro: imprensa Universitária, UFRRJ, 1991; 81p.

- ANDERSON, R. C. **Keys to genera of the superfamily Metastrongyloidea**. In Anderson, R. C.; Chabaud, A. G.; Willmott, S. editors. CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Wallingford, UK: CABI Publishing; 1978; p. 1-40.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission**, 2nd ed. CAB International, Farnham Royal, U.K., 2000. 650 p.
- ANDERSON, R. C.; CHAUBAUD, A. G.; WILLMOTT, S. **Keys to the nematode parasites of vertebrates**. Archival volume. Wallingford, UK: CABI Publishing; 2009; 463p.
- ANDERSON, R. C.; LITTLE, M. D.; STRELIVE, U. R. The unique lungworms (NEMATODA: METASTRONGYLOIDEA) of the Opossum (*Didelphis marsupialis* LINNAEUS). **Systematic Parasitology**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 1980.
- ANDRÉN, H. Population responses to habitat fragmentation: statistical power and the random sample hypothesis. **Oikos**, v. 76, n. 2, p. 235-242, 1996.
- ANTUNES, G. M. **Diversidade e potencial zoonótico de parasitos de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia: Didelphidae)**. 2005. 122f. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, 2005.
- ARAÚJO, L. R. F. **Descrição taxonômica de *Cruzia* sp. nov. e *Aspidodera* sp. nov. (Nematoda, Ascaridida), parasitas de intestino grosso de *Philander opossum* Linnaeus, 1758, marsupial de Carajás-Pará, Brasil**. 2011. 86f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários, Belém, 2011.
- ARTIGAS, P. T.; ARAUJO, P.; ROMITI, N.; RUIVO, M. Sobre um caso de parasitismo humano por *Lagochilascaris minor* Leiper 1902, no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 10, n. 2, p. 78-83, 1968.
- ATRAMENTOWICZ, M. Influence du milieu sur l'activité locomotrice et la reproduction de *Caluromys philander* L. **Revue d'Ecologie (Terre et la Vie)**, v. 36, n. 3, p. 373-395, 1982.
- AURICCHIO, P.; SALOMÃO, M. G. **Técnicas de coleta e preparação de vertebrados**. 1a Ed. São Paulo, SP: Instituto Pau Brasil de História Natural/Terra Brasilis. 2002; 348p.
- AYOADE, J. O. **Introdução à climatologia para os trópicos**. 1 ed. São Paulo, Difel, 1986; 332p.

- BABERO, B. B. Further studies on helminths of the opossum, *Didelphis virginiana*, with a description of a new species from this host. **Journal of Parasitology**, v. 46, n. 4, p. 455-463, 1960.
- BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung Von Ankylostomum (Nematoden) — Larven in Erdproden. Mededeel Mit H. Geneesk. Batavia: Genesk, **Laboratorium te Welteureden Feestbundel**. p. 41-47, 1917.
- BEGON, M. 2008. **Effects of host diversity on disease dynamics**. In: *Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems* (eds OSTFELD, R. S.; KEESING, F.; EVINER, V. T.). Princeton University Press, Princeton, NJ, 12–29 pp.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. 2007. **Ecology: from individuals to ecosystems**. 4 ed. Oxford: Wiley Blackwell. 752 p.
- BELLOCQ, J. G.; SARA, M.; CASANOVA, J. C.; FELIU, C.; MORAND, S. A comparison of the structure of helminth communities in the woodmouse, *Apodemus sylvaticus*, on islands of the western Mediterranean and continental Europe. **Parasitology Research**, v. 90, n. 1, p. 64 – 70, 2003.
- BERGALLO, H. G.; ROCHA, C. F. D.; ALVES, M. A. S.; VAN SLUYS, M. **A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro**. 1nd ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora da UERJ. 2000; 166 p.
- BERGALLO; H. G.; MAGNUSSON, W. Effects of climate and food availability on four rodent species in southeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 80, p. 472-486, 1999.
- BERRAG, B.; URQUHART, G. M. Epidemiological aspects of lungworm infections of goats in Morocco. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 81-85, 1996.
- BLANCHARD, E. Recherches sur l'organisation des vers. Annales des Sciences Natureles, Zoologie, v. 3, n. 7, p. 87-108, 1847a.
- BLANCHARD, E. Recherches sur l'organisation des vers. Annales des Sciences Natureles, Zoologie, v. 3, n. 8, p. 119-149, 1847b.
- BLANCHARD, E. Recherches sur l'organisation des vers. Annales des Sciences Natureles, Zoologie, v. 3, n. 8, p. 271-341, 1847c.
- BONECKER, S. T.; PORTUGAL, L. G.; COSTA-NETO, S. F.; GENTILE, R. A long term study of small mammal populations in a Brazilian agricultural landscape. **Mammalian Biology**, v. 74, p. 467-477, 2009.
- BONVICINO, C. R.; LINDBERGH, S. M.; MAROJA, L. S. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their

potential use for monitoring environment. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4B, p. 765- 774, 2002.

BROUAT, C.; LOISEAU, A.; KANE, M.; Bø. K.; DUPLANTIER, J. M. Population genetic structure of two ecologically distinct multimammate rats: the commensal *Mastomys natalensis* and the wild *Mastomys erythroleucus* in southeastern Senegal. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2985–2997, 2007.

CASTRO, R. G. B. M.; COSTA-NETO, S. F.; MALDONADO JR, A.; GENTILE, R. Ecological aspects of nematode parasites of *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) in urban-sylvatic habitats in Rio de Janeiro, Brazil. **Oecologia Australis**, v. 21, n. 1, p. 54-61, 2017.

BRANDÃO, M. L. **Helmintos de mamíferos da região do Parque Nacional Serra da Capivara, Sudeste do Piauí: diversidade e influências antrópicas**. 2007: 165f. Dissertação de Mestrado (Ciências na área de Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

BRASIL. MMA (Ministério do Meio Ambiente) /SCA (Secretaria de Coordenação da Amazônia/IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). 2001. **Programa Piloto para a Proteção das Florestas Tropicais do Brasil – PPG7; Projeto Corredores Ecológicos**. 146 p.

BRAUN, M. Bermekugen ueber die Fascioliden Gattung *Rhopalias*. **Zoologischer Anzeiger**, v. 23, n. 605-632, p. 27-29. 1900.

BRAUN, M. Zur Kenntniss der Trematoden der Säugethiere. **Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Tiere**, v. 14, n. 4, p. 311-348, 1901.

BRESSLAU, E. L. **Plathelminthes**. Handwörterbuch der Naturwissenschaften, v. 2, p. 1105-1138, 1932.

BRIANTI, E.; GAGLIO, G.; GIANNETTO, S.; ANNOSCIA, G.; LATROFA, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; TRAVERSA, D.; OTRANTO, D. *Troglostrongylus brevior* and *Troglostrongylus subcrenatus* (Strongylida: Crenosomatidae) as agents of broncho-pulmonary infestation in domestic cats. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 178, p. 1-12, 2012.

BROWN, B. E. Atlas of New World Marsupials. **Fieldiana: Zoology New Series 102**. 2004; 320p.

BROWN, J. H.; LOMOLINO, M. V. **Biogeography**. 2nd Ed. Sunderland, Massachusetts (Sinauer Associates, Inc. Publishers), 1998; 691p.

- BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED J. R. **Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites**. United Kingdom: Cambridge University Press, Cambridge, 2001, 566 pp.
- CABALLERO, E. C. Estudios helmintológicos de la región onchocercosa de México y de la República de Guatemala. Trematoda II. Presencia de *Paragonimus* em reservatorios naturales y descripción de um nuevo género. **Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México**. v. 17, n. 1-2, p. 137-165, 1946.
- CABALLERO, E. C.; MONTEIRO GEI, F. Descripción dos tremátodos de um marsupial de la República de Costa Rica y un catálogo de los tremátodos que parasitan a Marsupialia Illiger, 1811. **Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas México**, v. 10, n. 1-4, p. 45-86, 1961.
- CABRERA, A.; YEPES, J. **Mamíferos sud americanos. Vida, costumbres y descripción**. 2.ed. Buenos Aires: Ed. Comp. Argent., 1960; 370p.
- CÁCERES, N. C. Diet of three didelphid marsupials (Mammalia, Didelphimorphia) in southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 69, n. 6, p. 430-433, 2004.
- CÁCERES, N. C. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna & Environmental**, v. 37, p. 97-104, 2002.
- CÁCERES, N. C. **Os Marsupiais do Brasil: Biología, Ecología e Conservação**. 2º ed. Campo Grande, MS: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2012; 498p.a.
- CÁCERES, N. C. Use of the space by the opossum *Didelphis aurita* Wied-Newied, 1826 (Mammalia, Marsupialia) in a mixed forest fragment of southern Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 20, p. 315-322, 2003.
- CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L .A. Food Habits, Home Range and Activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a Forest Fragment of Southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment, Netherlands**, v. 36, n.2, p. 85-92, 2001.
- CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L .A. Germination in seed species ingested by opossums: implications for seed dispersal and forest conservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 921-928, 2007.
- CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. The common opossum, *Didelphis aurita*, as a seed disperser of several plants in southern Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 52, p. 41-44, 2000.

CANTOR, M.; FERREIRA, L. A.; SILVA, W. R.; SETZ, E. Z. F. Potential seed dispersal by *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) in highly disturbed environment. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 45-51, 2011.

CARAMASCHI, U.; CARVALHO-E-SILVA, A. M. P.T.; CARVALHO-E-SILVA, S. P.; GOUVÊA, E.; IZECKSOHN, E.; PEIXOTO, O, POMBAL JR, J. P. Anfíbios. In: BERGALLO, H. G.; ROCHA, C. F. D.; ALVES, M. A. S.; VAN SLUYS, M. organizadores. **A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro**. 1nd ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora da UERJ. p 75-78, 2000.

CARDIFF, R. D.; WARD, J. M.; BARTHOLD, S. W. 'One medicine – one pathology': are veterinary and human pathology prepared? **Laboratory Investigation**, v. 88, p. 18-26, 2008.

CARDOSO, T. S; SIMÕES, R. O; LUQUE, J. L. F; MALDONADO JR., A; GENTILE, R. The influence of habitat fragmentation on helminth communities in rodent populations from a Brazilian Mountain Atlantic Forest. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 4, p. 460-468, 2016.

CARRENO, R. A.; NADLER, S. A. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 965–973, 2003.

CARTHEWA, S. M.; GOLDINGAY, R. L. Non-flying mammals as pollinators. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 3, p. 104-108, 1997.

CARVALHO, F. M. V.; PINHEIRO, P. S.; FERNANDEZ, F. A. S.; NESSIMIAN, J. L. Diet of small mammals in Atlantic Forest fragments in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 1, n. 1, p. 91-101, 1999.

CASELLA, J. Diet of *Didelphis aurita* and *Micoureus paraguayanus* and the fruit availability in a semideciduous Atlantic forest in Southern Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 6, n. 2, p. 85-93, 2011.

CASTRO, E. V.; FERNANDEZ, F. A. S. Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic forest fragments in Brazil. **Biological Conservation**, v. 119, n. 1, p. 73-80, 2004.

CASTRO, F. T.; GRISI, L. Prevalência de trematódeos em "cuicas" (*Metachirus nudicaudatus* (Temminck) e *Philander opossum* quica Temminck) no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 4, n.1, p. 69-71, 1974.

CEOTTO, P.; FINOTTI, R.; SANTORI, R. T.; CERQUEIRA, R. Diet variation of the marsupials *Didelphis aurita* and *Philander frenatus* (Didelphimorphia, Didelphidae) in

- a rural area of Rio de Janeiro State, Brazil. **Mastozoología Neotropical**, v. 16, p. 49-58, 2009.
- CERQUEIRA, R. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae). **Journal of Biogeography**, v. 12, n. 2, p. 135–145, 1985.
- CERQUEIRA, R.; BERGALLO, H. G. A possible case of photoperiod controlling the reproduction of a South American marsupial. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 140-141, 1993.
- CERQUEIRA, R.; LEMOS, B. Morphometric differentiation between Neotropical black eared opossums *Didelphis marsupialis* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 64, n. 3, p. 319-327, 2000.
- CERQUEIRA, R.; TRIBE, C. **Mammals of South America, vol. I. Marsupials (Didelphimorphia, Microbiotheria, and Paucituberculata), Xenarthrans (Cingulata, Pilosa), Shrews (Soricomorpha), and bats (Chiroptera), chap. *Didelphis***, University of Chicago Press, Chicago and London. 2008; p. 19-41.
- CHAGAS-MOUTINHO, V. A.; CARDENAS, M. Q.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; LANFREDI, R. M. Further Description of *Aspidodera raillieti* (Nematoda: Aspidoderidae) from *Didelphis marsupialis* (Mammalia: Didelphidae) by Light and Scanning Electron Microscopy. **Journal of Parasitology Research**, v. 101, p. 1331-1336, 2007.
- CHAGAS-MOUTINHO, V. A.; SANT'ANNA, V.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; SOUZA, W. New *Aspidoderida* espécie parasite of *Didelphis aurita* (Mammalia: Didelphidae). **Acta Tropica**, v. 130, p. 162–166, 2014.
- CHARLES-DOMINIQUE, P.; ATRAMENTOWICZ, M.; CHARLES-DOMINIQUE, M.; GÉRARD, H.; HLADIK, A.; HLADIR, C. M.; PRÉVOST, M. F. Les memifères frugivores arboricols nocturnes d`une forêt guyanaise: Inter-relations plantes-animaux. **Revue d`Ecologie**, v. 35, p. 341-435, 1981.
- CHARLES-DOMINIQUE, P.; ATRAMENTOWICZ, M.; CHARLES-DOMINIQUE, M.; GÉRARD, H.; HLADIK, A.; HLADIR, C. M.; PRÉVOST, M. F. Les memifères frugivores arboricols nocturnes d`une forêt guyanaise: Inter-relations plantes-animaux. **Revue d`Ecologie**, v. 35, p. 341-435, 1981.
- CHEREM, J. J.; GRAIPEL, M. E.; MENEZES, M. E.; SOLDATELI, M. Observações sobre a biologia do gambá (*Didelphis marsupialis*) na Ilha de Ratones Grande, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**. v. 9, n. 2, p. 47-56, 1996.
- CHIARELLO, A. G. Density and population size of mammals in remnants of Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v, 14, 1649-1657, 2000.

- COMBES, C. 1991. Evolution of parasite life cycles. In Parasite-host associations. Coexistence or conflict?, C. A. Toft, A. Aeschlimann, and L. Bolis (eds.). Oxford University Press, Oxford, U.K., p. 62– 82.
- COMBES, C. 2001. **Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions**. 1ed. Chicago: University of Chicago, Press. 552 p.
- CORDERO, G. A.; NICOLAS, R. A. Feeding habits of the opossum (*Didelphis marsupialis*) in northern Venezuela. **Fieldiana Zoology**, n. 39, p. 125-131, 1987.
- COSTA, C.; LAMAS, I.; FERNANDES, R. Planejamento estratégico do mosaico central fluminense. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/mosaicos/planejamento-central-fluminense.pdf>. Acesso em 29 de setembro de 2010.
- COSTA-NETO, S. F.; SIMÕES, R. O.; MOTA, E. M.; VILELA, R. V.; TORRES, E. J. L.; BARBOSA, H. S.; GENTILE, R. MALDONADO JR, A. Lungworm *Heterostrongylus heterostrongylus* Travassos, 1925 from the black-eared opossum in South America: Morphologic, histopathological and phylogenetic aspects. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 144–152, 2016.
- CULLEN, JR. L.; BODMER, R. E.; VALLADARES-PÁDUA, C. Ecological consequences of hunting in Atlantic forest patches, São Paulo, Brazil. **Oryx**, v. 35, n. 2, p. 137-144, 2001.
- CUNHA, A. A.; VIEIRA, M. V. Support diameter, incline, and vertical movements of four didelphid marsupials in the Atlantic Forest of Brazil. **Journal of Zoology**, v. 258, n. 4, p. 419-426, 2002.
- DALLAS, T. Metacom: an R package for the analysis of metacommunity structure. **Ecography**, v. 37, n. 4, p. 402–405, 2014.
- DI CESARE, A.; VERONESI, F.; TRAVERSA, D. Felid Lungworms and Heartworms in Italy: More Questions than Answers? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 665-675, 2015.
- DIESING, K. M. **Systema Helminthum**, Volume 2, Wilhelmum Braumüller, Vindobonae. 1851; 588p.
- DIESING, K. M. **Systema helminthum**, Volume. 1. Braumüller, Vindobonae. 1850; 679p.
- DOGIEL, V. A. **General parasitology**. Edinburgh, U.K: Oliver & Boyd Ltd, 1964. 516 p.
- DOUGHERTY, E. C. The phylogeny of the nematode family Metastrongylidae Leiper (1909) a correlation of host and symbiote evolution. **Parasitology**, v. 39, n. 3-4, p. 222-234, 1949.

- DUBOIS, G. Les Strigeata (Trematoda) de la Collection A. Lutz. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 68, n. 1, p. 169-196, 1970.
- DUBOIS, G. **Liste systématique des Strigeides du Brésil et du Venezuela**. Livro do Julibeu do Professor Travassos, 1938; p. 145-156a.
- DUBOIS, G. Monographie des Strigeida (Trematoda). **Mémoires de la Société des Sciences Naturelles de Neuchatel**. v. 69, p. 5-103, 1938b.
- DUJARDIN, F. **Histoire Naturelle des Helminthes ou vers Intestinaux**. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris, 1845; 652p.
- DUJARDIN, F. Mémoires sur les helminthes des musaraignes et en particulier sur les trichosomes, les distomes, et les taenias, sur les métamorphoses et leur transmigrations. **Annales des Sciences Naturelles, Zoologie**, v. 2, n. 20, p. 329–439, 1843.
- DUNCAN, R. B. JR.; REINEMEYER, C. R.; FUNK, R. S. Fatal Lungworm Infection in an Opossum. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, n. 2, p. 266-269, 1989.
- DURETTE-DESSET, M.C. Helminthes de marsupiaux américains, Trichostrongyloidea. Bulletin de la Société Zoologique de France, v. 93, n. 4, p. 581-594, 1968.
- EAMSOBHANA, P.; LIM, P. E.; YONG, H. S. Phylogenetics and systematics of *Angiostrongylus* lungworms and related taxa (Nematoda: Metastrongyloidea) inferred from the nuclear small subunit (SSU) ribosomal DNA sequences. **Journal of Helminthology**, v. 89, n. 3, p. 317–325, 2015.
- EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical Rainforest Mammals: A field Guide**. University of Chicago Press, Chicago. 1997; 307p.
- FAHRIG L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Reviews in Ecology. **Evolution and Systematics**, v. 34, p. 487-515, 2003.
- FISCHER, J.; LINDENMAYER, D. B. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. **Global Ecology and Biogeography**, v. 16, p. 265-280, 2007.
- FONSECA, G. A. B. Small mammal species diversity in Brazilian tropical primary and secondary forest of different sizes. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 6, n. 3, p. 381-422, 1989.
- FONSECA, G. A. B.; ROBINSON, J. G. Forest size and structure: competitive and predatory effects on small mammals communities. **Biological Conservation**, v. 53, p. 265– 294, 1990.

- FREITAS, J. F. T.; KOHN, A.; NICANOR IBÁÑEZ, H. Sobre as espécies de *Brachylaemus* (*Brachylaemus*) Dujardini, 1843 (Trematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 61, n. 1, p. 41-69, 1967.
- FREITAS, J. F. T.; LENT, H. Estudo sobre o gênero *Globocephalus* Molin, 1861 (Nematoda: Strongyloidea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 1, p. 69-79, 1936.
- FREITAS, J. F. T.; LENT, H. Quelques variations et anomalies bursaires observées chez *Viannaia viannai* Trav., 1914. **Revista Médico-Cirúrgica do Brasil**, v. 43, n. 9, p. 253-258, 1935.
- FREITAS, S. R.; ASTÚA DE MORAES, D.; SANTORI, R. T.; CERQUEIRA, R. Habitat preference and food use by *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) in a restinga forest at Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 57, p. 93-98, 1997.
- FÜHRMANN, O. **Zweite Klasse des Cladus Plathelminthes Trematoda**. In KÜKENTHAL, W & KRUMBACH, T. Handbuch der Zoologie. 2^a ed, v. 2, Hälfte. Walter de Gruyter, Berlin & Leipzig, 1928; 140p.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015, Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>> Acessoem: 22 de set de 2015.
- GARDNER, A. L. **Mammals of South America**. Vol. 1. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. Chicago: University of Chicago Press, 2007; 690p.
- GARDNER, A. L. Order Didelphimorphia. In Mammal species of the world, 2nd ed., ed. D. E. Wilson and D. M. Reeder, 15–24. Washington, DC: The Smithsonian Institution Press, 1993; xviii + 1206 pp.
- GARDNER, A. L. The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. Literature Cited 513 Special Publications of the Museum 4. Lubbock: Texas Tech University Press, 1973; 81 p.
- GARDNER, A. L. Virginia opossum. In Wild mammals of North America, ed. J. A. Chapman and G. A. Feldhamer, 3–36. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 1982; xiv + 1147 pp.
- GARDNER, A. L.; CAMPBELL, M. L. Parasites as probe for biodiversity. **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 4, p. 596-600, 1992.
- GENTILE, R.; D'ANDREA, P. S.; CERQUEIRA, R.; MAROJA, L. S. Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 35, p. 1-9, 2000.

