

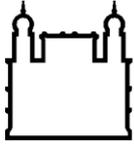
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

TAXONOMIA E SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DE NEMATÓDEOS  
GASTROINTESTINAIS DE *Mesomys hispidus* (RODENTIA:  
ECHIMYIDAE) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA NO ESTADO DO ACRE.

BEATRIZ ELISE DE ANDRADE SILVA

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***BEATRIZ ELISE DE ANDRADE SILVA***

Taxonomia e Sistemática Filogenética de Nematódeos gastrointestinais de *Mesomys hispidus* (Rodentia: Echimyidae) da Amazônia brasileira no estado do Acre.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

**Orientador:** Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

**RIO DE JANEIRO**  
Fevereiro de 2018

Silva, Beatriz Elise de Andrade.

TAXONOMIA E SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE *Mesomys hispidus* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA NO ESTADO DO ACRE. / Beatriz Elise de Andrade Silva. - Rio de Janeiro, 2018.

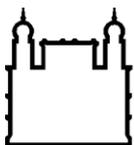
92 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientador: Arnaldo Maldonado Junior.

Bibliografia: f. 79-92

1. Andrade-Silva, B. E.. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: BEATRIZ ELISE DE ANDRADE SILVA***

**TAXONOMIA E SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DE NEMATÓDEOS  
GASTROINTESTINAIS DE *Mesomys hispidus* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA NO ESTADO DO ACRE.**

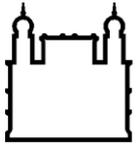
**ORIENTADOR: Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Cláudia Portes dos Santos - Presidente (IOC/FIOCRUZ-RJ)**  
**Prof. Dr. Pedro Cordeiro Estrela de Andrade Pinto - Membro (UFPB-PB)**  
**Prof. Dra. Simone Chinicz Cohen - Membro (IOC/FIOCRUZ-RJ)**  
**Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres - Suplente (UERJ-RJ)**  
**Prof. Dra. Alena Mayo Iñiguez - Suplente (IOC/FIOCRUZ-RJ)**

Rio de Janeiro, 27 de fevereiro de 2018.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

### **Dedicatória**

Ao amor da minha vida, razão do meu viver, meu amado filho Leandro Filho, por quem eu luto diariamente e de onde eu retiro todas as forças para continuar seguindo em frente.

## AGRADECIMENTOS

É muito clichê, mas impossível não começar os agradecimentos agradecendo aquele que é digno de toda honra: Deus!

Meu marido, companheiro de todas as horas, que briga incansavelmente, mas que tem muito amor guardado. Meu filho que aprendeu a viver com a minha ausência, mas me enxerga como amiga e confidente.

Meu pai, meus irmãos, minhas sobrinhas lindas e minha mãe. Minha mãe que é um mulherão, que nunca mediu esforços para que eu realizasse o meu grande sonho e por ser, para meu filho, a melhor avó que um neto pode ter.

À Márcia Cristina (*in memorian*) pela dedicação, amor e carinho, por ter sido a melhor amiga, mãe, babá etc. Foi ela que desde o 1º período da faculdade me chamava de “Doutora”. Muito me incentivou para que eu não desistisse no meio do caminho. Infelizmente hoje você não está mais presente, mas sei que está sempre olhando por mim.

E antes de agradecer a minha equipe de trabalho existem duas mulheres que acreditaram em mim quando nem eu mesma achava que seria capaz de chegar até aqui, por isso meu agradecimento especial a Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz e Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.

É grande o número de pessoas que tenho a agradecer, pois todas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e sem elas nada disso seria possível. E se eu esquecer alguém me perdoe.

Ao meu orientador Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, pela orientação, paciência e principalmente pelo seu discernimento, pois sabia exatamente até onde eu poderia ir, pela compreensão das minhas limitações acadêmicas, por acreditar na minha capacidade de aprendizado e por me proporcionar conhecimentos que levarei para vida toda.