- GENTILE, R.; D'ANDREA, P. S. **Biodiversidade e Saúde: uma relação que precisa ser reconhecida**. In: ARIANE LUNA PEIXOTO; JOSÉ ROBERTO PUJOL; MARIA APARECIDA DE BRITO. (Org.). Conhecendo a Biodiversidade. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Vozes, 2016, 156-171 p.
- GENTILE, R.; D'ANDREA, P. S.; CERQUEIRA, R. Age structure of two marsupials in a Brazilian Restinga. Inglaterra. **Journal of Tropical Ecology**, v. 11, p. 679-682, 1995.
- GENTILE, R.; FINOTTI, R.; RADEMAKER, V.; CERQUEIRA, R. Population dynamics of four marsupials and its relation to resource production in the Atlantic Forest in Southeastern Brazil. **Mammalia** (Paris), França, v. 68, n. 2-3, p. 109-119, 2004.
- GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. **Keys to the Trematoda**. v. 1. London, UK: CABI Publishing and the Natural History Museum, 2002; 521 p.
- GILPIN, M. E.; HANSKI, I. A. (1991). **Metapopulation Dynamics: Empirical and Theoretical Investigations**. Academic Press, London. 323p.
- GOMES, C. D.; CRUZ, P. R.; VICENTE, J. J.; PINTO, R. M. Nematode parasites of marsupials and small rodents from the Brazilian Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 20, n. 4. p. 699-707, 2003.
- GOMES, D. C. **Contribuição ao conhecimento dos helmintos parasitos de marsupiais no Brasil, da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz**. 1977. 102f. Tese de doutorado. Doutorado em Parasitologia Veterinária no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, no Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1977.
- GOMES, D. C. Contribuição ao conhecimento dos helmintos parasitos de marsupiais no Brasil, da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz - Trematoda. Atas da **Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 20, n. 00, p. 33-43, 1979a.
- GOMES, D. C. Contribuição ao conhecimento dos helmintos parasitos de marsupiais no Brasil, da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (Cestoda, Archiacanthocephala e Linguatulida). **Revista Ibérica de Parasitologia**, v. 39, n. 00, p. 587-599, 1979b.
- GOMES, D. C. *Philander opossum* (Marsupialia), a new host recorded for *sparganum* of *Lueheella* Baer, 1924 (= *Spirotrema* Mueller, 1937). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 3, p. 369-370, 1984.
- GOMES, D. C.; PINTO, R. M. *Castroia inquassata* sp. n. trematódeo de *Marmosa* sp. (Trematoda, Castroiinae). **Atas ds Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 15, n. 3, p. 129-131, 1972.

- GOMES, D. C.; PINTO, R. M. Contribuição ao conhecimento da fauna helmintológica da Região Amazônica - Trematódeos. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 19, n. 00, p. 43-46, 1978.
- GOMES, D. C.; VICENTE, J. J. Estudo do gênero *Rhopalias* Stiles & Hassall, 1898 (Trematoda, Rhopaliasidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 70, n. 2, p. 115–133, 1972.
- GONZÁLEZ, M. T.; BARRIENTOS, C.; MORENO, C. A. Biogeographical patterns in endoparasite communities of a marine fish (*Sebastes capensis*, Gmelin) with extended range in the Southern Hemisphere. **Journal of Biogeography**, v. 33, p. 1086–1095, 2006.
- GRELLE, C. E. V. Forest structure and vertical stratification of small mammals in a secondary Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 38, n. 2, p. 81-85, 2003.
- GRELLE, C. E. V.; GARCIA, Q. S. Potential dispersal of *Cecropia hololeuca* by the common opossum (*Didelphis aurita*) in Atlantic forest, southeastern Brazil. **Revue d'Ecologie (Terre et la Vie)**, v. 54, p. 327-332, 1999.
- HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A. **Anfíbios da Mata Atlântica: guia dos anfíbios anuros da Mata Atlântica**. São Paulo (SP): Editora Neotropica. 2008; 244 p.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 9. 2001.
- HARTWICH, G. Type identity of the swine parasites *Globocephalus longemucronatus* and *G. urosubulatus* (Nematoda, Strongyloidea). **Angewandte Parasitologie**, v. 27, n. 4, p. 207-14, 1986.
- HASEGAWA, H.; KOBAYASHI, J.; OTSURU, M. Helminth Parasites Collected from *Rattus rattus* on Lanyu, Taiwan. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 61, n. 1, p. 95-102, 1994.
- HERRERA, L.; D'ANDREA, P. S.; XAVIER, S. C. C.; MANGLIA, R. H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. Tripanossomiasis in wild mammals of the national park Serra da Capivara and its surrounding (Piauí, Brazil), endemic focus of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 99, n. 5, p. 379-388, 2005.
- HUDSON, P. J.; RIZZOLI, A.; GRENFELL, B. T.; HEESTERBEEK, H.; DOBSON, A. **The ecology of wildlife diseases**. Oxford University Press, Oxford. 2002; 218p.

- HUMASON, G. L. **Animal Tissue Techniques**. 4^o ed. San Francisco, CA, USA: W.H. Freeman and Company; 1979. 468p.
- HUMBOLDT, A. F. W. von. **Recueil d'observations de zoologie et d'anatomie comparee**, v. 1, p. 289-304, 1809.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em < <http://cod.ibge.gov.br/1RM> >. Acesso em 29 de setembro de 2016.
- JANICKI, C. Zur Kenntnis einiger Säugetiercestoden. **Zoologische Anzeiger**, v. 27, p. 770–782, 1904.
- JANSEN, A. M. **Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas**. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S.; *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2002; p. 166-173.
- JIMÉNEZ, F. A.; CATZEFLIS, F.; GARDNER, S. L. Structure of parasite component communities of didelphid marsupials: insights from a comparative study. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 779–787, 2011.
- JIMÉNEZ, F. A.; GARCÍA-PRIETO, L.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Helminth infracommunity structure of the sympatric garter snakes *Thamnophis eques* and *Thamnophis melanogaster* from the Mesa Central of Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 454–460, 2002.
- JOB, G. 2011. **Treefinder version of March 2011**, Software distributed by the author. [Internet]: [atualizado 2015. Maio 2; Citado 2016 Jun 16]. Disponível em: <http://www.treefinder.de>.
- JOHNSON, P. T. J.; THIELTGES, D. W. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 961-970, 2010.
- JONES, A.; BRAY, R. A.; GILBSON, D. I. **Keys to the Trematoda**. CAB International. 2005; 745 p.
- JOYEUX, C. E.; FOLEY, H. Les helminthes des Meriones shawi shawi Rozet dans le nord de l'Algérie. **Bulletin de la Société Zoologique de France**, v. 55, n. 5, p. 353–374, 1930.
- JULIEN-LAFERRIÈRE, D. Foraging strategies and food partitioning in the neotropical frugivorous mammals *Caluromys philander* and *Potos flavus*. **Journal of Zoology (London)**, v. 247, p. 71-80, 1999.
- JULIEN-LAFERRIÈRE, D. Use of space by the wooly opossum *Caluromys philander* (Marsupialia, Didelphidae) in French Guiana. **Canadian Journal of Zoology**, v. 73, p. 1280-1289, 1995.

- JULIEN-LAFFERIERE, D.; ATRAMENTOWICZ, M. Feeding and reproduction of three didelphid marsupials in two neotropical forests (french guiana). **Biotropica**. v. 22, n. 4, p. 404-415, 1990.
- JUNIOR, V. C.; LUIZ, Y.; LEITE, R. Uso de habitats por pequenos mamíferos no Parque Estadual da Fonte Grande Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**. v. 21, p. 57–77, 2007.
- KHALIL, L. F.; JONE, A. B.; BRAY, R. A. **Keys to the Cestoda parasites of vertebrates**. CAB International. 1994; 751p.
- KOMMA, M. D.; ALVES, E. L. *Rhopalias goyanna* n. sp. (Trematoda, Rhopaliasidae) parasito de marsupial de Nerópolis, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. v. 3, n. 4. p. 341-345, 1974. 1974.
- KRASNOV, B. R.; MOUILLOT, D.; SHENBROT, G. I.; KHOKHLOVA, I. S.; VINARSKI, M. V.; KORALLO-VINARSKAYA, N. P. Similarity in ectoparasite faunas of Palaearctic rodents as a function of host phylogenetic, geographic or environmental distances: Which matters the most? **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 7, p. 807–817, 2010a.
- KRASNOV, B. R.; SHENBROT, G. I.; MOUILLOT, D.; KHOKHLOVA, I. S.; POULIN, R. Spatial variation in species diversity and composition of flea assemblages in small mammalian hosts: Geographical distance or faunal similarity? **Journal of Biogeography**, v. 32, p. 633– 644, 2005.
- KRASNOV, B. R.; STANKO, M.; KHOKHLOVA, I. S.; SHENBROT, G. I.; MORAND, S.; KORALLO-VINARSKAYA, N. P. Nestedness and β -diversity in ectoparasite assemblages of small mammalian hosts: effects of parasite affinity, host biology and scale. **Oikos**. v. 120, n. 4, p. 630–639, 2011.
- KRASNOV, B. R.; STANKO, M.; MORAND, S. Are ectoparasite communities structured? Species co-occurrence, temporal variation and null models. **Journal Animal Ecology**, v. 75, n. 6, p. 1330–1339, 2006.
- KRASNOV, B. R.; MATTHEE, S.; LARESCHI, M.; KORALLO-VINARSKAYA, N. P.; VINARSKI, M. V. Co-occurrence of ectoparasites on rodent hosts: null model analyses of data from three continents. **Oikos**, v. 119, p. 120–128, 2010b.
- KYU-SUNG, A.; AH-JIN, A.; TAE-HOON, K.; GUK-HYUN, S.; KYOUNG-WOONG, J.; SUNG-SHIK, S. Identification and Prevalence of *Globocephalus samoensis* (Nematoda: Ancylostomatidae) among Wild Boars (*Sus scrofa coreanus*) from Southwestern Regions of Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 5, p. 611-618, 2015.

- LAMBERSKI, N.; READER, J. R.; COOK, L. F.; JOHNSON, E. M.; BAKER, D. G.; LOWENSTINE, L. J. A Retrospective study of 11 cases of lungworm (*Didelphostrongylus hayesi*) infection in opossums (*Didelphis virginiana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 2, p. 151–156, 2002.
- LAURANCE, W. F. Reflections on the tropical deforestation crisis. **Biological Conservation**, v. 91, p. 109-117, 1999.
- LAURANCE, W. F.; DELAMÔNICA, P.; LAURANCE, S. G.; VASCONCELOS, H. L.; LOVEJOY, T. E. Rainforest fragmentation kills big trees. *Nature*, 404: 836. 2000.
- LEIDY, J. A synopsis of Entozoa and some of their ecoto-congeners observed by the author. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 8, p. 42–59, 1856.
- LEIBOLD, M, A.; HOLYOAK, M.; MOUQUET, N.; AMARASEKARE, P.; CHASE, J. M.; HOOPES, M. F.; HOLT, R. D.; SHURIN, J. B.; LAW, B.; TILMAN, D.; LOREAU, M.; GONZALEZ, A. The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. **Ecology Letters**, v. 7, p. 601–613, 2004.
- LEIBOLD, M. A.; MIKKELSON, G. M. Coherence, species turnover, and boundary clumping: elements of meta-community structure. **Oikos**, v. 97, p. 237–250, 2002.
- LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; STALLINGS, J. R. Diet and vertical space use of three sympatric opossums in a Brazilian Atlantic forest reserve. **Journal of Tropical Ecology**, v. 12, n. 3, p. 435-440, 1996.
- LEITE, Y. L. R.; STALLINGS, J. R.; COSTA, L. P. Partição de recursos entre espécies simpátricas de marsupiais na Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, n. 3, p. 525-536, 1994.
- LEMOS, E. R. S.; D'ANDREA, P. S. **Trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança**. 1ed. Rio de Jairo-RJ: Editora FIOCRUZ, v. 1, 2014. 107-126 p.
- LEMOS, E. R. S.; D'ANDREA, P. S. **Trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança**. 1ed. Rio de Jaineiro-RJ: Editora FIOCRUZ, v. 1, 2014; 177p.
- LESSA, L. G.; COSTA, F. N. Diet and seed dispersal by five marsupials (*Didelphimorphia*: *Didelphidae*) in a Brazilian cerrado reserve. **Mammalian Biology**, v. 75, p. 10-16, 2010.
- LIMA, M. M.; SARQUISA, O.; OLIVEIRA, T. G.; GOMES, T. F.; COUTINHO, C.; DAFLON-TEIXEIRA, N. F.; TOMA, H. K.; BRITTO, C.; TEIXEIRA, B. R.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M.; BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A. Investigation of

Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 143–149, 2012.

LOMBARDEIRO, O. J.; MORIENA, R. A. Neuvos helmintos de la comadreja overa (*Didelphis azarae*) para la Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria, Buenos Aires**, v. 54, n. 4, p. 315-320, 1973.

LOMOLINO, M. V.; RIDDLE, B. R.; BROWN, J. H. **Biogeography**, 3rd Edition. Sinauer Associates. 2005; 845 p.

LORETTO, D.; VIEIRA, M. V. The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826). **Journal of Mammalogy**, v. 86, n. 2, p. 287-293, 2005.

LUTZ, A. Distoma ophisthotrias, um novo parasita do gambá pelo dr. Adolpho Lutz. Revista do Museu Paulista, v.1, p.181-188, 1895. (português); Ein neuer Parasit der Beutelratte (Abgekuerzte Übersetzung), 1 pl. p. 189-193, 1895. (alemão), In: Benchimol & Sá (Org.). Adolpho Lutz, Obra Completa. v. 3, n. 2. 2007.

MACEDO, J.; LORETTO, D.; VIEIRA, M. V.; CERQUEIRA, R. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos. **Mastozoología Neotropical**, v. 13, n. 1, p. 133-136, 2006.

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**. Version 3.04. [Internet]. [Local desconhecido]: [atualizado 2015. Maio 2; Citado 2016 Jun 16]. Disponível em: <http://mesquiteproject.org>.

MAFRA, A. C. A.; LANFREDI, R. M. Reevaluation of *Physaloptera bispiculata* (Nematoda: Spirurida) By Light And Scanning Microscopy. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 3 p. 582-588, 1998.

MALDONADO JR., A.; GENTILE, R.; FERNANDES-MORAES, C. C.; D'ANDREA, P. S.; LANFREDI, R. M.; REY, L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. **Journal of helminthology**, v. 80, n. 4, p. 369-375, 2006.

MARTINS, E. G.; BONATO, V. On the diet of *Gracilinanus microtarsus* (Marsupialia, Didelphidae) in Atlantic Rain Forest fragment in Southeastern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 69, n. 1, p. 158-60, 2004.

MEDELLÍN, R. A. Seed dispersal of *Cecropia obtusifolia* by two species of opossums in the Selva Lacandona, Chiapas, Mexico. **Biotropica**, v. 26, n. 4, p. 400-407, 1994.

MEHRA, H. R. Revision of Brachylaemidae Joyeux et Foley, 1930 with new subfamilies Thapariellinae and Urotrematinae and new family Harmotrematidae with

its subfamilies Harmotrematinae Yamaguti, 1933 and Helicotrematinae n. subf. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, 32, 319–334, 1962.

METZGER, J. P. Tree functional group richness and landscape structure in a Brazilian tropical fragmented landscape. **Ecological Applications**, v. 10, n. 4, p. 1147–1161, 2000.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees**. In 2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010.

MILLS, J. N. Biodiversity loss and emerging infectious disease: an example from the rodent borne hemorrhagic fevers. **Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 9–17, 2006.

MININ, V.; ABDO, Z.; JOYCE, P.; SULLIVAN, J. Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 674–683, 2003.

MITTERMEIER, R. A.; GIL, R. P.; HOFFMAN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J.; FONSECA, G. A. B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**, 2nd ed. University of Chicago Press (Boston): Conservation International. 2005; 392p.

MMA/SBF. 2002. Biodiversidade Brasileira – Avaliação e Identificação de Áreas e Ações Prioritárias para Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de benefícios da Biodiversidade Brasileira (1a. ed., p. 404). Brasília, DF: MMA/SBF.

MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; DIAS, V. S. Observações sobre a biologia de *Lutreolina crassicaudata* (Mammalia: Marsupialia). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, p. 393–399, 1990.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 1, n.1, p. 507–624, 1948.

MOTTA, M. F. D. **Estudo do desenvolvimento extra uterino de *Didelphis aurita* Wied, 1826, em cativeiro – Investigação de critérios para estimativa de idade**. 116p Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1988.

MOURA, M. C.; VIEIRA, M. V.; CERQUEIRA, R. Occasional intraguild predation structuring small mammal assemblages: the marsupial *Didelphis aurita* in the Atlantic Forest of Brazil. **Austral Ecology**, v. 34, p. 481–489, 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NAVONE, G. T.; NOTARNICOLA, J.; NAVA, S.; ROBLES, M. R.; GALLIARI, C.; LARESCHI, M. Arthropods and helminths assemblage in sigmodontine rodents from wetlands of the Rio de La Plata, **Argentina Mastozoologia Neotropical**, v. 16, p. 121–133, 2009.

NIELSEN, N. O. **Ecosystem health: application of the concept and wildlife as indicators**. Proceedings of the Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians, Wildlife Disease Association and American Association of Wildlife Veterinarians, East Lansing, Michigan, USA, August 12 to 17. 1995.

NORONHA, D.; VICENTE, J. J.; PINTO, R. M. **Novos registros de nematóides em didelfídeos no Brasil**. In: XV CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE PARASITOLOGIA, XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, I CONGRESSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE PARASITOLOGIA, 2001, SÃO PAULO. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, p. 223-223, 2001.

NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the World**. Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press. 1991; LXII+642p.

OLIVEIRA, E. V.; GOIN, F. J. Marsupiais fósseis do Paleoceno de Itaboraí: origem, irradiação e história biogeográfica. In: CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. (Eds.). **Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução**. Campo Grande: Ed. UFMS, p. 299-320, 2006.

OLIVEIRA-MENEZES, A.; LANFREDI-RANGEL, A.; LANFREDI, R. M. The first description of eggs in the male reproductive system of *Physaloptera bispiculata* (Nematoda: Spiruroidea). **Journal of Helminthology**, v. 85, n. 2, p. 142-145, 2011.

OSBURN, B.; SCOTT, C.; GIBBS, P. One World – One Medicine – One Health: emerging veterinary challenges and opportunities. **Revue Scientifique et technique Office of International Epizootics**. v. 28, n. 2, p. 481-486, 2009.

OSTFELD, R.S. Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 1, p. 40-43, 2009.

PAGLIA, A. P.; DA FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. 2ª edição. **Occasional Papers in Conservation Biology**, v. 6, p. 1-76, 2012.

- PALMA, A. R. T. **Separação de nichos entre pequenos mamíferos de Mata Atlântica.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996. 104 p.
- PARDINI, R.; MARQUES DE SOUZA, S.; BRAGA-NETO, R.; METZGER, J. P.; The role of Forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. **Biological Conservation**, v. 124, n. 2, p. 253-266, 2005.
- PASSAMANI, M. Análise da comunidade de marsupiais em Mata Atlântica de Santa Teresa, Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, N. Série. v. 11/12, p. 215- 228, 2000.
- PASSAMANI, M. Vertical stratification of small mammals in Atlantic Hill Forest. **Mammalia**. v. 59, n. 2, p. 276-279, 1995.
- PAULA COUTO, C. **As sucessivas faunas de mamíferos terrestres no continente americano.** Rio de Janeiro: Publicações Avulsas do Museu Nacional, 1952.
- PAVAN, S. E.; ROSSI, R. V.; SCHNEIDER, H. Species diversity in the *Monodelphis brevicaudata* complex (Didelphimorphia: Didelphidae) inferred from molecular and morphological data, with the description of a new species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 165, p. 190-223, 2012.
- PAVLOVSKY, E. N. 1966. **Natural nidality of transmissible diseases, with special reference to the landscape epidemiology of zoonoses.** University of Illinois Press, Urbana, 261p.
- PENCE, D. B. **Helminth community of mammalian hosts: Concepts at the infracommunity, component community and compound community levels.** In Parasite communities: patterns and processes, ESCH, G. W.; BUSH, A. O.; AHO, J. M. Chapman and Hall, New York, New York, 1990. p. 233–260.
- PESSÔA, F. S.; MODESTO, T. C.; ALBUQUERQUE, H. G.; ATTIAS, N.; BERGALLO, H. G. Non-volant mammals, Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Rio das Pedras, municipality of Mangaratiba, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Check List**. v. 5, n. 3, p. 577–586, 2009.
- PIMM, S. L.; JENKINS, C. N.; JOPPA, L. N.; ROBERTS, D. L.; RUSSELL, G. J. How many endangered species remain to be discovered in Brazil? **Natureza & Conservação**, v. 8, n. 1, p. 71-77, 2010.
- PINTO, H. A.; MATI, V. L. T.; MELO, A. L. *Toxocara cati* (Nematoda: Ascarididae) in *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) from Brazil: a case of

- pseudoparasitism. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 23, n. 4, p. 522-525, 2014.
- PINTO, R. M.; GOMES, D. C. Contribuição ao conhecimento da fauna helmintológica da Região Amazônica: Cestódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 74, n. 1, p. 53-64, 1976.
- PINTO, R. M.; GOMES, D. C. Contribuição ao conhecimento da fauna helmintológica da Região Amazônica - Trematódeos. **Atas Da Sociedade De Biologia Do Rio De Janeiro**, v. 19, p. 43-46, 1978.
- PINTO, R. M.; GOMES, D. C. Contribuição ao conhecimento da fauna helmintológica da Região Amazônica. **Atas Da Sociedade De Biologia Do Rio De Janeiro**, v. 21, p. 65-74, 1980.
- POLITZ, S. M.; PHILIPP, M. Caenorhabditis elegans as a Model For Parasitic Nematodes: A Focus on the Cuticle. **Parasitology Today**, v. 8, n. 1, p. 6-12, 1992.
- PORTA, A. Gli acantocefali dei mammiferi. **Archivio Zoologico** (Naples), v. 5. n. 4, p. 239–285, 1909.
- POULIN, R. Are there general laws in parasite ecology? **Parasitology**, v. 134, p. 763–776, 2007.
- POULIN, R. Network analysis shining light on parasite ecology and diversity. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 492–498, 2010.
- POULIN, R. Richness, nestedness, and randomness in parasite infracommunity structure. **Oecologia**, v. 105, n. 4, p. 545-551, 1996.
- POULIN, R. Species richness of parasite assemblages: evolution and patterns. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 28, p. 341–358, 1997.
- POULIN, R. The decay of similarity with geographical distance in parasite communities of vertebrate hosts. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 1609–1615, 2003.
- POULIN, R.; DICK, A. T. Spatial variation in population density across the geographical range in helminth parasites of yellow perch *Perca flavescens*. **Ecography**, v. 30, p. 629–636, 2007.
- POULIN, R.; KRASNOV, B. R.; PILOSOF, S.; THIELTGES, D. W. Phylogeny determines the role of helminth parasites in intertidal food webs. **Journal of Animal Ecology**, v. 82, n. 6, p. 1265–1275, 2013.
- PRATT, H. S. Synopses of North-American Invertebrates. XII. The Trematodes. Part. 2, The Aspidocotylea and the Malacocotylea, or digenetic forms. **The American Naturalist**, v. 36, n. 431, p. 887–910, 1902.

- PRESLEY, S. J.; HIGGINS, C. L.; WILLIG, M. R. A comprehensive framework for the evaluation of metacommunity structure. **Oikos**, v. 119, p. 908–917, 2010.
- PRESTWOOD, A. K. *Didelphostrongylus hayesi* gen. et sp. n. (Metastrongyloidea: Filaroididae) from the Opossum, *Didelphis marsupialis*. **Journal of Parasitology**, v. 62, n. 2, p. 272-275, 1976.
- PRESTWOOD, A. K.; NETTLES, V. F.; FARRELL, R. L. Pathologic Manifestations of Experimentally and Naturally Acquired Lungworm Infections in Opossums. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 4, p. 529-532, 1977.
- PRICE, P. W. **Evolutionary Biology of Parasites**. Princeton University Press, Princeton, NJ. 1980; 256p.
- PROD'HON, J. *Rhopalium dobbini* n. sp., trematode parasite de *Monodelphis domestica*. **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 40, n. 2, p. 393-395, 1968.
- PROENÇA, M. C. Revisão do gênero *Aspidodera* Railliet & Henry, 1912. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, n. 3, p. 427–438, 1937.
- PRUESSE, E.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. **Bioinformatics**. v. 28, n. 14, p. 1823–1829, 2012.
- R CORE TEAM (2017) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, The R Project for Statistical Computing. [atualizado 2017. Maio 17; Citado 2017 Jun 10]. Disponível em: <http://www.r-project.org> [Accessado: 10/06/2017]
- RAILLIET, A. Nouveaux trématodes du chien. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 95, p. 5–27, 1919.
- RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; DRUMMOND, A. J. Tracer v1.6, [Internet]. [Local desconhecido]: [atualizado 2014. Maio 17; Citado 2016 Jun 10]. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- RAMOS, M. C. 2009. **Ecologia da polinização de Taperebá (*Spondias mombin* L., Anacardiaceae) em área de floresta secundária no município de Santo Antônio do Tauá, Pará, Brasil**. Dissertação de Mestrado, UFPA. 64p.
- RBMA 1996. A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica - roteiro para o entendimento de seus objetivos e seu sistema de gestão. São Paulo. Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica.
- REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nélcio R. dos Reis, 2006. 437 p.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p.1144-1156, 2009.

RICHARDSON, D. J.; GARDNER, S. L.; ALLEN JR., J. W. Redescription of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt 1972 (syn. *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Leidy, 1850) Schmidt 1972) (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae). **Comparative Parasitology**, v. 81, n. 1, p. 53–60, 2014.

RICHGELS, K. L. D.; HOVERMAN, J. T.; JOHNSON, P. T. J. Evaluating the role of regional and local processes in structuring a larval trematode metacommunity of *Helisoma trivolvis*. **Ecography**, v. 36, p. 854–863, 2013.

ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; ALVES, M. A. S.; VAN SLUYS, M. 2003. A biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro e nas restingas dos corredores da Mata Atlântica. 1nd ed. São Carlos (SP): Rima Editora. 160 p.

ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; BITTENCOURT, E. B. More than just invisible inhabitants: parasites are important but neglected components of the biodiversity. **Zoologia**, v. 33, n. 3, 2016.

RONQUIST, F.; TESLENKO, MARK, P. V. D.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. Ordem Didelphimorphia. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: NÉLIO R. DOS REIS, p. 27-66, 2006.

RUDOLPHI, C. A. **Entozoorum synopsis cui accedunt mantissa duplex et indices locupletissimi**. Berolini, 1819; X+811p.

RUIZ, J. M. Sobre um novo *Gnathostoma* assinalado no Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 24, n. 1, p. 37-44, 1952.

RYSER, J. The mating system and male mating success of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) in Florida. **Journal of Zoology (London)**, v. 228, p. 127-139, 1992.

- SANTORI, R. T. **Aparato trófico e variação nos hábitos alimentares de *Philander opossum* e *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.
- SANTORI, R. T.; ASTÚA DE MORAES, D.; CERQUEIRA, R. Diet composition of *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 59, n. 4, p. 511-516, 1995.
- SANTORI, R. T.; ASTÚA DE MORAES, D.; GRELLE, C. E. V.; CERQUEIRA, R. Natural diet at a Restinga forest and laboratory food preferences of the opossum *Philander frenata* in Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.32, n. 1, p.12-16, 1997.
- SANTORI, R. T.; ASTÚA DE MORAES, D.; GRELLE, C. E. V.; CERQUEIRA, R. Natural diet at a Restinga forest and laboratory food preferences of the opossum *Philander frenata* in Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.32, n. 1, p.12-16, 1997.
- SANTORI, R. T.; LESSA, L. G.; ASTÚA, M. D. 2012. **Alimentação, nutrição e adaptações alimentares de marsupiais brasileiros**. In: CÁCERES, N. C. editor. Os marsupiais do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação. 2a ed. Campo Grande: UFMS; p. 383– 404.
- SANTOS, C. P.; LENT, H.; GOMES, D. C. The Genus *Aspidodera* Railliet & Henry, 1912 (Nematoda: Heterakoidea): Revision, New Synonyms and Key for Species. **Revista Brasileira De Biologia**, v. 50, n. 4, p. 1017-1031, 1990.
- SANTOS, E. Redescrição de *Mathevotaenia bivittata* (JANICKI, 1904) parasito de marsupial (Cestoda: Linstowiinae). **Atlas da Sociedades de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 11, n. 5, p. 193-194, 1968.
- SCHMIDT, G. D. Revision of the class Archiacanthocephala Meyer, 1931 (Phylum Acanthocephala), with emphasis on Oligacanthorhynchidae Southwell et Macfie, 1925. **Journal of Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 290–297, 1972.
- SCHWARZ, G. Estimation the dimension of a model. **Annals of Statistics**, v. 6, n. 2, p. 461–464, 1978.
- SCOTT, D. M.; BROWN, D.; MAHOOD, S.; DENTON, B.; SILBURN, A.; RAKOTONDRAPARANY, F. The impacts of forest clearance on lizard, small mammal and bird communities in the arid spiny forest, southern Madagascar. **Biological Conservation**, v. 127, n. 1, p. 72-87, 2006.
- SHIRAI, L. T. Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Genética) (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: **Filogeografia e**

biogeografia da Floresta Atlântica: um estudo de caso com *Didelphis aurita*,

Ano de Obtenção: 2008.

SILVA, M. C.; BARROS, R. R.; GRAÇA, D. L. Outbreak of dictyocaulosis in cattle in Santa Maria, RS, Brazil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 35, n. 3, p. 629-632, 2005.

SILVA, M. G. Q.; COSTA, H. M. A. Helminths of white-bellied opossum from Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 2, p. 371–374. 1999.

SILVA; M. C.; BARROS; R. R.; GRAÇA, D. L. Outbreak of dictyocaulosis in cattle in Santa Maria, RS, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 629-632, 2005.

SIMÕES, R. O.; GENTILE, R.; RADEMAKER, V.; D'ANDREA, P. S.; HERRERA, H.; FREITAS, T.; LANFREDI, R.; MALDONADO JR., A. Variation in the helminth community structure of *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae) in two sub-regions of the Brazilian Pantanal: the effects of land use and seasonality. **Journal of Helminthology**, v. 84, p. 266 – 275, 2010.

SIMÕES, R. O.; GENTILE, R.; RADEMAKER, V.; D'ANDREA, P. S.; HERRERA, H.; FREITAS, T.; LANFREDI, R.; MALDONADO JR., A. Variation in the helminth community structure of *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae) in two sub-regions of the Brazilian Pantanal: the effects of land use and seasonality. **Journal of Helminthology**, v. 84, p. 266 – 275, 2010.

SIMÕES, R. O.; LUQUE, J. L.; GENTILE, R.; ROSA, M. C. S.; COSTA-NETO, S. F.; MALDONADO JR., A. Biotic and abiotic effects on the intestinal helminth community of the brown rat *Rattus norvegicus* from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 90, p. 21-27, 2016.

SIMÕES, R. O.; MALDONADO JR, A.; OLIFIERS, N.; GARCIA, J. S.; BERTOLINO, A. V.; LUQUE, J. L. A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban population of *Rattus norvegicus* in Brazil: the influences of seasonality and host features on the pattern of infection. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 100, p. 1-8, 2014.

SIMÕES, R. O.; MALDONADO JR., A.; LUQUE, J. L. Helminth communities in tree sympatric rodents from the Brazilian Atlantic Forest: contrasting biomass and numerical abundance. **Brazilian Journal Biology**, v. 72, p. 909-914, 2012.

SIMÕES, R. O.; MONTEIRO, F. A.; SÁNCHEZ, E.; THIENGO, S. C.; GARCIA, J. S.; COSTA-NETO, S. F.; MALDONADO JR., A.; LUQUE, J. L. Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1331-1333, 2011a.

SIMÕES, R. O.; SOUZA, J. R.; MALDONADO JR., A.; LUQUE, J. L. Variation in the helminth community structure of the sympatric sigmodontine rodents from the coastal

- Atlantic forest of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 85, p. 171-1788, 2011b.
- SKRJABIN, K. I. [Superfamily Rhopalidae Looss, 1899.] In: SKRJABIN, K. I. (ed.) [Trematodes of animals and man.] *Osnovy Trematodologii*. Volume 2, 1948; p. 307-315. (Em Russo)b.
- SKRJABIN, K. I. Keys to the trematodes of animals and mam. 3^a ed. Univer. 1964; XVI+351p.
- SKRJABIN, K. I.; SHIKHOBALOVA, N. P.; SCHULZ, R. S.; POPOVA, T. I.; BOEV, S. N.; DELYAMURE, S. L. **Key to Parasitic Nematodes**. Volume 3. Moscow Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR. 1952; 890p. (Translated for the National Science Foundation and the Department of Agriculture, Washington, D. C. by the Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1961).
- SKRJABIN, K.I. [Superfamily Fascioloidea Stiles et Goldberger, 1940]. In: SKRJABIN, K.I. (ed.) [Trematodes of animals and man.] *Osnovy Trematodologii*. volume 2, 1948; p. 12-128. (In Russian.)a.
- SMITH, J. N. M.; HELMANN, J. J. Population persistence in fragmented landscapes. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 9, p. 397-399, 2002.
- SMITHE, N. Relationships between fruiting seasons and seed dispersal methods in a neotropical forest. **American Naturalist**, v. 104, n. 935, p. 25-35, 1970.
- SOULÉ, M. E.; WILCOX, B. A. Conservation biology: Its scope and its challenge. In: SOULÉ M. E.; WILCOX, B. A. editor. *Conservation Biology: An Evolutionary – Ecological Perspective*. Sunderland, MA.: Sinauer Associates; 1980. p. 7-8.
- SOUTHWELL, T.; MACFIE, J. W. S. On a collection of Acanthocephala in the Liverpool School of Tropical Medicine. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 19, p. 141–184, 1925.
- STILES, C. W.; HASSALL, A. Notes on parasites. 48. Na inventory of the genera and subgenera of the trematode Family Fasciolidae. **Archives de Parasitologie**, v. 1, n. 1, p. 81-99, 1898.
- STREILEIN, K. E. **Behavior, ecology, and distribution of South American marsupials**, p. 231-272. In: M.A. MARES & H.H. GENOWAYS (Eds.). *Mammalian Biology in South America. The Pymaturing Symposia in Ecology* 6: 1982; 231-250p.
- SUZÁN, G.; GARCÍA-PENÁ, P. E.; CASTRO-ARELLANO, I.; RICO, O.; RUBIO, A. V.; TOLSÁ, M. J.; ROCHE, B.; HOSSEINI, P. R.; RIZZOLI, R.; MURRAY, K. A.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; VITTECOQ, M.; BAILLY, X.; AGUIRRE, A. A.; DASZAK, P.; PRIEUR-RICHARD, A. H.; MILLS, J. N.; GUÉGAN, J. F.

Metacomunity and phylogenetic structure determine wildlife and zoonotic infectious disease patterns in time and space. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 4, p. 865–873, 2015.

SWOFFORD, D. L. *PAUP**. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2002.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M.; BEDE, L. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695-700, 2005.

TECHNELYSIUM. Software for DNA Sequencing. *ChromasPro* [online]. South Brisbane: Technelysium Pty Ltd. [Internet]. [Local desconhecido]: [atualizado 2014. Jun 12; Citado 2014 Dec 17]. Disponível em: <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>.

THATCHER, V. E. Os Endoparasitos de Marsupiais Brasileiros. *In*: CÁCERES, N. C.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. **Os Marsupiais do Brasil**. 1 ed. Campo Grande, MS: UFMS Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2006. p. 53-68.

THATCHER, V. E. Os Endoparasitos de Marsupiais Brasileiros. *In*: CÁCERES, N. C.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. **Os Marsupiais do Brasil**. 1 ed. Campo Grande, MS: UFMS Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. p. 53-68; 2006.

THOMAS, F.; GUÉGAN, J. F.; RENAUD, F. **Ecology and Evolution of Parasitism**, Oxford Press, New York. U.S.A., 2009. 224p.

THOMAS, F.; RENAUD, F. GUÉGAN, J. F. **Parasitism and Ecosystems**, Oxford University Press, 2005, 221p.

Tokyo, Japan: Keigaku, 1971; I, 1-1074, II, 1-349p.

THUL, E.; DONALD, J.; FORRESTER, L.; ABERCROMBIES, C. Ecology of parasitic helminths of wood ducks, *Aix sponsa*, in the Atlantic Fly way. **The Helminthological Society of Washington**, v. 52, p. 297–310, 1985.

TORRES, E. J. L. **Nematóides parasitos de *Gracilinanus agilis* Burmeister, 1854 (Marsupialia: Didelphidae) marsupial do Pantanal Sul-Matogrossense e *Gracilinanus microtarsus* Wagner, 1842 (Marsupialia: Didelphidae) marsupial da Mata Atlântica**. 2007. 121f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Biofísica, Rio de Janeiro, 2007.

TORRES, E. J. L.; MALDONADO JR., A.; ANJOS, D. H. S.; SOUZA, W.; MIRANDA, K. Redescription of *Spirura guianensis* (Nematoda: Spiruridae) from a rare South American Gracile Opossum. **Acta Tropica**, v. 150, p. 87-93, 2015.

- TORRES, E. J. L.; MALDONADO JR., A.; LANFREDI, R. M. *Pterygodermatites (Paucipectines) jaegerskioldi* (Lent & Freitas, 1935) (Nematoda: Rictulariidae) From *Gracilinanus agilis* and *G. microtarsus* (marsupialia: Didelphidae) in Brazil Pantanal and Atlantic Forest by Lighty and scanning electron microscropy. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 274-279, 2007.
- TORRES, E. J. L.; MALDONADO JR., A.; LANFREDI, R. M. Spirurids from *Gracilinanus agilis* (Marsupialia: Didelphidae) in Brazilian Pantanal wetlands with a new species of *Physaloptera* (Nematoda: Spirurida). **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 87–92, 2009.
- TORRES, E. J. L.; SOUZA, W.; MIRANDA, K. Comparative analysis of *Trichuris muris* surface using conventional, low vacuum, environmental and field emission scanning electron microscopy. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 409–416, 2013.
- TRAVASSOS L. P. Un nouveau type Metastrongylidae. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie**, v. 93, n. 33, p. 1259-1262, 1925.
- TRAVASSOS, L. P. Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira. I. *Gigantorhynchus aurae* n.sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 5, n. 3, p. 252-255, 1913a.
- TRAVASSOS, L. P. Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira. VI Revisão dos acantocefalos brasileiros. Parte I. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 9, n. 1, p. 5-62, 1917.
- TRAVASSOS, L. P. **Revisão da família Trichostrongylidae Leiper, 1912**. Monografias do Instituto Oswaldo Cruz, 1937; 511p.
- TRAVASSOS, L. P. Revisão dos acantocefalos brasileiros. I. Fam. Gigantorhynchidae Hamann, 1892. (2ª Nota prévia). **Brazil Medico**, v. 29, n. 18, p. 137, 1915.
- TRAVASSOS, L. P. Sobre as espécies brasileiras da subfamília Heterakinae Railliet & Henry. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 5, n. 3, p. 271-318, 1913b.
- TRAVASSOS, L. P. Trematodeos novos. **Brazil Medico**, v. 30, n. 33, p. 257-258-314, 1916.
- TRAVASSOS, L. P.; FREITAS, J. F. T.; KOHN, A. "Trematódeos do Brasil". Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro. v. 54, p. 275, 1971.
- TRAVASSOS, L. P.; KOHN, A. Lista dos gêneros incluídos na superfamília Brachylaemoidea. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 64, n. 1, p. 11-33. 1966.