Ao Dr. Roberto do Val Vilela, pela paciência e disponibilidade no ensinamento sobre biologia molecular, e por me fazer gostar dessa ciência tão complexa.

Ao Dr. Bernardo Rodrigues Teixeira que sempre esteve presente nos momentos difíceis, pelo companheirismo no meu primeiro trabalho de campo e por ser um grande amigo, orientador da especialização, coordenador do curso de verão etc.

A Dra. Alena Mayo Iniguez pelos ensinamentos e ajuda na identificação do helminto e por me proporcionar um momento único que foi trabalhar ao lado do Dr. Jean Pierre Hugot.

Aos pesquisadores e estudantes do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios LABPMR/IOC pela amizade, carinho e apoio durante a caminhada.

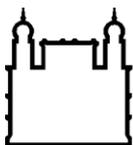
A Msc. Ana Paula Nascimento Gomes pela solidariedade, amizade, carinho, apoio, não sei o que seria de mim se não fosse sua amizade durante esses dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, pelo apoio e contribuição para o meu desenvolvimento acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

“Eu quero ficar perto de tudo que acho certo  
Até o dia em que eu mudar de opinião  
A minha experiência, meu pacto com a ciência  
O meu conhecimento é minha distração...”

(Dudu Falcão)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

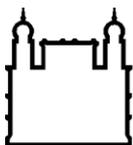
### TAXONOMIA E SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE *Mesomys hispidus* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA NO ESTADO DO ACRE.

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Beatriz Elise de Andrade Silva

A Floresta Amazônica é considerada um dos 34 “hotspots” de biodiversidade no mundo, porém é um ambiente muito pouco estudado. Conhecer a diversidade de helmintos parasitos na Amazônia é importante não só para registro de novas espécies, como também para acrescentar dados a biologia do hospedeiro estudado, o *Mesomys hispidus*, que é um roedor arborícola da família dos Echimyidae, endêmico da Amazônia. Os nematódeos são muito difíceis de serem identificados por ser um grupo muito diverso e por ter uma história evolutiva heterogênea. O estudo de classificação baseado somente em características morfológicas com o passar do tempo, tornou-se insignificante. Com o progresso de técnicas moleculares novos métodos de análise taxonômica foram introduzidos, surgindo assim a Taxonomia Integrativa que utiliza várias técnicas laboratoriais para a identificação dos nematódeos. O objetivo deste trabalho foi descrever nematódeos gastrointestinais de *M. hispidus* coletados na Amazônia brasileira no estado do Acre. Em seis expedições, realizadas entre os anos de 2014 e 2016, na Amazônia brasileira no estado do Acre em três diferentes áreas, foi possível realizar a coleta do roedor *M. hispidus* e conseqüentemente seus helmintos. Neste trabalho encontramos cinco espécimes de *M. hispidus* parasitados com duas espécies de helmintos diferentes. Para identificação taxonômica utilizamos duas técnicas diferentes: microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura que nos auxiliou na identificação das espécies *Helminthoxys freitasi* e *Boehmiella wilsoni*. Após a identificação taxonômica foi feita a identificação molecular das espécies, uma vez que, não havia sido descrita até o momento. Após a identificação foi proposta filogenia para esclarecer as relações desses helmintos. Com base em análises morfológicas e filogenéticas a relação entre o gênero *Helminthoxys* e o gênero *Wellcomia* foi confirmado. Para o gênero *Boehmiella* foi proposta a criação de uma nova família, Boehmiellidae, para aloca-ló, já que através das análises moleculares e morfológicas observamos que este gênero não se enquadrava dentro da família Haemonchidae. Com esse estudo podemos acrescentar novas distribuições geográficas para as duas espécies estudadas, além de descrever o *M. hispidus* como novo hospedeiro para as duas espécies.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### TAXONOMY AND FILOGENETIC SYSTEMS OF GASTROINTESTINAL NEMATODES OF *Mesomys hispidus* (RODENTIA: ECHIMYIDAE) FROM THE BRAZILIAN AMAZON IN THE STATE OF ACRE.