- TRAVASSOS, L. P.; KOHN, A. Notas sobre "Brachylaemoidea" (Trematoda). **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**. v. 8, n. 5, p. 45-48, 1964.
- TRAVASSOS, L. P.; FREITAS, J. F. T.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 67, n. 1, p. 1-886, 1969.
- TRAVERSA, D.; ROMANUCCI, M.; DI CESARE, A.; MALATESTA, D.; CASSINI, R.; IORIO, R.; SEGHETTI, M.; SALDA, L. D. Gross and histo-pathological changes associated with *Aelurostrongylus abstrusus* and *Troglostrongylus brevior* in a kitten. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p.158-162, 2014.
- TRIBE, C. J. **A mastofauna do Estado do Rio de Janeiro, com especial referência a ordem Polyprotodontia (Marsupiais)**. 1987. Dissertação de mestrado. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1987.
- TURNER, I. M. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. **Journal of Applied Ecology**, v. 33, n. 2, p. 200-209, 1996.
- VALENTIN, J. L. **Ecologia Numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos**. 2a ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2012. 154 p.
- VAN CLEAVE, H. J. A critical study of the Acanthocephala described and identified by Joseph Leidy. **Proceedings of The Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 76, p. 279–334, 1924.
- VERONESI, F.; TRAVERSA, D.; LEPRI, E.; MORGANTI, G.; VERCILLO, F.; GRELLI, D.; CASSINI, R.; MARANGI, M.; IORIO, R.; RAGNI, B.; DI CESARE, A. Occurrence of Lungworms in European wildcats (*Felis Silvestris Silvestris*) of central Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, n. 2, p. 270–278, 2016.
- VIANA, L. Tentativa de catalogação das espécies brasileiras de trematódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 17, n. 1, p. 95-227, 1924.
- VICENTE, J. J. Revisão da subfamília Aspidoderinae Skrjabin & Shikhobalova, 1947 (Nematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 64, n. 1, p. 131-161, 1966.
- VICENTE, J. J.; GOMES, D. C.; ARAUJO-FILHO, N. A. Alguns helmintos de marsupiais e roedores da Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 26, n. 00, p. 3-4, 1982.
- VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R. M. Nematoides do Brasil. Parte V: Nematoides de mamíferos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, s. 1, p. 452, 1997.
- VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; STEINDEL, M.; PADOVANI, C. R.; SCHLEMPER, JR. B. R. Contribuição ao conhecimento da fauna helmintológica de

mamíferos da Ilha de Santa Catarina, SC. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 27, p. 5-8, 1987.

VOSS, R. S.; JANSA, S. A. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 322, n. 30, p. 1-177, 2009.

WALKER, E.; WARNICK, F.; LANGE, K.; UIBLE, H.; HAMLET, S.; DAVIS, M.; WRIGHT, P. **Mammals of the world, vol. I**. The Johns Hopkins Press, Baltimore. 1964; 728p.

WINEGARDNER, A. K.; JONES, B. K.; Ng, I. S. Y.; SIQUEIRA, T.; COTTENIE, K. The terminology of metacommunity ecology. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 27, n. 5, p. 253-254, 2012.

WOOD, C. L.; JOHNSON, P. T. J. A world without parasites: exploring the hidden ecology of infection. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 13, n. 8, p. 425–434, 2015.

XAVIER, S. C. C.; BILAC, D.; DE ARAÚJO, V. A. L.; NETO, S. F. C.; LOROSA, E. S.; SILVA, L. F. C. F.; JANSEN, A. M. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, (Online), v. 8, n. 5, p. 1-9, 2014.

YAMAGUTI, S. **Synopsis of Digenetic Trematodes of vertebrates**. Vols. I and II.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**. Vol. I. The Digenetic Trematodes of vertebrates. Part I: 1 – 979. Part II: 980 – 1232. New York, Interscience Publishers Inc. 1958.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**. Vol. II. The Cestodes of vertebrates. Part I: 1 – 626. Part II: 769 – 860. New York, Interscience Publishers Inc. 1959.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**. Vol. III. The Nematodes of vertebrates. Part.I: 1-679. Part.II: 681-917. New York, Interscience Publishers Inc 1961.

ANEXOS



Research paper

Lungworm *Heterostrongylus heterostrongylus* Travassos, 1925 from the black-eared opossum in South America: Morphologic, histopathological and phylogenetic aspects



Sócrates Fraga da Costa Neto^{a,b}, Raquel de Oliveira Simões^b, Éster Maria Mota^c, Roberto do Val Vilela^b, Eduardo José Lopes Torres^d, Helene Santos Barbosa^e, Rosana Gentile^b, Arnaldo Maldonado Junior^{b,*}

^a Programa de Pós graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360, Brazil

^b Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360, Brazil

^c Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360, Brazil

^d Laboratório de Helminthologia Romero Lascasas Porto, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas – FCM, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Prof. Manoel de Abreu, 444, Edifício Piquet Carneiro, quinto andar, Rio de Janeiro, RJ, 20550170, Brazil

^e Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 June 2016

Received in revised form 8 August 2016

Accepted 25 August 2016

Keywords:

Angiostrongylidae

Didelphis aurita

Metastrongylids

Pathological cardiopulmonary parasitism

rRNA

ABSTRACT

Nematode parasites of the cardiopulmonary system of livestock and pet animals have been receiving attention due to the pathogenic effects they produce in the course of the infection. However, parasitism in wild animals by metastrongylid nematodes has been neglected, resulting in potential risk to wildlife. *Heterostrongylus heterostrongylus* is the etiological agent of bronchial pneumonia in the black-eared opossum, *Didelphis aurita*, a widely distributed marsupial frequently reported to inhabit areas from wild environments to peri-urban spaces. In this study, we reassessed the taxonomy of *H. heterostrongylus*, describing and comparing morphology of L₁ and L₃ larvae and adult worms with closely related angiostrongylids, and inferring phylogenetic affinities within the family Angiostrongylidae; we also detailed histopathological reactions under natural infection. Ultrastructural morphology and light microscopy confirmed cephalic structures with well-developed trilobed lips, patterns of caudal bursa rays, spicules shape, terminal anal aperture and presence of the ventral protuberance in L₃ larvae, characteristics present for the family Angiostrongylidae. Our molecular phylogenetic analyses, based on the partial small subunit (SSU) 18S rRNA gene, suggested that *H. heterostrongylus* and *Didelphostrongylus hayesi* are closely related. Pathological analyses agreed with previous findings, showing that cardiopulmonary parasitism provokes verminous pneumonia and mucous bronchiolitis with hypertrophy of the smooth bronchiolar muscle. These data confirmed that *H. heterostrongylus* represents a pulmonary pathogen in *D. aurita*, produces severe pathological effects, and may represent risk to domestic and wild animals.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Parasitic nematodes of the cardiopulmonary system of mammals generate interest among the scientific community and clinical veterinarians due to their severe pathological effects in livestock (Silva et al., 2005), pets (Traversa et al., 2014), wild (Veronesi et al.,

2016) and synanthropic animals (Simões et al., 2011). As examples, we can mention *Muellerius capillaris* and *Protostrongylus rufescens* which affect the respiratory tracts of goats and sheep (Berrag and Urquhart, 1996); *Aelurostrongylus abstrusus*, *Troglostrongylus* spp., and *Angiostrongylus chabaudi* which affect domestic cats and European wildcats (Brianti et al., 2012; Di Cesare et al., 2015); and *Angiostrongylus cantonensis* which affect *Rattus norvegicus* (Simões et al., 2014).

Although helminth infection may influence wild mammals' populations through a strong debilitating action promoted by pathological effects (Lamberski et al., 2002), little is known about

* Corresponding author.

E-mail addresses: maldonad@ioc.fiocruz.br,

arnaldomaldonadojunior@gmail.com (A. Maldonado Junior).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.018>

0304-4017/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

the consequences of parasitism by angiostrongylid infection in wild mammals. Regarding nematodes of the marsupial cardiopulmonary system, *Didelphostrongylus hayesi* (Prestwood, 1976) and *Heterostrongylus heterostrongylus* (Travassos, 1925) have been reported to parasitize *Didelphis marsupialis* and *D. aurita*, respectively. However, only *Didelphis virginiana* have had pathological alterations reported due to infection by *D. hayesi*, which include lung alterations and dissemination of inflammatory cell reactions (Prestwood et al., 1977).

Travassos (1925) described the lungworm *H. heterostrongylus* as a parasite nematode of the pulmonary system of the marsupial *D. aurita* in the state of Rio de Janeiro, Brazil, and assigned it to the family Metastrongylidae. Anderson et al. (1980) redescribed *H. heterostrongylus* and reassigned it to the family Angiostrongylidae based on lip morphology. Nevertheless, two main points persist regarding this helminth. The first is that it is necessary to settle diagnostic characters that led to the current classification. Second, there is a lack of understanding of the phylogenetic affinities of this nematode within the family Angiostrongylidae, particularly regarding its connection with *D. hayesi*.

In view of this, we herein detailed the morphology of *H. heterostrongylus* by scanning electron microscopy and light microscopy, and conducted molecular phylogenetic analyses in order to determine its relationships within the family Angiostrongylidae. Additionally, we reported pathological consequences of this helminth infection on naturally infected *D. aurita* opossums collected in an urban forest in the city of Rio de Janeiro, Brazil.

2. Material and methods

2.1. Study sites and habitat description

We captured opossums in the Campus Fiocruz Mata Atlântica (Atlantic Forest Fiocruz Campus: 22°56'S 43°24'W) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. This campus is located in the surroundings of the Parque Estadual da Pedra Branca (Pedra Branca State Park), which is the largest urban forest in Brazil. The studied area consists of a mosaic of different habitats including preserved and disturbed forests, and interface areas between wild environments and human dwellings in the urban perimeter.

2.2. Collection and examination of marsupials

Live-trapping occurred every four months between July 2012 and April 2014 in six transects with 20 points each, all representing different habitats as described above. At each point, we placed a Tomahawk® trap (16 × 5 × 5 inches) on the ground. Each trapping session lasted for five consecutive days.

Collected marsupials were anesthetized and euthanized in order to recover helminths and other samples. Voucher specimens were deposited in the scientific collection of the Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (National Museum, UFRJ). All procedures followed the guidelines for capture, handling, and care of the Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (Ethics Committee on Animal Use, Oswaldo Cruz Institute; CEUA-IOC licence number L-049/08 and LW81/12). Licenses for animal captures were granted by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation; ICMBio authorization number 13373) and by the Instituto Estadual do Ambiente (Environment Institute of the state of Rio de Janeiro; INEA – 020/2011) according to Brazilian regulations. Professionals were trained and proficient in biosafety practices and techniques, and had personal protective equipment during all procedures involving animal handling and biological

sampling in accordance with the Brazilian Ministry of Health recommendations (Lemos and D'Andrea, 2006).

2.3. Helminths recovery and morphological analyses

Abdominal and thoracic cavities of opossums were examined for the presence of helminths. Organs were separated in Petri dishes and dissected using a stereomicroscope to remove small helminths. Collected helminth specimens were washed twice in saline solution (0.9% sodium chloride in distilled water) in order to remove tissue debris. Part of the helminth samples were fixed in hot AFA (2% glacial acetic acid, 3% formaldehyde, and 95% ethanol) (Amato et al., 1991). Other samples were kept in 70% ethanol for molecular analyses. For light microscopy, we clarified ten male and ten female specimens in 80% phenol, set them on temporary slides, and examined the specimens using a Zeiss standard 20 light microscope. Voucher specimens of helminths were deposited at the Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (Helminthological Collection of the Oswaldo Cruz Institute), under number: CHIOC 38319.

We used two different preparation techniques for Scanning Electron Microscopy (SEM): 1. Helminths fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% freshly prepared formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer with pH 7.2, posteriorly washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), then post fixed for 2 h in 1% OsO₄ and 0.8% K₃Fe(CN)₆ pH 7.2, dehydrated in a graded ethanol series (20–100° GL) for 20 min each step, critical-point dried in CO₂, mounted on metallic stubs and coated with gold (20–25 nm deposited) (Lopes Torres et al., 2013); 2. Helminths fixed in AFA were washed in 0.1 mM Sodium cacodylate buffer (pH 7.4) three times for 15 min, and post fixed for 2 h in 1% OsO₄ and 0.8% K₃Fe(CN)₆ in the same buffer with pH 7.2, posteriorly washed three times for 15 min each time, dehydrated in an ascending ethanol series for 20 min each (30–100° GL), dried using the critical point method with liquid CO₂, mounted on aluminium stubs and coated with a 25-nm layer of gold (Mafra and Lanfredi, 1998). Specimens were examined using microscope model JEOL JSM-6390 at the Rudolf Barth Electron Microscopy Platform of the Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz at the Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz, PDTIS/FIOCRUZ (Electron Microscopy Platform of the Oswaldo Cruz Institute), and model JEOL JSM 5310 at the Electron Microscopy Platform CENABIO-UFRJ (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

2.4. Larvae recovery

L₁ larvae were obtained from faeces of naturally infected opossums according to the Baermann-Moraes technique (Baermann, 1917; Moraes, 1948). Posteriorly, *Biomphalaria glabrata* snails were individually exposed to 30 L₁ larvae overnight. Forty days after exposure, the snails were set in a 0.7% HCl solution for digestion for six hours in order to recover L₃ larvae, per Baermann (1917) and Moraes (1948) Moraes's (1948) methodology.

2.5. Histopathological analysis

Lung tissues were washed in saline solution, segmented, and fixed in Carson's Millonig formalin overnight. Posteriorly, the lung tissues were dehydrated in progressive concentrations of ethylic alcohol, diaphanized using xilol, and embedded in paraffin blocks to provide 5 μm serial sections. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and examined under a light microscope (Humason, 1979).

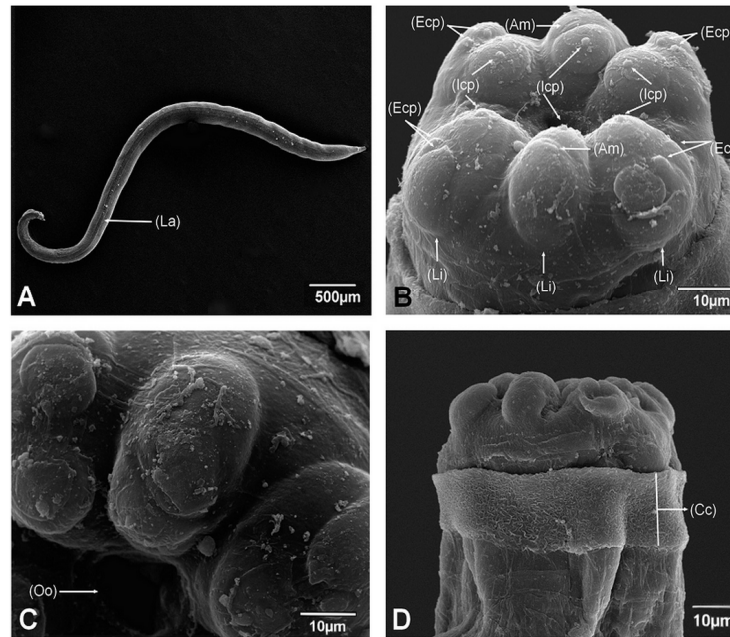


Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Female entire body showing lateral alae (La). (B) Male anterior end showing 6 developed lips (Li), 4 pairs of external cephalic papillae (Ecp), 6 internal papillae (lcp), and 2 amphids (Am). (C) Detail of oral opening (Oo). (D) Male anterior end, lateral view showing cephalic collar (Cc).

2.6. Molecular and phylogenetic analyses

Genomic DNA samples were isolated from six individual worms using the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit, according to the manufacturer's protocol.

DNA amplification by polymerase chain reaction was conducted using primers 47 forward (5'-CCCATTGATTCTGTCGGC) and 112 reverse (5'-GGTGCTGGCACCAGACTGC), and using 135 forward (5'-CGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGC) and 136 reverse (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACACTAC) to produce two overlapping amplicons of partial nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA (18S) gene (Carreno and Nadler, 2003).

Amplicons were cycle sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) on both strands with primers mentioned above, resulting in bi-directional sequencing for better accuracy of data. Sequencing was performed using the ABI 3730 DNA Analyzer. Both procedures and cycle-sequenced products precipitation were conducted at the Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz, PDTIS/FIOCRUZ (DNA Sequencing Platform of the Oswaldo Cruz Institute). Fragments were assembled into contigs and edited to ambiguities using the ChromasPro 1.5 software (TECHNELYS, 2016 Technelysium Pty Ltd.), resulting in a consensus sequence. The consensus sequence was deposited in the GenBank database under accession number: KX426262.

Consensus sequences were aligned with representatives' sequences from the family Angiostrongylidae obtained from Genbank (Table 1). As outgroups, we added sequences from *Ancylostoma caninum* and *Necator americanus*, also from Genbank (Table 1). We produced alignments for the 18S gene sequences using SILVA Incremental Aligner online software (SINA v1.2.11)

Table 1

Accession numbers of sequences retrieved from GenBank and hosts of parasites.

Nematode species	18S	Host
<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	AJ920366	<i>Felis catus</i>
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	AY295804	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Angiostrongylus costaricensis</i> 1	LK942974	<i>Sigmodon hispidus</i>
<i>Angiostrongylus costaricensis</i> 2	DQ116748	<i>Sigmodon hispidus</i>
<i>Angiostrongylus costaricensis</i> 3	EF514913	<i>Sigmodon hispidus</i>
<i>Angiostrongylus dujardini</i>	EF514915	<i>Myodes glareolus</i>
<i>Angiostrongylus malaysiensis</i>	EF514914	<i>Rattus tiomanicus</i>
<i>Angiostrongylus vasorum</i> 1	EF514916	<i>Vulpes vulpes</i>
<i>Angiostrongylus vasorum</i> 2	AJ920365	<i>Vulpes vulpes</i>
<i>Didelphostrongylus hayesi</i>	AY295806	<i>Didelphis virginiana</i>
<i>Heterostrongylus heterostrongylus</i>	KX426262	<i>Didelphis aurita</i>
<i>Ancylostoma caninum</i>	AJ920347	<i>Canis familiaris</i>
<i>Necator americanus</i>	AJ920348	<i>Homo sapiens</i>

(Pruesse et al., 2012). Resulting alignments were trimmed of poorly aligned regions using the Mesquite package software (Maddison and Maddison, 2015).

We used PAUP* Software version 4.0a147 (Swofford, 2002) to calculate pairwise distances corrected under the HKY + I maximum-likelihood model chosen by Bayesian information criterion (BIC) (Schwarz, 1978) and decision theory (DT) (Minin et al., 2003), selected using the same program.

We also used PAUP* Software to produce phylogenetic reconstructions using maximum parsimony (MP) as optimality criterion. Node support in MP trees was assessed by nonparametric bootstrap percentages (MP-BP), after 10,000 pseudoreplications.

Phylogenetic reconstructions using maximum likelihood (ML) as optimality criteria were carried out with Treefinder Software March 2011 version (Jobb, 2011). A nucleotide evolutionary model

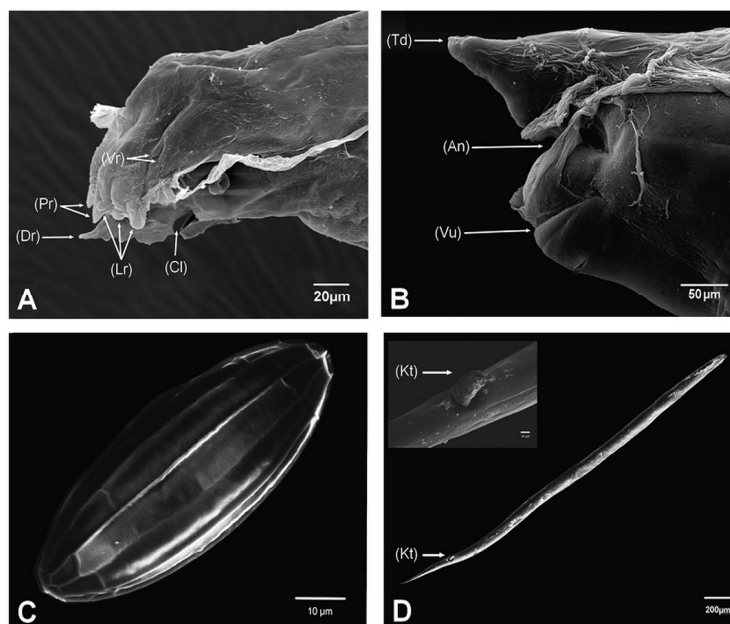


Fig. 2. Scanning electron microscopy of *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Male posterior end showing copulatory bursa with ventral rays (Vr), lateral rays (Lr), posterodorsal rays (Pr), dorsal ray (Dr), and cloaca (Cl). (B) Female posterior end showing vulva (Vu), anus (An), and tail digitiform (Td). (C) Eggs, elliptical shape, showing longitudinal ridges. (D) L_3 larvae in detail, showing ventral knob-like tip (Kt) at posterior end.

was chosen by BIC using the same software. Node support in ML trees was assessed by the expected-likelihood weights applied to local rearrangements of tree topology (LR-ELW) after 1000 replicates, and to nonparametric bootstrap percentages (ML-BP) after 1000 pseudoreplications.

Bayesian phylogenetic inference was carried out with the software MrBayes version 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) on XSEDE using the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). Bayesian analyses were performed using the GTR + I + Γ model. Markov chain Monte Carlo (MCMC) samplings were performed for 10,000,000 generations with four simultaneous chains in two runs. We assessed the robustness of nodes in Bayesian trees by Bayesian posterior probabilities (BPP) calculated from tree samples every 100 generations, after removal of a “burn-in” fraction of 25%. To assess the adequacy of our sampling, we used Tracer Software (Rambaut et al., 2014) to calculate the Effective Sample Sizes (ESS) of parameters. Values above 100 effectively independent samples were considered to be sufficient.

3. Results

3.1. Morphology by scanning electron and light microscopy

3.1.1. Description

Adult helminths exhibited sexual dimorphism. The female body was larger and more robust than the male, and both had a discrete longitudinal lateral line along the body (Fig. 1A). The anterior end had similar structures in both sexes, and an oral aperture bearing two robust trilobed labia, each lobe with one internal domed papillae. Additionally, there was one pair of papillae on the outside edge of the laterodorsal and latroventral lips. Amphids were externally

located to lateral papillae (Fig. 1B and Fig. 3A). The oral opening was circular and conspicuous. (Fig. 1C). The cephalic cuticle was folded, forming a cephalic collar (Fig. 1D). The copulatory bursa was rounded and robust with the right lobe visualized, showing the ventral, lateral, posterolateral, and dorsal rays on the margin (Fig. 2A and Fig. 3B). The female tail was digitiform with the vulva transversely situated with a prominent border and near the end of the body, and with the anus located in a transverse fissure at the posterior end (Fig. 2B and Fig. 3C). Elliptical eggs with a shell surface were ornamented by longitudinal ridges (Fig. 2C), embryonated eggs with a hyaline shell were seen under light microscope (Fig. 3D). Rhabditoid larvae were at first stage with a smooth cuticle. The total length was 201.5 μm and 16.4 μm wide. The oesophagus was 85 μm long. Excretory pore, nerve ring and genital primordium were not observed. The tail was curved, ending in a sharp point (Fig. 3D). The anus was 21 μm from the caudal extremity (Fig. 3D). Larvae were at third stage, filiform with smooth cuticle. Total length was 1010 μm and 54 μm wide (Fig. 2D). The oesophagus was 425 μm long. A rod-like structure was 0.7 μm long. The excretory pore was 143 μm from the anterior extremity. A nerve ring and genital primordium were not observed. A knob-like ventral protuberance was located 34 μm from the posterior extremity. The anus was 83 μm (Fig. 3E).

3.2. Histopathology

There was no change in the helminths morphology, even in recovered specimens associated with granuloma development on the lung. Bronchi congestion was observed with draining of a green catarrhal exudate and thickening of the parenchyma, showing multifocal haemorrhagic areas and suggesting lobular bronchop-

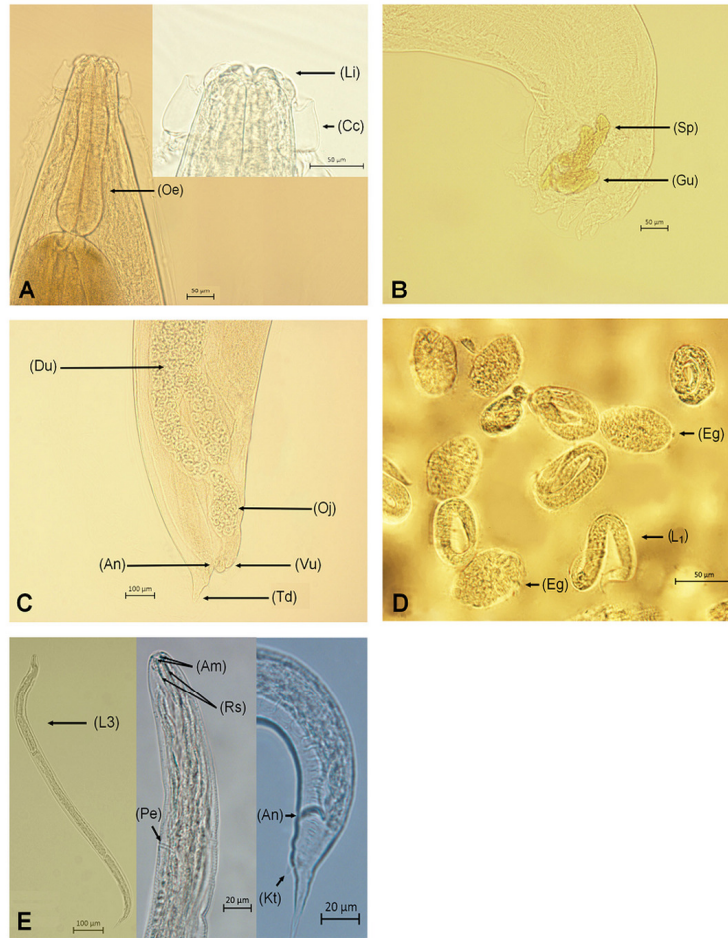


Fig. 3. Light microscopy of *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Male anterior end showing the oesophagus (Oe), and in detail, lips (Li) and cephalic collar (Cc). (B) Male posterior end, lateral view, showing gubernaculum (Gu) and spicules (Sp). (C) Female posterior end showing didelphis uterus (Du), ovejektor (Oj), vulva (Vu), anus (An), and tail digitiform (Td). (D) Eggs (Eg) and first larval-stage (L_1). (E) L_3 larvae anterior end showing pore excretory (Pe), amphids (Am), rod-like structure (Rs), and posterior end showing anus (An) and knob-like tip (Kt).

neumonia (Fig. 4A). The histopathology of the caudal lung lobe of the opossums revealed inflammatory infiltrates ranging from a subtle reaction process to severe responses, with massive occurrence of inflammatory cell infiltration (Figs. 4B and C), presence of giant cells of foreign body type, neutrophils, monocytes, macrophages, and predominantly, eosinophils in tissue lesions of the parenchyma. In addition, disruption of the muscle of the bronchi and extravasation of inflammatory cells into the lumen of the bronchus were observed, forming inflammatory cell clumps and mucous catarrhal exudate, coincident with the presence of adult helminths in the respiratory tract, resulting in partial occlusion of the bronchi (Figs. 4D and F). Adult helminths were found in the respiratory tract with preserved cuticle, mucus, and inflammatory cells inside their digestive tracts, suggesting that the helminths were ingesting these inflammatory cells (Figs. 4D–F). At the lumen of bronchioles, the first larval-stage (L_1) was associated with green catarrhal

exudate and with hyperplasia of the bronchial glands (Fig. 4F). The macroscopic aspect of the lungs revealed numerous coalescing areas, multifocal regions, and irregularities in the organ surface, indicating alterations in the entire lung tissue due to infection.

3.3. Molecular and phylogenetic analyses

We obtained six consensus 18S gene sequences from adult *H. heterostrongylus* recovered from different *D. aurita* specimens. After alignment and trimming of poorly aligned ends, all six 18S sequences of *H. heterostrongylus* were identical 1624 base pairs sequences, representing one single haplotype. We therefore used a single *H. heterostrongylus* 18S sequence.

The aligned matrix was comprised of 13 taxa and 1625 characters, including indels. 1511 characters were constant, 38

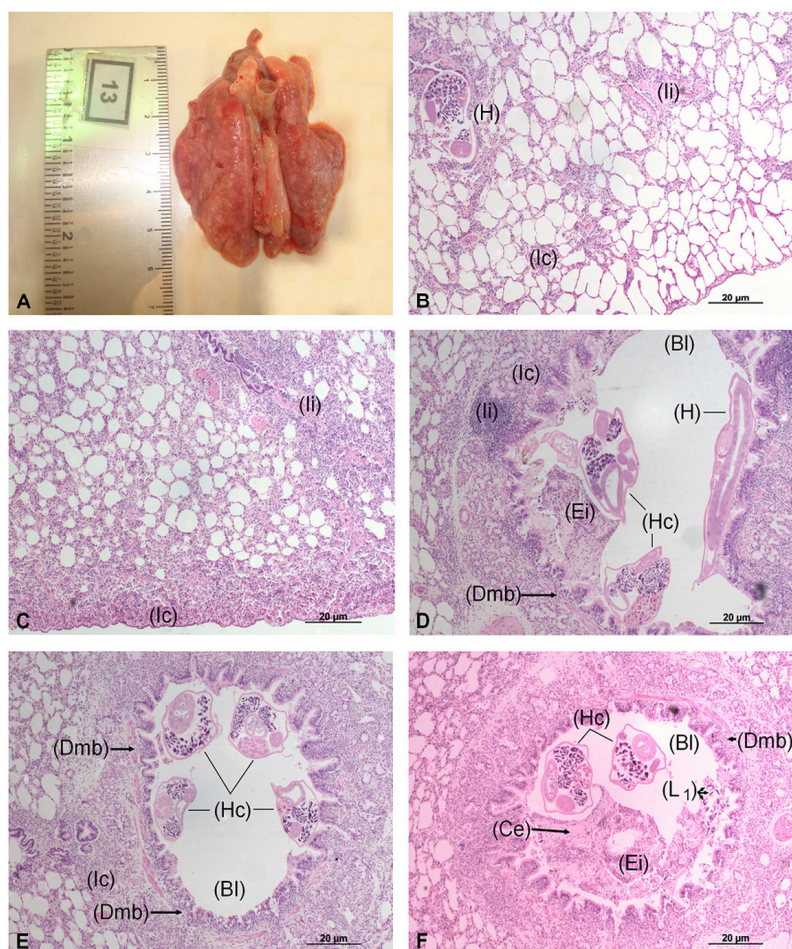


Fig. 4. Histopathology of the caudal lung lobe from *Didelphis aurita* naturally infected with *Heterostrongylus heterostrongylus*. (A) Macroscopic aspect of the lung with numerous coalescing areas, multifocal regions and irregularities in the organ surface. (B) Pulmonary parenchyma showing subtle reaction process with inflammatory cells (Ic), inflammatory infiltrates (Ii) and presence of helminth (H). (C) Severe responses with massive occurrence of inflammatory cells infiltration. (D) Disruption of the muscle of the bronchi (Dmb) with extravasation of inflammatory cells into bronchus lumen of the (Bl), presence of adult helminths with mucus and inflammatory cells inside their digestive tracts (Hc). (E) First larval-stage (L₁) associated with green catarrhal exudate (Ce) and with hyperplasia of the bronchial glands at the lumen of bronchioles. (F) Helminths within the bronchus lumen. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

variable characters were parsimony-uninformative, and 76 were parsimony-informative. Gaps were treated as "fifth base" in MP.

The best-fit model, chosen by BIC on Treefinder, for our 18S gene matrix was the HKY (Hasegawa et al., 1985) model of nucleotide substitution with optimized rate and frequency parameters, a discrete Gamma heterogeneity model with optimized α shape and five rate categories.

Tree topologies produced with different optimality criteria were identical, however with dissimilar node supports. The phylogenetic tree for Bayesian inference is shown in Fig. 5. ESSs for all parameters in our Bayesian analyses were above 100 effectively independent samples and for most parameters, ESSs were well above 200. We therefore considered our sampling to be sufficient.

Interspecific distances within *Angiostrongylus* ranged from 0.5% between *A. cantonensis* and *A. malaysiensis* to 1.3% between *A. malaysiensis* and *A. dujardini*. Intergeneric distances within Angiostrongylidae ranged from 2% between *Didelphostrongylus* and *Heterostrongylus*, 4.4% between *Aelurostrongylus* and *Heterostrongylus*, to 5.5% between *Aelurostrongylus* and *Didelphostrongylus*. Distances between *Heterostrongylus* and *Angiostrongylus* species sequences ranged from 2.5% to 3%.

Angiostrongylus, *Didelphostrongylus*, and *Heterostrongylus* 18S gene sequences formed a well-supported monophyletic group (MP-BP=90%, LR-ELW=86%, ML-BP=88%, BPP=100%), sister to *Aelurostrongylus abstrusus*, which was basal mostly to other angiostrongylids in all topologies.

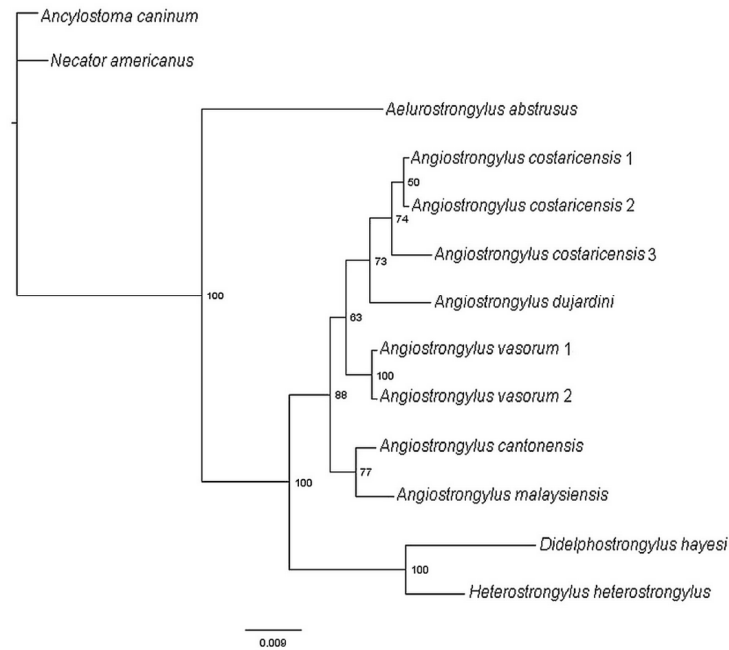


Fig. 5. Bayesian tree using 18S r DNA nucleotide gene. Values of Bayesian posterior probabilities are represented at the nodes.

Angiostrongylus species sequences formed a monophyletic group in all topologies, although weakly supported (MP-BP 61%, LR-ELW = 66%, ML-BP = 71%, BPP = 88%). *H. heterostrongylus* was sister to *D. hayesi* with strong support in all topologies (MP-BP = 100%, LR-ELW = 100%, ML-BP = 100%, BPP = 100%).

The sequences of *H. heterostrongylus* were monophyletic, and intraspecific distance values in 18S ranged from 1.7% between *H. heterostrongylus* and *D. hayesi*, to 3.7% between *H. heterostrongylus* and *Aelurostrongylus abstrusus*.

4. Discussion

In 1949, Dougherty divided the family Metastrongylidae into four subfamilies: Metastrongylinae, Filaroidinae, Pseudaliinae, and Protostrongylinae, placing *Metastrongylus* species and monospecific *Heterostrongylus* in the new subfamily Metastrongylinae due to the similarity of the well-developed labial structure. Further, Skrjabin et al. (2016) created the subfamily Heterostrongylinae for *Heterostrongylus* within the family Metastrongylidae. Later, Anderson (1978) transferred *H. heterostrongylus* to the family Angiostrongylidae, noting affinities between this genus and *D. hayesi*. Afterwards, Anderson et al. (1980) redescribed *H. heterostrongylus* and compared it under light microscopy with *D. hayesi*, distinguishing these species by differences in position of rays: *H. heterostrongylus* has robust rays in the caudal bursa, lateral rays independent of each other, and dorsal rays not bifurcated, whereas *D. hayesi* has bifid dorsal rays, more delicate and finger-like rays, ventral and lateral rays arising from common stalks, and a short and rounded tail in females. Moreover, Anderson et al. (1980) also observed in both species six well-developed lips and concluded that these structures are equivalent to the six oblong structures (perityls) found in many pulmonary helminths. Thus,

H. heterostrongylus and *D. hayesi* were assigned to the family Angiostrongylidae (Anderson et al., 2009).

Morphological characteristics observed in the present study confirm the similarity of the cephalic structures of *H. heterostrongylus*, with well-developed trilobed lips as described for *Metastrongylus* from the Metastrongylidae family. On the other hand, other morphological characters observed in *H. heterostrongylus*, such as the patterns of caudal bursa rays, shape of spicules, and position of the terminal anal aperture close to the vulva in females, place *H. heterostrongylus* within the family Angiostrongylidae.

The first and third larval-stages of *H. heterostrongylus* were morphologically similar to *D. hayesi*, *Angiostrongylus* spp., *Aelurostrongylus abstrusus*, *Troglostrongylus brevior*, and *T. subcrenatus* larvae (Brianti et al., 2012), having rod-like structures and knob-like tips common in Metastrongyloidea. However, *H. heterostrongylus* L₃ larvae had a ventral protuberance observed only in *Aelurostrongylus abstrusus*, a parasite of cats, also placed within Angiostrongylidae (Brianti et al., 2012). In contrast, it was distinguished from all others angiostrongylids by having larger body length.

This lungworm provokes verminous pneumonia and mucous bronchiolitis with hypertrophy of the smooth bronchiolar muscle. Thus, microscopic lesions produced by *H. heterostrongylus* were similar to those reported for *D. hayesi* (Prestwood et al., 1977; Duncan et al., 1989; Lamberski et al., 2002). However, the pulmonary lesions attributed to *H. heterostrongylus* were distinguished by the rupture of bronchi muscles and for its absence in the sub-pleura.

In the present study, we also conducted the first molecular data analyses on *H. heterostrongylus*, enhancing the dataset for helminth molecular identification. The largest ML-corrected pairwise genetic distances were between *D. hayesi* and the outgroup

sequences. These distances were 6.4%–6.7% larger than the second-largest distances 5.5% between *D. hayesi* and *A. abstrusus*, and larger than the distances between *H. heterostrongylus* and the outgroup sequences (4.9%). This indicates that although *D. hayesi* was sister to *H. heterostrongylus*, the former has apparently undergone higher evolutionary rates than any other angiostrongylid in our sample.

Intergeneric distance between *Didelphostrongylus* and *Heterostrongylus* was 2.0% larger than the largest interspecific distances within *Angiostrongylus* (0.5–1.3%), while the lowest distance between *Heterostrongylus* and *Angiostrongylus* species sequences was 2.5%. This corroborates the allocation of *Heterostrongylus* and *Didelphostrongylus* to different genera while demonstrating that they are closely related. Our 18S gene phylogenetic analyses agreed with these findings, recovering *Heterostrongylus* and *Didelphostrongylus* in a strongly supported monophyletic group.

Although we recovered *Aelurostrongylus*, *Angiostrongylus*, *Didelphostrongylus*, and *Heterostrongylus* forming a monophyletic group in our phylogenetic analyses, Eamsobhana et al. (2014) detected polyphyly for the family Angiostrongylidae in a study to determine phylogenetic relationships of *Angiostrongylus* species and other Metastrongyloidea taxa using 18S gene sequences. Furthermore, *Angiostrongylus* monophyly was only weakly supported in our analyses, suggesting that this genus may be polyphyletic as well. Additional studies which increase genera and genetic markers for Metastrongyloidea would be necessary in order to elucidate these questions on these groups.

In conclusion, the present study details some morphological characteristics of *H. heterostrongylus* using SEM and light microscopy and contributes new details on the anterior end of the adults, first and third larval-stages, and in the eggs. Also, pathologic changes associated with natural infection of the lungworm *H. heterostrongylus* in *D. aurita* opossum were described, suggesting the severity of the disease. Our new DNA data confirmed *H. heterostrongylus* affinities with *D. hayesi* and may be useful in future studies. Moreover, the natural life cycle of this parasite is unknown and the risk of transmission to domestic and wild animals should be considered, since *D. aurita* is commonly reported to inhabit the interface between wild environments and peri-urban areas due to anthropic activities, and to the rather generalist nature of this opossum.