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Beatriz Elise de Andrade Silva

The Amazon rainforest is considered one of the 34 "hotspots" of biodiversity in the world, but it is a very little studied environment. Knowing the diversity of parasitic helminths in the Amazon is important not only for the registration of new species, but also to add data to the biology of the host *Mesomys hispidus*, which is an arboreal rodent of the Echimyidae family, endemic to the Amazon. Nematodes are very difficult to identify because they are a very diverse group and have a heterogeneous evolutionary history. The classification study based only on morphological characteristics with the passage of time has become inconsiderable. With the progress of molecular techniques new methods of taxonomic analysis were introduced, thus arising the integrative taxonomy that uses several laboratory techniques for the identification of nematodes. The objective of this work was to describe gastrointestinal nematodes of *M. hispidus* collected in the Brazilian Amazon in the state of Acre. In six expeditions, carried out between 2014 and 2016, in the Brazilian Amazon in the state of Acre in three different areas, it was possible to collect *M. hispidus* rodent and consequently its helminths. In this work we found five specimens of *M. hispidus* parasitized with two different helminth species. For taxonomic identification we used two different techniques: optical microscopy and scanning electron microscopy that helped us to identify the species *Helminthoxys freitasi* and *Boehmiella wilsoni*. After was made the molecular identification of the species, since so far, had not been described. Posteriorly identification, phylogeny was proposed to clarify the relationships of these helminths. Based on morphological and phylogenetic analyzes, the relationship between the genus *Helminthoxys* and the genus *Wellcomeia* was confirmed. For the genus *Boehmiella* it was proposed the creation of a new family, Boehmiellidae, for allo-ló, since through the molecular and morphological analyzes we observed that this genus did not fit within the family Haemonchidae. With this study we can add new geographic distributions for the two species studied, in addition to describing *M. hispidus* as a new host for both species.

## ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
<b>1. INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO</b>	<b>16</b>
1.1 Amazônia brasileira .....	17
1.2 Roedores equimiídeos.....	19
1.2.1 Gênero <i>Mesomys</i> .....	21
1.3 Nematódeos parasitos de roedores da Amazônia .....	23
1.4 Nematoda.....	24
1.4.1 Características da superfamília Oxyuroidea .....	26
1.4.2 Aspectos da superfamília Trichostrongyloidea .....	26
1.5 Justificativa.....	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo Geral .....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
3.1 Caracterização da Área de Estudo.....	30
3.2 Método de coleta dos pequenos mamíferos.....	31
3.2.1 Coleta e Taxonomia de Helmintos.....	31
3.3 Análise molecular e filogenética.....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
4.1 <i>Helminthoxys freitasi</i> .....	37
4.1.1 Análise Morfológica e Morfométrica.....	37
4.1.2 Análise Filogenética.....	44
4.1.3 Discussão.....	50
4.2 <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	53
4.2.1 Análise Morfológica e Morfométrica.....	53
4.2.2 Análise Filogenética.....	61
4.2.3 Discussão.....	67
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa da Amazônia.....	18
<b>Figura 2:</b> Representação da estratificação florestal: herbáceo, subosque e dossel.....	19
<b>Figura 3:</b> Distribuição dos equimiídeos na América do Sul.....	20
<b>Figura 4:</b> Filogenia da família Echimyidae.....	21
<b>Figura 5:</b> Fotografia de <i>Mesomys hispidus</i> .....	22
<b>Figura 6:</b> Distribuição do gênero <i>Mesomys</i> no Brasil.....	23
<b>Figura 7:</b> Estruturas internas de nematódeos.....	25
<b>Figura 8:</b> Localização geográfica dos municípios onde ocorreram as coletas dos roedores.....	30
<b>Figura 9:</b> Desenho em câmara clara de espécimes adultos de <i>Helminthoxys freitasi</i> .....	40
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografia por microscopia ótica de helmintos adultos de <i>Helminthoxys freitasi</i> .....	41
<b>Figura 11:</b> Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de helmintos adultos de <i>Helminthoxys freitasi</i> .....	42
<b>Figura 12:</b> Gráfico de saturação das primeiras posições dos códons.....	45
<b>Figura 13:</b> Gráfico de saturação das segundas posições dos códons.....	45
<b>Figura 14:</b> Gráfico de saturação das terceiras posições dos códons.....	45
<b>Figura 15:</b> Reconstrução filogenética de sequências do gene MT-CO1 pelo método de máxima parcimônia (MP) para o gênero <i>Helminthoxys freitasi</i> .....	47
<b>Figura 16:</b> Reconstrução filogenética de sequências do gene MT-CO1 pelo método de máxima verossimilhança (ML) para o gênero <i>Helminthoxys freitasi</i> .....	48
<b>Figura 17:</b> Reconstrução filogenética de sequências do gene MT-CO1 pelo método de inferência bayesiana (IB) para o gênero <i>Helminthoxys freitasi</i> .....	49
<b>Figura 18:</b> Desenho em câmara clara de espécimes adultos de <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	56
<b>Figura 19:</b> Desenho em câmara clara de espécimes adulto de <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	57
<b>Figura 20:</b> Fotomicrografia por microscopia de luz de helmintos adultos de <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	58