Conflict of interest

The authors declare there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the students from Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos and Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatose em Focruz who helped in the field work; to Dr. Paulo D'Andrea for the ICMBio and INEA licences and for supporting the general project; to the coordinator of Campus Focruz Mata Atlântica, Gilson Antunes, for providing local facilities and supporting the general project; to the Office of Management, Fauna and Surveillance of Zoonosis in CFMA and Office of Survey and Monitoring of Biodiversity in CFMA; to Marcelo for helping in the field work in all campaigns; to Instituto Estadual do Meio Ambiente (INEA) for conceding the collecting licence and for local facilities. We also thank to the Genomic Platform-DNA Sequencing (PDTIS/FIOCRUZ), Rudolf Barth Electron Microscopy Platform (PDTIS/FIOCRUZ) and Electron Microscopy Platform CENABIO-UFRJ. S.F. Costa-Neto received grants from Coordenação

de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES. This Project was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (306352/2014-1), by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ (E-26/111, 296/2014), and by Instituto Oswaldo Cruz (Focruz).

References

- Amato, J.F.R., Walter, A.B., Amato, S.B., 1991. Protocolo para Laboratório. Coleta e Processamento de Parasitas do Pescado, 1 ed. Imprensa Universitária, UFRJ, Rio de Janeiro (81p.).
- Anderson, R.C., Little, M.D., Strelive, U.R., 1980. The unique lungworms (Nematoda metastrongyloidea) of the opossum (*Didelphis marsupialis* Linnaeus). *Syst. Parasitol.* 2, 1–8.
- Anderson, R.C., Chabaud, A.G., Willmott, S., 2009. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates, Archival Volume. CABI Publishing, Wallingford, UK (463p.).
- Anderson, R.C., Keys to genera of the superfamily Metastrongyloidea. Anderson, R.C., Chabaud, A.G., Willmott, S. (Eds.), *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*, 1978, p. 1–40.
- Baermann, G., 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum – (Nematoden) – Larven in Erdproben Mededel Mit H Geneesk. Laboratorium te Weltevreden Feestbundel, pp. 41–47.
- Berrag, B., Urquhart, G.M., 1996. Epidemiological aspects of lungworm infections of goats in Morocco. *Vet. Parasitol.* 61, 81–85.
- Brianti, E., Gaglio, G., Giannetto, S., Annoscia, G., Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Traversa, D., Otranto, D., 2012. *Troglostrongylus brevior* and *Troglostrongylus subcrenatus* (Strongyloidea: crenosomatidae) as agents of broncho-pulmonary infestation in domestic cats. *Parasites Vectors* 5, 1–12.
- Carreno, R.A., Nadler, S.A., 2003. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: strongyloidea) inferred from ribosomal RNA gene sequences. *J. Parasitol.* 89, 965–973.
- Di Cesare, A., Veronesi, F., Donato Traversa, D., 2015. Feild lungworms and heartworms in Italy: more questions than answers? *Trends Parasitol.* 31, 665–675.
- Duncan Jr, R.B., Reinemeyer, R.C., Funk, R.S., 1989. Fatal lungworm infection in an opossum. *J. Wildlife Dis.* 25, 266–269.
- Eamsobhana, P., Lim, P.E., Yong, H.S., 2014. Phylogenetics and systematics of *Angiostrongylus* lungworms and related taxa (Nematoda, Metastrongyloidea) inferred from the nuclear small subunit (SSU) ribosomal DNA sequences. *J. Helminthol.* 89, 317–325.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, K., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22, 160–174.
- Humason, G.L., 1979. *Animal Tissue Techniques*, 4. ed. W.H Freeman and Company, San Francisco, CA, USA (661p.).
- Jobb, G., 2011. Treefinder version of March 2011. Software distributed by the author. Available from: <http://www.treefinder.de>.
- Lamberski, N., Reader, J.R., Cook, L.F., Johnson, E.M., Baker, D.G., Lowenstine, L.J., 2002. A Retrospective study of 11 cases of lungworm (*Didelphostrongylus hayesi*) infection in opossums (*Didelphis virginiana*). *J. Zoo Wildl. Med.* 3, 151–156.
- Lemos, E.R.S., D'Andrea, P.S., et al., 2006. Trabalho com animais silvestres. In: Martins, E.V. (Ed.), *Biossegurança, Informação e Conceitos: textos básicos*. Focruz, Rio de Janeiro.
- Lopes Torres, E.J., Souza, W., Miranda, K., 2013. Comparative analysis of *Trichuris muris* surface using conventional, low vacuum, environmental and field emission scanning electron microscopy. *Vet. Parasitol.* 196, 409–416.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2015. Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis. Version 3.04. <http://mesquiteproject.org>.
- Mafra, A.C.A., Lanfredi, R.M., 1998. Reevaluation of *Physaloptera bispiculata* (Nematoda: spirurida) by light and scanning microscopy. *J. Parasitol.* 84, 582–588.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010.
- Minin, V., Abdo, Z., Joyce, P., Sullivan, J., 2003. Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation. *Syst. Biol.* 52, 674–683.
- Moraes, R.G., 1948. Contribuição para o estudo de: *Strongyloides stercoralis* e da *strongyloidiase* no Brasil. *Rev. Serv. Saúde Públ.* 1, 507–624.
- Prestwood, A.K., Nettles, V.F., Farrell, R.L., 1977. Pathologic manifestations of experimentally and naturally acquired lungworm infections in opossums. *Am. J. Vet. Res.* 38, 529–532.
- Prestwood, A.K., 1976. *Didelphostrongylus hayesi* gen. et sp. n. (Metastrongyloidea Filarioidea) from the Opossum, *Didelphis marsupialis*. *J. Parasitol.* 62, 272–275.
- Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28, 1823–1829.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J., 2014. Tracer v1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., Mark, P., Van Der, Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Schwarz, G., 1978. Estimation the dimension of a model. *Ann Stat.* 6, 461–464.

- Silva, M.C., Barros, R.R., Graça, D.L., 2005. Outbreak of dictyocaulosis in cattle in Santa Maria, RS, Brazil. *Cienc. Rural Santa Maria* 35, 629–632.
- Simões, R.O., Monteiro, F.A., Sánchez, E., Thiengo, S.C., Garcia, J.S., Costa-Neto, S.F., Maldonado Jr., A., Luque, J.L., 2011. Endemic Angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infect. Dis.* 17, 1331–1333.
- Simões, R.O., Maldonado, J.R.A., Olifiers, N., Garcia, J.S., Bertolino, A.V., Luque, J.L., 2014. A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban population of *Rattus norvegicus* in Brazil: the influences of seasonality and host features on the pattern of infection. *Parasites Vectors* 7, 100.
- Skrjabin, K. I.; Shikhobalova, N. P.; Schulz, R. S.; Popova, T. I.; Boev, S. N.; Delyamure, S. L. Key to parasitic nematodes. Vol. 3. Moscow Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR. 890 pp. (Translated for the National Science Foundation and the Department of Agriculture, Washington, D. C. by the Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1961.).
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TECHNELYSIUM. Software for DNA Sequencing. *ChromasPro* [online]. South Brisbane: Technelysium Pty Ltd. [cited 2014 Dec 17]. Available from: <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>.
- Travassos, L., 1925. Un nouveau type Metastrongylidae. *C. R. Séances Soc. Biol.* 93, 259–262.
- Traversa, D., Romanucci, M., Di Cesare, A., Malatesta, D., Cassini, R., Iorio, R., Seghetti, M., Salda, L.D., 2014. Gross and histo-pathological changes associated with *Aelurostrongylus abstrusus* and *Troglostrongylus brevior* in a kitten. *Vet. Parasitol.* 201, 158–162.
- Veronesi, F., Traversa, D., Lepri, E., Morganti, G., Vercillo, F., Grelli, D., CASSINI, R., Marangi, M., Iorio, R., Ragni, B., Di Cesare, A., 2016. Occurrence of Lungworms in European wildcats (*Felis silvestris silvestris*) of central Italy. *J. Wildl. Dis.* 52, 270–278.

**ECOLOGICAL ASPECTS OF NEMATODE PARASITES OF *Didelphis aurita*
(DIDELPHIMORPHIA, DIDELPHIDAE)
IN URBAN-SYLVATIC HABITATS IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL**

Raquel Gonzalez Boulosa Malheiro de Castro^{1,2}, *Sócrates Fraga da Costa Neto*^{1,2},
Arnaldo Maldonado Júnior^{1*} & *Rosana Gentile*¹

¹ Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 21040-360

² Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 21040-360

E-mails: raquel.castro@ioc.fiocruz.br, socrates@ioc.fiocruz.br, maldonad@ioc.fiocruz.br, rgentile@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT

Despite the widespread occurrence and the great number of studies of the common opossum *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae), there is a serious lack of information about helminth parasitism in these species. The synanthropic characteristic of these animals may influence their parasite fauna and the ecological parameters. We evaluated the abundance, intensity, prevalence and spatial aggregation of the most abundant nematodes of the large intestine and stomach, recovered from the common opossum *D. aurita*, in Pedra Branca State Park and its surroundings, which includes the FIOCRUZ Atlantic Forest Campus, Rio de Janeiro, Brazil. We investigated the effects of anthropic disturbances on the helminth populations comparing the parameters in relation to host habitat types, season and host gender in order to understand the ecological host-parasite interaction. The animals were sampled in three different habitats. We conducted eight small mammal samplings in different seasons and collected 48 individuals of the common opossum. The nematode species found in the large intestine were *Aspidodera raillieti* and *Cruzia tentaculata* while *Turgida turgida* was found in the stomach. *Cruzia tentaculata* was the species with the highest abundance, intensity and prevalence indices. The three species had a highly aggregated distribution. No species had significant difference in prevalence when compared with host habitat types, host gender or season. *Cruzia tentaculata* had higher intensity in the rainy season, which suggests that rainfall contributes to the development of the life cycle of this helminth. *Turgida turgida* had higher abundance in the disturbed forest habitat, suggesting that the presence of intermediate hosts may be favoured by the characteristics of this environment.

Keywords: Atlantic Forest; ecology; host-parasite interaction; marsupials; parasitism.

INTRODUCTION

The conservation of biological diversity is a global concern, especially because of the increasing disturbance caused by human activities in ecosystems' structure and function, which has consequently resulted in changes in the composition and abundance of species. Parasites are important organisms in ecosystems' dynamics, taking part in the regulation and structure of host populations. They play a key role in biodiversity by interfering in processes such as competition, migration, speciation and host reproduction (Combes 1996). Recent studies of the influence of parasites in complex systems have enhanced the understanding of the structure and dynamics of these

interactions (Poulin 2010, Poulin *et al.* 2013).

Among parasites, helminths have been widely used as indicators of environmental change (Gardner & Campbell 1992), which may alter the population parameters of the hosts, resulting in deleterious effects on their populations (Bush *et al.* 2001). Helminths are excellent models for studies of parasite-host interactions in natural and anthropogenic ecosystems (Simões *et al.* 2010, Cardoso *et al.* 2016) due to their great dispersal potential among species and environments, to their evolutionary history, and to their relatively short life cycles (Brandão 2007). Furthermore, seasonality can have a strong effect on helminths' abundance and intensity, and may determine their distribution. Extrinsic factors can favour the

survival of some life stages, especially for species whose eggs remain in the soil, subject to the influence of temperature, moisture or rainfall (Jiménez *et al.* 2011, Simões *et al.* 2016).

Many species of small mammals are known to act as natural reservoirs of parasites that affect humans. Opossums are noted for their high abundance, widespread occurrence and importance to public health because they are reservoirs of several zoonosis, such as trypanosomiasis (Lima *et al.* 2012), leishmaniasis (Xavier *et al.* 2014) and helminth infections, such as gnathostomiasis (Ruiz 1952) and lagochilascariasis (Artigas *et al.* 1968). The common black-eared opossum *Didelphis aurita* Wied, 1826, (Didelphimorphia, Didelphidae) occurs in the Atlantic Forest biome. It has a frugivorous/omnivorous feeding habit and can feed on items found in human garbage (Santori *et al.* 2012). These characteristics associated with its generalist use of the habitat (Fonseca 1989, Junior & Leite 2007) make this animal abundant, with high population densities, especially in areas close to human habitations (Gentile *et al.* 2000), making the common opossum a sylvatic - synanthropic animal.

The aim of this study was to analyse the parasitological parameters and the spatial aggregation of the most abundant nematodes of the large intestine and stomach of the opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Didelphimorphia, Didelphidae) in the Pedra Branca State Park (a forest reserve) and its surroundings. We compared the parameters in relation to habitats of the host with different levels of anthropic disturbance, season and host gender in order to understand the ecological host-parasite interactions. This study is part of a program on ecology and biodiversity of small mammal populations and communities and their parasites in the Pedra Branca Massif in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Study area

This study was carried out in areas of the FIOCRUZ Atlantic Forest Campus of the Oswaldo Cruz Foundation (Campus FIOCRUZ Mata Atlântica - CFMA) and areas of Pedra Branca State Park

(PBSP) in the city of Rio de Janeiro. The CFMA is inserted in an expanding urban region in the Jacarepaguá Basin and is part of the buffer zone of the Pedra Branca State Park, including preserved areas of the Park. This park is considered the largest forest reserve located within an urban environment in Brazil, covering a total area of 12,492 hectares with predominance of Ombrophilous Dense Atlantic Forest vegetation. The climate of the region is humid mesothermal with hot rainy summers and mild winters.

Samples were collected in transects within the CFMA and PBSP, in three different habitat types representing areas of: 1) sylvatic-urban interface near human dwellings (peridomicile) (22°56'18"S 43°24'11"W and 22°55'57"S 43°26'34"W), 2) disturbed forest areas (22°56'28"S 43°24'34"W and 22°24'45.5"S 43°24'45.6"W), and 3) preserved forest areas (22°56'47"S 43°25'07"W and 22°55'57"S 43°26'36"W). The peridomicile areas were in the backyards of houses and had sparse understory in most of the transects, canopy ranging from 6 to 15 meters, predominance of bushes and small trees, some flooded areas, and flat to moderate slope. The disturbed forest areas were in regeneration process with a vegetation in different ecological succession stages between the areas of human occupation and the preserved areas of the Park, presenting semi-open understory, medium vegetation height ranging from 6 to 20 meters, and flat slope. The preserved forest areas were within the limits of the preserved areas of the Park and had semi-open understory, tall vegetation with canopy ranging from 10 to 40 meters, and irregular slope varying from flat to steep.

Sampling Methods

Opossums were collected from July 2012 to April 2015 every four months (except in July 2014), representing dry, rainy and intermediate seasons. Captures were carried out along transects, two at each location. Sherman® and Tomahawk® traps were placed on the ground at each point baited with a mixture of banana, peanut butter, oats and bacon.

Adult animals were euthanized for recovery of helminths and other samples, and their bionomic data were recorded (age, gender, reproductive activity, body

mass and external measures). Young animals and females with pouch young, were marked with ear tags and released at their trapping points and were not included in the analyses. The ages of the animals were estimated based on dental development and body size according to Gentile *et al.* (1995). The skulls of the animals were deposited as voucher specimens in the zoological collection of the Rio de Janeiro National Museum.

Some of the nematode specimens were fixed at 65° AFA (70% ethanol - 0.4% formalin - 100% acetic acid ratios of 93:5:2) according to Amato *et al.* (1991), and some were stored in 70% ethanol for further molecular analysis. Specimens were counted using a stereoscopic microscope and identified using a Zeiss Standard 20 light microscope. The species were identified according to Yamaguti (1961) and Vicent *et al.* (1997). Voucher specimens were deposited in the helminthological collection of the Oswaldo Cruz Institute (CHIOC numbers: *Turgida turgida* n° 38321, *Aspidodera raillieti* n° 38322, *Cruzia tentaculata* n° 38323).

Animals were captured under authorization of the Brazilian Government's Chico Mendes Institute for Biodiversity and Conservation (ICMBIO, license number 13373) and the Environmental Institute of Rio de Janeiro State (INEA, license number 020/2011). All procedures followed the guidelines for capture, handling and care of animals of the Ethical Committee on Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA license number L-049/08 and LW-81/12 and LW - 39/14). Biosafety techniques and personal safety equipment were used during all procedures involving animal handling and biological sampling.

Data analysis

The parasitological parameters were calculated for each nematode species according to Combes (2001). Abundance was considered as the total number of nematodes of a species divided by the number of hosts analysed. Intensity was the total number of nematodes of a species divided by the number of animals infected by the species. Prevalence was the ratio between the number of infected animals and the total number of animals analysed. The spatial

aggregation level was calculated using the variance to mean ratio of the number of helminths per host. Nematode sex ratios were compared using the chi-square test.

Abundances, intensities and prevalences were compared in relation to habitat type where the host was captured, host gender and season for each nematode species. Prevalence rates were compared using the chi-square contingency test. Intensities and abundances were compared using generalized linear models (GLM), where the best models (models with $\Delta AICc$ less than two) were chosen using the corrected Akaike information criterion (AICc). The chi-square tests were performed using the Past Software version 3.09 (Hammer *et al.* 2001) and the analysis of GLM with PASW statistical software version 18 (SPSS Inc. 2009). The significance level used was of 5% in all the analyses.

RESULTS

Forty-eight specimens of opossums were collected, 22 in the peridomicile, 15 in the disturbed forest areas and 11 in the preserved forest areas. We found helminths species belonging to the three phyla; however, we used only three nematodes as target species to analyse the ecological effects on its populations due to their high abundance. *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1919 (Physalopteridae, Railliet, 1893 subfam.) Leiper, 1908 was found in the stomach; and *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1922 (Kathlaniidae, Travassos, 1918) and *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913 (Aspidoderidae, Freitas, 1956) were found in the large intestine. Forty-five percent of the opossums were infected with the three helminths analysed. We recovered a total of 319 adult worms of *T. turgida*, 3681 of *C. tentaculata*, and 966 of *A. raillieti*.

Sex ratio in *T. turgida* did not differ from 1:1 ($\chi^2=0.127$ and $p=0.722$). *Cruzia tentaculata* and *A. raillieti* had significantly more females than males ($\chi^2=51.39$ and $p=0.0$; $\chi^2=21.35$ and $p=0.0$, respectively). *C. tentaculata* was the most abundant and prevalent species (Table 1). All species had high overall aggregation indices and when considering the infrapopulations within each habitat type, host gender

or season (Table 1). No species had significant difference in prevalence when compared among host habitat types, host gender or season ($p > 0.05$ in all cases) (Table 1).

Intensity was different among variables in *C. tentaculata* (Table 2). The best model obtained in the GLM analysis included only the season, showing that the species had higher intensity during the rainy

season (Table 2). In *T. turgida* and *A. raillieti* the best models in the analyses were the null models (without variables). However, in *T. turgida* three models were plausible, indicating that habitat, which was present in two of these three models, may also be an important variable related to intensity, which was higher in the hosts of the disturbed forest areas (Table 2).

Table 1. Abundance and intensity (\pm SD), prevalence (95% confidence interval) and aggregation indices in relation to the habitat type, host gender and season for three nematode species (*T. turgida*, *C. tentaculata*, *A. raillieti*) recovered from *Didelphis aurita* in Pedra Branca State Park and surroundings, Rio de Janeiro, Brazil.

	<i>Turgida turgida</i>	<i>Cruzia tentaculata</i>	<i>Aspidodera raillieti</i>
Abundance	6.64 \pm 7.66	76.68 \pm 128.23	20.12 \pm 36.48
Peridomicile	4.04 \pm 7.05	80.18 \pm 118.99	15.50 \pm 29.88
Disturbed Forest	10.06 \pm 8.19	111.20 \pm 171.36	22.20 \pm 45.26
Preserved Forest	7.18 \pm 6.05	22.63 \pm 34.54	26.50 \pm 37.69
Male	6.51 \pm 7.19	80.92 \pm 135.48	20.29 \pm 38.06
Female	7.42 \pm 10.73	51.85 \pm 75.56	19.14 \pm 27.71
Dry Season	6.04 \pm 6.46	69.58 \pm 104.5	21.83 \pm 34.71
Rainy Season	6.90 \pm 9.26	148.00 \pm 212.27	31.20 \pm 54.02
Intermediate Season	7.50 \pm 8.75	37.92 \pm 56.96	9.28 \pm 21.19
Intensity	9.38 \pm 7.48	99.48 \pm 137.4	34.50 \pm 42
Peridomicile	6.35 \pm 7.48	103.76 \pm 116.23	26.20 \pm 34.59
Disturbed Forest	12.58 \pm 7.28	139.00 \pm 182	41.60 \pm 56.03
Preserved Forest	9.80 \pm 5.62	31.12 \pm 37.45	41.70 \pm 40.37
Male	9.20 \pm 6.89	103.68 \pm 145.82	34.66 \pm 45.29
Female	10.40 \pm 11.11	72.60 \pm 78.63	33.50 \pm 29.25
Dry Season	8.05 \pm 6.16	75.90 \pm 107.02	30.82 \pm 37.82
Rainy Season	9.85 \pm 9.44	246.6 \pm 227.65	52.00 \pm 62.89
Intermediate Season	11.66 \pm 8.58	59.00 \pm 61.80	26.00 \pm 28.19
Prevalence	70.83 (70.77-70.89)	77.08 (75.92-78.24)	58.33 (58.00-58.66)
Peridomicile	63.63 (63.54-63.72)	77.27 (75.68-78.86)	59.09 (58.70-59.48)
Disturbed Forest	80.00 (79.87-80.13)	80.00 (77.23-82.77)	53.30 (52.57-54.03)
Preserved Forest	72.72 (72.61-75.83)	72.72 (72.07-73.37)	63.60 (62.89-64.31)
Male	70.73 (70.66-70.80)	78.04 (76.72-79.36)	58.53 (58.16-58.90)
Female	71.42 (71.17-71.67)	71.42 (69.63-73.21)	57.14 (56.49-57.79)
Dry Season	75.00 (74.92-75.08)	91.66 (90.33-92.99)	70.83 (70.39-71.27)
Rainy Season	70.00 (69.82-70.18)	60.00 (55.80-64.20)	60.00 (58.93-61.07)
Intermediate Season	9.00 (8.86-9.14)	64.28 (63.33-65.23)	35.71 (35.36-36.06)
Aggregation Indices	6.31	192.97	52.6
Peridomicile	10.69	154.56	48.64
Disturbed Forest	4.12	239.21	76.63
Preserved Forest	3.57	45.07	38.08
Male	5.29	204.28	57.82
Female	14.01	95.91	29.66
Dry Season	3.95	151.29	46.86
Rainy Season	10.50	209.88	76.06
Intermediate Season	7.63	67.06	36.15

Table 2. Generalized Linear Models (GLM) for nematode intensities (*T. turgida*, *C. tentaculata* and *A. raillieti*), recovered from *Didelphis aurita* in areas of Pedra Branca State Park and surroundings, Rio de Janeiro, Brazil.

Species	Model	AICc	ΔAICc	WAICc
<i>Turgida turgida</i>	Null	238.619	0	5.95
	Habitat	238.896	0.277	5.18
	Host gender+Habitat	240.133	1.514	2.79
	Host gender	240.926	2.307	1.88
	Season	242.186	3.567	1.17
	Habitat+Season	242.492	3.873	3.41
	Host gender+Season	244.945	6.326	1.10
	Host gender +Habitat+ Season	245.137	6.518	0.01
<i>Cruzia tentaculata</i>	Season	468.446	0	24.63
	Host gender+Season	471.110	2.664	6.50
	Habitat+Season	472.482	4.036	3.27
	Null	473.120	4.674	2.38
	Habitat	474.854	6.408	1.23
	Host gender	475.269	6.823	1.15
	Host gender +Habitat+ Season	475.542	7.096	2.58
	Host gender+Habitat	477.436	8.990	0.01
<i>Aspidodera raillieti</i>	Null	293.072	0	29.11
	Host gender	295.589	2.517	8.27
	Season	296.910	3.838	4.27
	Habitat	297.368	4.296	3.40
	Host gender+Season	299.814	6.742	1.29
	Host gender+Habitat	300.322	7.250	1.50
	Habitat+Season	301.127	8.055	3.99
	Host gender +Habitat+ Season	303.895	10.823	0.00

Turgida turgida had higher abundances in hosts captured in the disturbed forest areas, with the best model including only host habitat (Table 3). Nevertheless, the null model and the model including host habitat and host gender were also plausible. *C. tentaculata* showed higher abundance during the rainy season, with the best model including only season, but the null model and the model including habitat were also plausible (Table 3). In *A. raillieti*, the only plausible model was the null model (Table 3), indicating no relation between abundance and the variables analysed. In all the analyses, the model effects were significant.

DISCUSSION

In parasites, female-biased sex ratios can increase the probability of mating in polygamous mating systems (Poulin 2007). The observation of a larger number of females in relation to males observed for

C. tentaculata and *A. raillieti*, which is the most common pattern in the sex ratio of nematodes, can be attributed to an ecological reproductive strategy, where an increase in egg output enhances the chances of the parasite infecting the host, and consequently, maintaining the life cycle. In counterpart, the 1:1 ratio observed for *T. turgida* can be attributed to the fact that males and females of this species spend much time adhered to each other during the reproductive phase because of the adhesive secretion produced by the prostate glands (Oliveira-Menezes *et al* 2011). Antunes (2005) also observed a 1:1 sex ratio in *T. turgida* and more females in *C. tentaculata*, agreeing with the present study; however, she observed more males in *A. raillieti*, but did not mention their mating system. Although there is a lack of information concerning the mating system of these species, we suggest that *C. tentaculata* and *A. raillieti* may have shown a polygamous behaviour in this study, which was not clearly observed for *T. turgida*.

Table 3. Generalized Linear Models (GLM) for the nematode abundances (*T. turgida*, *C. tentaculata* and *A. raillieti*) recovered from *Didelphis aurita* in areas of the Pedra Branca State Park and surroundings, Rio de Janeiro, Brazil.

Species	Model	AICc	ΔAICc	WAICc
<i>Turgida turgida</i>	Habitat	334.876	0	10.90
	Null	336.121	1.245	5.85
	Host gender+Habitat	336.659	1.783	4.47
	Host gender	338.315	3.439	1.95
	Habitat+Season	339.654	4.778	1.49
	Season	340.451	5.575	2.15
	Host gender+Habitat+Season	341.978	7.102	1.61
	Host gender+Season	342.929	8.053	0.01
<i>Cruzia tentaculata</i>	Season	605.316	0	3.46
	Null	605.424	0.108	3.28
	Habitat	606.857	1.541	1.60
	Host gender	607.387	2.071	0.62
	Host gender+Season	607.800	2.484	2.14
	Habitat+Season	609.317	4.001	0.90
	Host gender+Habitat	609.110	3.794	4.35
	Host gender+Habitat+Season	612.051	6.735	0.01
<i>Aspidodera raillieti</i>	Null	485.083	0	8.11
	Host gender	487.356	2.273	2.60
	Season	487.451	2.368	2.48
	Habitat	488.987	3.904	1.15
	Habitat+Season	489.269	4.186	1.21
	Host gender+Season	489.642	4.559	1.11
	Host gender+Habitat+Season	489.846	4.763	2.26
	Host gender+Habitat	491.477	6.394	0.02

The rainy season seemed to promote an increase in the intensity of *C. tentaculata* in the opossums and, less evidently, in abundance. This result may be related to the life cycle characteristics of this helminth. *C. tentaculata* has a direct life cycle, so that embryonated eggs remain latent in the soil until they are ingested by the host (Jiménez *et al.* 2011). During such periods, soil temperature and moisture must be constant and adequate for the eggs remain infective (Anderson 2000). Thus, drought periods can impair the development of the free-living stages of this species in the environment. The same might apply to *A. raillieti*, because this species also has a direct life cycle (Anderson 2000, Jiménez *et al.* 2011), and also showed greater abundance and intensity during the rainy season. However, the modelling results for this species did not indicate season as a significant variable, so further investigation is needed. Although *C. tentaculata* and *A. raillieti* occur in the same microhabitat, the large intestine, we did not observe any association (positive or negative) between them

(unpublished data of the laboratory), indicating no evidence of competition or synergism between these species in this study.

The greater abundance and intensity of *T. turgida* in opossums of the disturbed forest area can be explained by the ecological characteristics of this area. The vegetation of these areas presents different stages of ecological succession, and is close to human dwellings as well as to the more preserved forest. These features could provide a larger abundance of the intermediate hosts of this nematode, which are possibly arthropods. These constitute one of the main items of the opossum diet (Santori *et al.* 2012), causing infection by ingesting the nematode eggs or larvae. *T. turgida* has a heteroxenous life cycle, where the arthropods, which are present in the opossum diet, may act as intermediate hosts when infected with the nematode larvae (Anderson 2000, Jiménez *et al.* 2011, Acosta-Virgem *et al.* 2015). Thus, the generalist and synanthropic characteristics of the opossum may have favoured the transmission of this helminth.

Most studies of parasitism have only investigated the occurrence of parasite species in the hosts. The scarcity of parasitological studies of small mammal host with ecological focus, especially in Brazil, reinforces the importance of the present report and the need for further studies on this topic. Ecological approaches have a key role in the understanding of host-parasite interactions, and thus understanding the functional importance of parasites in the stability of ecosystems (Lebarbenchon *et al.* 2009). Parasites can also be considered as biological parameters in biodiversity conservation programs (Poulin 1999). The present report is a preliminary study and the first to evaluate parasitism by nematodes in small mammals in the sylvatic-urban interface of the largest urban forest in Brazil, Pedra Branca State Park. We concluded that the host's behaviour might be an important characteristic for the maintenance of these parasites' life cycles in the different environments. There was no clear evidence that *A. raillieti* was affected by habitat type of the hosts' captures, season or host gender. Rainfall seems to facilitate the life cycle development of the nematode *C. tentaculata*. *T. turgida* seems to be favoured by characteristics of more heterogeneous areas within the interface of the sylvatic-urban environment, which may enable the occurrence of its intermediate hosts.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the staff and students of Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos and Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatose zoonose from Fiocruz who helped in the field work; to Dr. Paulo D'Andrea for the ICMBio and INEA licences and for supporting the general project; to the coordinator of Fiocruz Atlantic Forest Campus, Gilson Antunes, for providing local facilities and supporting the general project; to the equip of Fiocruz Atlantic Forest Campus, especially to Marta L. Brandão and José L. P. Cordeiro for local facilities and help in the field work; to Marcelo F. Freitas for helping in the field work in all campaigns; to Instituto Estadual do Meio Ambiente (INEA) for the collecting licence and for local facilities. This project was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (306352/2014-1), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ (E-26/111.296/2014), and Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). RGBMC received grants from CNPq and SFCN from CAPES.

REFERENCES

Acosta-Virgem, K., López-Caballero, Jorge, García-Pietro, L., & Mata-López, R. 2015. Helminths of three species of opossums

- (Mammalia, Didelphidae) from Mexico. *ZooKeys*, 511, 131-152. DOI: 10.3897/zookeys.511.9571
- Amato, J. F. R., Boeger, W. A., & Amato, S. B. (Eds.). 1991. Protocolo para laboratório - coleta e processamento de parasitas do pescado. Rio de Janeiro: Imprensa Universitária, UFRRJ: p. 81.
- Anderson, R. C. 2000. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2nd ed. Wallingford, OXON: CAB International: p. 650. DOI: 10.1079/9780851994215.0000
- Antunes, G. M. 2005. Diversidade e potencial zoonótico de parasitos de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia, Didelphidae). Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 122.
- Artigas, P. T., Araujo, P., Romiti, N., & Ruivo, M. 1968. Sobre um caso de parasitismo humano por *Lagochilascaris minor* Leiper 1902, no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 10(2), 78-83.
- Brandão, M. L. 2007. Helminths de mamíferos da região do Parque Nacional Serra da Capivara, Sudeste do Piauí: diversidade e influências antrópicas. Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz. p. 165. Retrieved from <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/5237>
- Bush, A. O., Fernández, J. C., Esch, G. W., & Seed, J. R. 2001. Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites. 1st ed. New York, NY: Cambridge University Press: p. 580.
- Cardoso, T. S., Simões, R. O., Luque, J. L. F., Maldonado, A., & Gentile, R. 2016. The influence of habitat fragmentation on helminth communities in rodent populations from a Brazilian Mountain Atlantic Forest. *Journal of Helminthology*, 90(4), 460-468. DOI: 10.1017/S0022149X15000589
- Combes, C. 1996. Parasites, biodiversity and ecosystem stability. *Biodiversity and Conservation*, 5(8), 953-962. DOI: 10.1007/BF00054413
- Combes, C. 2001. Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions. 1st ed. Chicago, IL: University of Chicago Press: p. 552.
- Fonseca, G. A. B. 1989. Small mammal species diversity in Brazilian tropical primary and secondary forest of different sizes. *Revista Brasileira de Zoologia*, 6(3), 381-422. DOI: 10.1590/S0101-81751989000300001
- Gardner, S. L., & Campbell, M. L. 1992. Parasites as probes for biodiversity. *Journal of Parasitology*, 78(4), 596-600. DOI: 10.2307/3283534
- Gentile, R., D'Andrea, P. S., Cerqueira, R., & Maroja, L. S. 2000. Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Studies on Neotropical Fauna & Environment*, 35(1), 1-9.
- Gentile, R., D'Andrea, P. S., & Cerqueira, R. 1995. Age structure of two marsupials in a Brazilian Restinga. *Journal of Tropical Ecology*, 11(4), 679-682. DOI: 10.1017/S0266467400009226
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1-9.
- Jiménez, F. A., Catzeffis, F., & Gardner, S. L. 2011. Structure of parasite component communities of didelphid marsupials: insight from a comparative study. *Journal of Parasitology*, 97(5), 779-787. DOI: 10.1645/GE-2711.1

- Junior, V. C., & Leite, Y. L. R. 2007. Uso de habitats por pequenos mamíferos no Parque Estadual da Fonte Grande Vitória, Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 21, 57-77.
- Lebarbenchon, C., Poulin, R., & Thomas, F. 2009. Parasitism, biodiversity, and conservation biology. In: F. Thomas, J.-F. Guégan & F. Renaud (Eds.), *Ecology & evolution of parasitism*. pp. 149-160. Oxford: Oxford University Press.
- Lima, M. M., Sarquis, O., Oliveira, T. G., Gomes, T. F., Coutinho, C., Daflon-Teixeira, N. F., Toma, H. K., Britto, C., Teixeira, B. R., D'Andrea, P. S., Jansen, A. M., Bóia, M. N., & Carvalho-Costa, F. A. 2012. Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(3), 143-149. DOI: 10.1016/j.trstmh.2011.10.013
- Oliveira-Menezes, A., Lanfredi-Rangel, A., & Lanfredi, R. M. 2011. The first description of eggs in the male reproductive system of *Physaloptera bispiculata* (Nematoda: Spiruroidea). *Journal of Helminthology*, 85(2), 142-145. DOI: 10.1017/S0022149X10000374
- Poulin, R. 1999. The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels? *International Journal for Parasitology*, 29(6), 903-914. DOI: 10.1016/S0020-7519(99)00045-4
- Poulin, R. 2007. *Evolutionary ecology of parasites*. 2nd ed. Princeton: Princeton University Press: p. 332.
- Poulin, R. 2010. Network analysis shining light on parasite ecology and evolution. *Trends in Parasitology*, 26(10), 492-498. DOI: 10.1016/j.pt.2010.05.008
- Poulin, R., Krasnov, B. R., Pilosof, S., & Thieltges, D. W. 2013. Phylogeny determines the role of helminth parasites in intertidal food webs. *Journal of Animal Ecology*, 82(6), 1265-1275. DOI: 10.1111/1365-2656.12101
- Ruiz, J. M. 1952. Sobre um novo *Gnathostoma* assinalado no Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*, 24(1), 37-44.
- Santori, R. T., Lessa, L. G., & Astúa, M. D. 2012. Alimentação, nutrição e adaptações alimentares de marsupiais brasileiros. In: N. C. Cáceres (Ed.), *Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e conservação*. pp. 383-404. Campo Grande: UFMS.
- Simões, R., Gentile, R., Rademaker, V., D'Andrea, P. S., Herrera, H., Freitas, T., Lanfredi, R., & Maldonado Jr., A. 2010. Variation in the helminth community structure of *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae) in two sub-regions of the Brazilian Pantanal: the effects of land use and seasonality. *Journal of Helminthology*, 84(3), 266-275. DOI: 10.1017/S0022149X09990629
- Simões, R. O., Luque, J. L., Gentile, R., Rosa, M. C. S., Costa-Neto, S., & Maldonado Jr., A. 2016. Biotic and abiotic effects on the intestinal helminth community of the brown rat *Rattus norvegicus* from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Helminthology*, 90(1), 21-27. DOI: 10.1017/S0022149X14000704
- SPSS Inc. 2009. *PASW Statistics for Windows, Version 18.0*. Chicago: SPSS Inc.
- Vicente, J. J., Rodrigues, H. O., Gomes, D. C., & Pinto, R. M. 1997. Nematóides do Brasil. Parte V: nematóides de mamíferos. *Revista Brasileira de Zoologia*, 14(1), 1-452. DOI: 10.1590/S0101-81751997000500001
- Yamaguti, S. (Ed.). 1961. *Sistema helminthum: nematodes of vertebrates parts I and II, vol. 3*. New York: Interscience Publishing, Inc.: p. 1261.
- Xavier, S. C. C., Roque, A. L. R., Bilac, D., De Araújo, V. A. L., Costa-Neto, S. F., Lorosa, E. S., Silva, L. F. C. F., & Jansen, A. M. 2014. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases (Online)*, 8(5), e2878. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002878

Submitted: May 25, 2016
Accepted: September 7, 2016



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" *Ecologia de população de pequenos mamíferos reservatórios em Jacarepaguá, RJ.* "

número P-473/08, proposto por Rosana Gentile, foi licenciado pelo N° L-066/08.

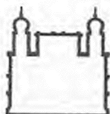
Sua licença de N° L-066/08 autoriza o uso anual de :

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| - 320 <i>Akodon cursor</i> | - 320 <i>Oligoryzomys nigripes</i> |
| - 320 <i>Sooretamys angoya</i> | - 320 <i>Trinomys sp</i> |
| - 320 <i>Didelphis aurita</i> | - 320 <i>Philander frenatus</i> |
| - 320 <i>Metachirus nudicaudatus</i> | - 320 <i>Gracilinanus microtarsus</i> |
| - 320 <i>Micoureus demerarae</i> | - 320 <i>Monodelphis americana</i> |

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 3 de novembro de 2012.

Rio de Janeiro, 21/11/2008

Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

1

LICENÇA

LW-81/12

Certificamos que o protocolo (P-42/12.1), intitulado "DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR TRIPANOSOMATÍDEOS EM MAMÍFEROS POTENCIAIS RESERVATÓRIOS NO BRASIL.", sob a responsabilidade de ANDRE LUIZ RODRIGUES ROQUE, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 26/11/2016 e inclui o uso total de:

Rodentia
- 600 Machos.
- 600 Fêmeas.

Marsupialia
- 600 Machos.
- 600 Fêmeas.

Chiroptera
- 200 Machos.
- 200 Fêmeas.

Carnivora
- 75 Machos.
- 75 Fêmeas.

(continua)


Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04628550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

LICENÇA**LW-81/12**

(continuação da licença LW-81/12 - protocolo 42/12.1)

Cingulata

- 10 Machos.
- 10 Fêmeas.

Pilosa

- 10 Machos.
- 10 Fêmeas.

Canis familiaris

- 460 Machos.
- 460 Fêmeas.

Sus domesticus

- 100 Machos.
- 100 Fêmeas.

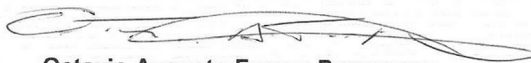
Bovinae

- 40 Machos.
- 40 Fêmeas.

Capra aegagrus hircus

- 40 Machos.
- 40 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 26 de novembro de 2012.



Octavio Augusto França Presgrave

Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-39/14

Certificamos que o protocolo (P-70/13.2), intitulado "ESTUDOS TAXONÔMICOS E ECO-EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES NÃO VOADORES DO BRASIL", sob a responsabilidade de **PAULO SERGIO D'ANDREA** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/05/2018 e inclui o uso total de:

Marsupialia

- 1000 machos;
- 1000 fêmeas.

Rodentia

- 1000 machos;
- 1000 fêmeas

Rio de Janeiro, 19 de maio de 2014.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DO AMBIENTE – SEA
INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE - INEA

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA INEA Nº 020/2011

AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA
EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO

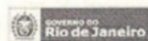
O Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas do Instituto Estadual do Ambiente – INEA, no uso de suas atribuições legais, considerando a Portaria IEF/RJ/PR nº 227, de 18/12/2007, e considerando ainda o que consta no procedimento administrativo E-07/500.901/2010, **AUTORIZA** o pesquisador **PAULO SERGIO D'ANDREA**, vinculado à Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, e sua equipe, Ana Maria Jansen-Franken, André Luiz Rodrigues Roque, Arnaldo Maldonado Júnior, Cibele Rodrigues Bonvicino, Elba Regina Sampaio Lemos, Fabiano Araújo Fernandes, José Luis Passos Cordeiro, José Roberto Machado Silva, Márcio Neves Bóia, Pedro Cordeiro Estrela, Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha, Rosana Gentile, Rosângela Rodrigues Silva, Bernardo Rodrigues Teixeira, Carla Nunes Kauffman, Cecília Silianky de Andreazzi, Cinthia Coutinho Rosa, Fernanda Bittencourt de Oliveira, Gabriele de Almeida Liano, Ingrid Lorenzato Ferreira Viana, Jonathan Gonçalves, Juberian Silva Garcia, Juliana Ferraz, Liana Stretch Pereira, Marta Júlia Faro dos Santos, Raquel de Oliveira Simões, Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos, Rodrigo Agrellos e Sócrates Fraga da Costa Neto a obter dados no Parque Estadual da Pedra Branca – PEPB, com vistas à execução do projeto de pesquisa **“Estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e parasitológicos sobre mamíferos reservatórios de zoonoses de importância para a saúde pública em um mosaico de ocupação antrópica no Campus da Fiocruz da Mata Atlântica e áreas adjacentes, RJ”**, devendo ser observadas as condições discriminadas no verso deste documento e ainda aquelas previstas na Portaria supra mencionada.