<b>Figura 21:</b> Fotomicrografia por microscopia de luz de helmintos adultos de <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	59
<b>Figura 22:</b> Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de espécimes adultos, macho e fêmea de <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	60
<b>Figura 23:</b> Gráfico de saturação dos genes 28S e 18S.....	62
<b>Figura 24:</b> Reconstrução filogenética da matriz concatenada pelo método de máxima parcimônia (MP) para o gênero <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	63
<b>Figura 25:</b> Reconstrução filogenética da matriz concatenada pelo método de máxima verossimilhança (ML) <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	64
<b>Figura 26:</b> Reconstrução filogenética de sequências da matriz concatenada pelo método de inferência bayesiana (IB) <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	66
<b>Figura 27:</b> Mapa de distribuição do gênero <i>Boehmiella</i> nas Américas.....	68
<b>Figura 28:</b> Esquema dos raios 2 e 3 da família Trichostrongylidae.....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) utilizados em PCR.....	34
<b>Tabela 2</b> - Lista de espécies e sequências nucleotídicas de 18S e 28S do “GenBank” utilizadas nos estudos moleculares com <i>Boehmiella wilsoni</i> .....	36
<b>Tabela 3</b> - Espécimes de <i>M. hispidus</i> coletados no Estado do Acre.....	37
<b>Tabela 4</b> - Morfometria ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Helminthoxys</i> spp., hospedeiro tipo, localidade tipo e autores.....	43
<b>Tabela 5</b> - Valores de <i>I</i> <sub>ss</sub> , <i>I</i> <sub>ss.c</sub> e <i>I</i> <sub>ss:c</sub> de toda a matriz, e as 1 <sup>o</sup> , 2 <sup>o</sup> e 3 <sup>o</sup> posições dos códons e respectivos valores de <i>p</i> .....	46
<b>Tabela 6</b> - Morfometria (mm) de <i>Boehmiella perichitinea</i> e <i>Boehmiella wilsoni</i> , hospedeiro, localidade e autores.....	55
<b>Tabela 7</b> - Valores de <i>I</i> <sub>ss</sub> , <i>I</i> <sub>ss.c</sub> e <i>I</i> <sub>ss:c</sub> da matriz de 18S, 28S e a matriz concatenada.....	62

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

BLAST – Basic Local Alingment Search Tool

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

DNA - Deoxyribonucleic Acid

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IFAC – Instituto Federal do Acre

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

LABPM - Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Roedores Silvestres

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MT-COI – Gene mitocondrial da subunidade 1 da citocromo c oxidase

NaCl - Cloreto de Sódio

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDTIS – Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz

OTUs - Operational Taxonomic Unit

18S – Gene nuclear da subunidade 18S do RNA ribossomal

28S – Gene nuclear da subunidade 28S do RNA ribossomal

## 1. INTERAÇÃO PARASITO-ROEDOR

Os parasitos são capazes de comprometer a vitalidade de seus hospedeiros e conseqüentemente sua fecundidade, influenciando os ecossistemas em que vivem e interferindo em processos como competição e migração (Combes, 1996).