A presente autorização tem validade de **05 (cinco) anos** a partir da data de sua assinatura.

Rio de Janeiro, 31 de *MARÇO* de 2011.

André Ilha

Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas



inea instituto estadual
do ambiente



Condicionantes desta autorização:

1. Fica o pesquisador autorizado a:

a) Capturar:

a.1) espécimes dos táxons Rodentia, Didelphimorphia, por meio de armadilhas do tipo Tomahawk e Sherman, coletar sangue, fezes e ectoparasitos e utilizar brincos para marcação; e

a.2) espécimes do táxon Chiroptera, por meio de rede de neblina (mist-net) e puçás, coletar sangue, fezes e ectoparasitos e utilizar colares para marcação.

b) Coletar por excursão e por localidade até:

b.1) 10 (dez) espécimes de *Oligoryzomys nigripes* e *Akodori cursor*, assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos;

b.2) 06 (seis) espécimes de *Didelphis aurita*, *Philander frenatus*, *Metachirus nudicaudatus*, *Monodelphis americana*, *Micoreus demerare*, *Gracilinanus microtarsus*, *Eurioryzomys sp.*, *Sphiggurus villosus*, *Cavia aperea*, *Cavia fulgida* e *Trinomys dimidiatus*, assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos;

b.3) 01 (um) espécime de *Dasyprocta leporin*, assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos;

b.4) todos os espécimes de *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos; e

2. Fica o pesquisador autorizado, durante todo o projeto, a coletar até 10 (dez) machos e 10 (dez) fêmeas por espécie do táxon Chiroptera, , assim como sangue, fezes, ectoparasitos, endoparasitos, tecidos e órgãos.

3. Esta autorização não autoriza a coleta das espécies presentes nas listas oficiais de espécies ameaçadas.

4. O pesquisador deverá entrar em contato com o Serviço de Planejamento e Pesquisa da Diretoria de Biodiversidade e Áreas Protegidas, pelo telefone (21) 2334-6207, bem como com o administrador da unidade de conservação pelo telefone (21) 3347- 1786 para agendamento das atividades.

5. O pesquisador deverá apresentar ao INEA relatórios parciais semestrais da atividade de pesquisa.

6. Ao término da pesquisa científica deverão ser encaminhadas ao INEA duas cópias impressas e assinadas do relatório final de pesquisa e uma cópia em meio digital em formato pdf, não podendo ser ultrapassado o prazo máximo de 3 (três) meses após o término da pesquisa, bem como duas cópias das publicações científicas e quaisquer outros materiais produzidos a partir dos dados obtidos.

7. O pesquisador deverá mencionar o nome da unidade de conservação nos trabalhos publicados a partir desta pesquisa.

9. O pesquisador deverá dar entrada no pedido de renovação da Autorização de pesquisa 30 (trinta) dias antes de seu término, caso necessite dar continuidade à mesma.

9. O pesquisador e sua equipe ficam comprometidos em apresentar a Autorização de pesquisa, acompanhada de um documento de identidade, sempre que solicitado por servidor do INEA, bem como a executar exclusivamente o que foi previsto no projeto de pesquisa aprovado pelo INEA.

10. Fica o pesquisador comprometido a comunicar qualquer alteração do projeto antes de sua execução, devidamente justificada, para prévia aprovação.

11. A inobservância das determinações relacionadas, bem como qualquer intervenção não autorizada na Unidade de Conservação em questão, implicará na suspensão total ou parcial da referida Autorização, e na aplicação de sanções administrativas previstas na Lei 3.407/2000 e na Lei 9.605/1998.





Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 13373-1		Data da Emissão: 19/11/2007 17:02
Dados do titular		
Registro no Ibama: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT):
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas;
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Rodentia, Didelphimorphia
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Museu Nacional (UFRJ)	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 91827146





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-1	Data da Emissão: 07/11/2014 17:00	Data para Revalidação*: 07/12/2015
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Rui Cerqueira Silva	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	campanha de amostragem na estação chuvosa (previsão)	11/2014	12/2014
2	campanha de amostragem na estação seca (previsão)	06/2015	07/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso ao patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Para as espécies presentes na lista brasileira da fauna ameaçada de extinção somente está autorizada a coleta/transporte de 2 indivíduos/espécie. As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos. As armadilhas utilizadas para a captura deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (pela manhã e tarde) para minimizar a morte devido a hipotermia ou hipertermia. Os pit fall devem conter aparatos que diminuam stress (insolação e/ou afogamento) dos animais, os quais devem ser fechados ou retirados quando inativos.
2	1- Observar o previsto na Cartilha do Pesquisador do PARNASO. 2- Mesmo que as atividades ocorram fora das portarias do PARNASO, as datas deverão ser avisadas pelo email pesquisa.parnaso@icmbio.gov.br 3- As armadilhas de queda deverão ser mantidas fechadas entre as campanhas e deverão ser retiradas após a última campanha, caso não haja previsão de reutilização, e os buracos devem ser tampados com terra.

Equipe

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 63173632





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-1	Data da Emissão: 07/11/2014 17:00	Data para Revalidação*: 07/12/2015
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Rui Cerqueira Silva	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Emmanuel Messias Vilar Gonçalves da Silva	Pesquisador			Brasileira
2	Arnaldo Maldonado Junior	Pesquisador			Brasileira
3	Jonathan Gonçalves de Oliveira	Aluno			Brasileira
4	Ana Cláudia Delciellos	pesquisador			Brasileira
5	Bernardo Rodrigues Teixeira	Pesquisador			Brasileira
6	Jeiel Gabrir Carvalhaes	Pesquisador			Brasileira
7	Michele Maria dos Santos	Técnico			Brasileira
8	Júlia Lins Luz	Pesquisadora			Brasileira
9	Luana Delfoente Fernandez	Aluno			Brasileira
10	André Campos Santana	Técnico			Brasileira
11	Fernanda Leite Marinho	Aluno			Brasileira
12	Alexander de Oliveira Maia	Aluno			Brasileira
13	Bruna Marceles Gomes	Aluno			Brasileira
14	Camila dos Santos Lucio	Aluno			Brasileira
15	Thiago dos Santos Cardoso	Aluno			Brasileira
16	Manoel Comes Muanis	Pesquisador			Brasileira
17	Natalie Olifiers	Pesquisadora			Brasileira
18	ROSANA GENTILE	Pesquisadora			Brasileira
19	Fernando de Oliveira Santos	Aluno			Brasileira
20	Victor Siqueira Pimentel	Aluno			Brasileira
21	reginaldo dos santos honorato	Aluno			Brasileira
22	Roberto do Val Vilela	Pesquisador			Brasileira
23	Leticia Lütke Riski	Aluno			Brasileira
24	PATRICIA FERNANDES HELIODORO DOS SANTOS	Aluno			Brasileira
25	Socrates Fraga da Costa Neto	Técnico			Brasileira
26	Suzy Emidio Ribeiro	Pesquisadora			Brasileira
27	Lucas Henriques de Carvalho Possi	Aluno			Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 63173632



Página 2/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-1	Data da Emissão: 07/11/2014 17:00	Data para Revalidação*: 07/12/2015
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Rui Cerqueira Silva	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RJ	PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS ORGÃOS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Didelphimorphia, Lagomorpha, Cingulata, Chiroptera, Rodentia
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera, Didelphimorphia, Lagomorpha, Rodentia, Cingulata
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 20), Lagomorpha (*Qtde: 4), Cingulata (*Qtde: 4), Rodentia (*Qtde: 20), Didelphimorphia (*Qtde: 20)
4	Marcação de animais silvestres in situ	Didelphimorphia, Rodentia, Chiroptera

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas(orgaos para hantavirose (FIOCRUZ)), Sangue, Ectoparasita, Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha de queda "pit fall", Rede de neblina, Armadilha tipo galola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Brinco, Outros métodos de marcação(anilha para morcegos)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 63173632



Página 3/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-1	Data da Emissão: 07/11/2014 17:00	Data para Revalidação*: 07/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Rui Cerqueira Silva	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 63173632



Página 4/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-1	Data da Emissão: 07/11/2014 17:00	Data para Revalidação*: 07/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Rui Cerqueira Silva	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 63173632



Página 5/5



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-2	Data da Emissão: 11/08/2015 12:35	Data para Revalidação*: 09/09/2016
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: RUI CERQUEIRA SILVA	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede Bio.M.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	campanha de amostragem na estação chuvosa (previsão)	11/2014	11/2014
2	campanha de amostragem na estação seca (previsão)	07/2015	12/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Para as espécies presentes na lista brasileira da fauna ameaçada de extinção somente está autorizada a coleta/transporte de 2 indivíduos/espécie. As armadilhas utilizadas para a captura deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (pela manhã e tarde) para minimizar a morte devido a hipotermia ou hipertermia. Os pit fall devem conter aparatos que diminuam stress (insolação e/ou afogamento) dos animais, os quais devem ser fechados ou retirados quando inativos.
2	1- Observar o previsto na Cartilha do Pesquisador do PARNASO. 2- Não devem ser abertas novas trilhas e o corte de vegetação nas trilhas a ser utilizadas deve ser o mínimo para permitir o deslocamento dos pesquisadores. 3 - Fica autorizada a coleta de 20 indivíduos por espécie de Didelphimorphia e 20 indivíduos por espécie de Rodentia, com exceção dos gêneros Akodon e Oligoryzomys, para os quais fica autorizada a remoção de até 30 indivíduos por espécie. Dentro do possível, as coletas devem ser divididas nas três trilhas pesquisadas. Para espécies ameaçadas, fica autorizada a coleta de dois indivíduos por espécie na campanha de 2015 e de até 4 indivíduos de Cingulata e Lagomorpha que eventualmente sejam capturados nas armadilhas.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53946224





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-2	Data da Emissão: 11/08/2015 12:35	Data para Revalidação*: 09/09/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RUI CERQUEIRA SILVA	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Emmanuel Messias Vilar Gonçalves da Silva	Pesquisador			Brasileira
2	Arnaldo Maldonado Junior	Pesquisador			Brasileira
3	Jonathan Gonçalves de Oliveira	Aluno			Brasileira
4	ANA CLAUDIA DELCIELLOS	pesquisador			Brasileira
5	Jeiel Gabrir Carvalhaes	Pesquisador			Brasileira
6	Michele Maria dos Santos	Técnico			Brasileira
7	Júlia Lins Luz	Pesquisadora			Brasileira
8	Luana Delfoente Fernandez	Aluno			Brasileira
9	André Campos Santana	Técnico			Brasileira
10	Fernanda Leite Marinho	Aluno			Brasileira
11	Alexander de Oliveira Maia	Aluno			Brasileira
12	Bruna Marceles Gomes	Aluno			Brasileira
13	Camila dos Santos Lucio	Aluno			Brasileira
14	Thiago dos Santos Cardoso	Aluno			Brasileira
15	Manoel Comes Muanis	Pesquisador			Brasileira
16	Natalie Olifiers	Pesquisadora			Brasileira
17	ROSANA GENTILE	Pesquisadora			Brasileira
18	Fernando de Oliveira Santos	Aluno			Brasileira
19	Victor Siqueira Pimentel	Aluno			Brasileira
20	REGINALDO DOS SANTOS HONORATO	Aluno			Brasileira
21	Roberto do Val Vilela	Pesquisador			Brasileira
22	Leticia Lütke Riski	Aluno			Brasileira
23	Socrates Fraga da Costa Neto	Técnico			Brasileira
24	SUZY EMIDIO RIBEIRO	Pesquisadora			Brasileira
25	Lucas Henriques de Carvalho Possi	Aluno			Brasileira
26	Alan Gerhardt Braz Magalhaes	Aluno			Brasileira
27	Diogo Loretto Medeiros	Pesquisador			Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53946224



Página 2/5



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-2	Data da Emissão: 11/08/2015 12:35	Data para Revalidação*: 09/09/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RUI CERQUEIRA SILVA	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

28	Marcelo Weksler	Pesquisador	018.286.157-06	05184857-0 IFP-RJ	Brasileira
29	PAULO SÉRGIO D ANDREA	Pesquisador	062.639.198-92	16921152 SSP-SP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RJ	PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS ORGÃOS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Oligoryzomys flavescens, Cingulata, Oligoryzomys nigripes, Akodon serrensis, Akodon cursor, Rodentia, Lagomorpha, Didelphimorphia, Akodon montensis
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Akodon cursor, Oligoryzomys flavescens, Cingulata, Didelphimorphia, Rodentia, Lagomorpha, Akodon montensis, Akodon serrensis, Oligoryzomys nigripes
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Oligoryzomys flavescens (*Qtde: 30), Akodon cursor (*Qtde: 30), Rodentia (*Qtde: 20), Didelphimorphia (*Qtde: 20), Cingulata (*Qtde: 4), Lagomorpha (*Qtde: 4), Oligoryzomys nigripes (*Qtde: 30), Akodon montensis (*Qtde: 30), Akodon serrensis (*Qtde: 30)
4	Marcação de animais silvestres in situ	Oligoryzomys flavescens, Rodentia, Oligoryzomys nigripes, Didelphimorphia, Akodon cursor, Akodon montensis, Akodon serrensis

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Ectoparasita, Urina, Outras amostras biológicas(orgaos para hantavirose (FIOCRUZ)), Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Fezes, Sangue
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha de queda "pit fall", Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
3	Método de marcação (Outros mamíferos)	Brinco

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53946224





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-2	Data da Emissão: 11/08/2015 12:35	Data para Revalidação*: 09/09/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RUI CERQUEIRA SILVA	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53946224





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45839-2	Data da Emissão: 11/08/2015 12:35	Data para Revalidação*: 09/09/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RUI CERQUEIRA SILVA	CPF: 271.775.487-34
Título do Projeto: Rede BioM.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica	
Nome da Instituição : UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 33.663.683/0001-16

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53946224



Página 5/5

Responsabilidades dos Pesquisadores trabalhar com coleta de helmintos em campo

- a) Planejamento da logística da coleta dos helmintos; Procedimento.
- b) Ajudar na montagem do Laboratório de campo e na sua infra-estrutura; Procedimento.
- c) Coletar, processar e fixar as amostras para investigação parasitológica;
- d) Separar os espécimes pelo grupo zoológico ao qual pertence (Filo); Procedimento.
- e) Etiquetar os tubos (Vidro e/ou Plástico) com as informações referentes a cada espécime coletado. Procedimentos.
- f) Escrever as informações geradas diariamente durante o período da expedição na ficha de Registro; Procedimento.
- g) Armazenar, conservar e transportar as amostras até o destino final no LABPMR.

PROCEDIMENTO

Material cirúrgico

Os profissionais devem fazer um Kit cirúrgico com: 2 Tesouras 12cm Reta Fina, 2 Tesouras Cirúrgica Reta Fina 15cm, 2 Tesouras Ponta Romba 15cm, 2 Pinças Dissecção Anatômica 12cm reta, 2 Pinças Dissecção Anatômica 16cm Reta, 2 Pinças Histológica Ponta Fina 12cm.

Material de consumo

Separar 2 Pincel chato cerda natural cabo longo (tamanho da cerda 5 mm de altura X 5 mm de largura), 2 Pincel chato cerda natural cabo longo (tamanho da cerda 8 mm de altura X 7 mm de largura), 2 Canetas nanquim uma de 0,2 e outra de 0,4 mm, 2 Lápis HB, 1 Apontador, 1 Borracha, 1 Rolo de Fita Duxex de 2,5cm, 1 Suporte para fita Durex Grande, 1 Rolo de Fita Duxex de 1,5cm, 1 Suporte para fita Durex Grande ou pequeno, 1 caixa de Lâminas de vidro tamanho 26X76 mm, 2 pares de placa de Petri de vidro tamanho 90X15 mm, em média 10 pacotes com 10 placas de Petri de Plástico tamanho 90X15 mm, 3 pacotes de placas de Petri de Plástico tamanho 137X15 mm, em média 200 Frascos de vidro com tampa de 30 a 50 ml, Etiquetas para Identificação dos espécimes (ver modelo abaixo), 2 pacotes de Tubos Falcon de 50mL e um pacote de 15mL, 1 Pote de PVC com tampa com a

medida mínima de 10 cm altura, 20 cm largura e 30 comprimento, no mínimo 1m de película vedante (Parafilm), 50 microtubos de 1,5mL, 50 Criotubos 2mL, 1 Pipeta automática de 1000µL, 1 Pipeta automática de 200µL, 50 Pipetas pasteur descartáveis de 3mL, 2 Estilete de Agulha de Insulina com seringa de 1mL, 2 Estilete de Agulha 25x0,8 com seringa de 3mL, 1 pacote de Gaze em pedaços 13 fios, 3 Maços de Papel toalha, Luva de Látex no seu tamanho (XP, P, M, G, XG), 1 caixa de Ponteira de 1000µL, 1 caixa de Ponteira de 200µL, 1 saco de Lixo Biológico por dia (O tamanho vai depender do número de espécimes coletados), 1 Rolo de Papel Filme, 1 Avental descartável (Jaleco) a cada 2 dias em média, 1 Descarte de perfuro cortante de 3 Lts, 500mL de Detergente neutro, 3 pacotes de elástico, 1 esponja de limpeza dupla face, 1 Escova pequena para lavar o material cirúrgico, 1 Galão de descarte químico, 2 Becker Plástico de 600ml, 2 Becker de vidro de 100mL, 1 Borrifador 500 ml, 1 Caixas para microtubo, 1 Estantes para tubo falcon 50mL, 1 Estantes para tubo falcon 15ml, 1 Filtro de linha, 1 Extensão elétrica, 3 Adaptadores de tomada.

Equipamento básico dos profissionais

1 - Transformador/conversor de voltagem bivolt 110v/220v 220v/110v chaveada e com alimentadores (Macho e fêmea)

1 - Microscópio Estereoscópio "Lupa"

1 - Placa aquecedora

2 - Luminárias + Lâmpadas

1 - Perfusor completo

Tipo de Fixadores e mantenedores

Fixadores Físicos:

Aquecimento, Resfriamento no nitrogênio líquido, a -20 °C.

Fixadores químicos:

Ação de agentes químicos: AFA (93 partes de etanol 70%, 5 partes de formol 0,4% e 2 partes de ácido acético 100%), Etanol Absoluto, Álcool Etílico 70% Glacial, Paraformaldeido, Karnovsky, Glutaraldeido, Millonig, Formalina 10%.

Fixadores Físico-Químico:

AFA aquecidos a 65°C

Tipos de mantenedores:

Solução salina (NaCl a 0,85% + ddH₂O), Solução de Salina Citrato (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O a Diluição + ddH₂O), PBS Salina tamponada (Tampão fosfato de sódio 10mM + NaCl 0,9%+ ddH₂O), Soro Fisiológico farmacológico (NaCl a 0,9%+ ddH₂O).

Equipamento de Proteção Individual e vestimenta dos profissionais

Na base laboratorial de Campo: Para os procedimentos no laboratório os pesquisadores devem estar vestindo calças compridas, camisa e calçado fechado. Ainda devem estar equipados com proteção individual NB3 constituído de jaleco, capuz Tyvek de proteção, Traqueia respirador, respirador motorizado de pressão positiva equipado com filtro tipo HEPA (Unidade turbo conjunto composto por: unidade turbo, bateria, filtro de alta eficiência, cinto e medidor de fluxo).

Montagem do Laboratório de Campo

Durante a montagem do Laboratório de campo o pesquisador deve reservar um lugar onde vai desenvolver seu trabalho e montar sua infra-estrutura.

Etiqueta padrão para rotular tubo com helmintos

LBCE: _____
Órgão: _____
Data: ___/___/___
Fixador: _____