Os roedores, componentes dos ecossistemas desempenham função fundamental para seu equilíbrio ecológico. Contribuem diretamente na dinâmica de energia, atuando como predadores, presas e consumidores primários, agindo como dispersores de sementes, o que os torna elementos fundamentais na recomposição da fisionomia vegetal (Lima *et al.*, 2001).

Os roedores hospedam grande diversidade parasitária e compartilham diversos parasitos com os seres humanos (Gentile *et al.*, 2012; Monte *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2016), o que os torna reservatórios naturais de diversas zoonoses (Nielsen, 1995; Herrera *et al.*, 2005; Mills, 2006).

Tem sido sugerido que uma melhor compreensão dos processos que compõem a ecologia dos hospedeiros, sua relação com o ambiente e particularmente sua interação com seus parasitos configure uma abordagem necessária ao entendimento da relação parasito-hospedeiro (Poulin & Dick, 2007).

Em decorrência de características tais como mudanças no tamanho da população em curto espaço de tempo, comportamento, dieta, distribuição geográfica e uso de diferentes habitats, os roedores são modelos ideais para o desenvolvimento de estudos parasitológicos (Morand *et al.*, 2006).

O comportamento geralmente territorial dos roedores, por viverem em tocas ou galerias escavadas, favorece a transmissão de parasitos entre membros da mesma espécie ou entre espécies congêneras, o que tem constituído oportunidade de investigação dos processos de transmissão entre diferentes táxons (Simões *et al.*, 2010). A compreensão do papel dos parasitos em comunidades de roedores silvestres submetidos a efeito antropogênico que resulta em diferentes graus de conservação também tem merecido uma abordagem dentro do contexto da relação parasito-hospedeiro (Cardoso *et al.*, 2015).

As comunidades helmínticas ainda são pouco conhecidas devido ao fato destes organismos apresentarem ciclos de vida complexos e distintos padrões de especificidade para seus hospedeiros (Montgomery & Montgomery, 1989). O conhecimento da helmintofauna de roedores no Brasil, ainda configura-se insipiente apesar dos esforços de helmintologistas brasileiros e estrangeiros em descreverem

numerosas espécies desde o início do século (Travassos, 1937; Maldonado *et al.*, 2003; Digiani *et al.*, 2003; Durette-Desset *et al.*, 2007; Hugot *et al.*, 2013).

Se considerarmos a ampla extensão territorial brasileira, a diversidade de ecossistemas e o elevado número de espécies de roedores endêmicos podemos sugerir que muito da diversidade de helmintos desses hospedeiros ainda está por ser conhecida pela ciência. Consubstanciando essa assertiva verificamos a frequência de recentes descrições de novas espécies de helmintos parasitos de roedores em nosso território (Gonçalves *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2012; Cordeiro *et al.*, 2015).

Os estudos globais empreendidos a fim de se conhecer a biodiversidade de parasitos são frequentemente orientados pela importância destes como agentes causadores de doenças, capazes de influenciar a saúde de seus hospedeiros e o equilíbrio dos ambientes naturais e domésticos (Brooks & Hoberg, 2000). Estudos inventariais e taxonômicos fazem-se, portanto necessários para o conhecimento da diversidade de helmintos parasitos da fauna silvestre.

## **1.1 Amazônia Brasileira**

A Amazônia localiza-se ao norte da América do Sul abrangendo um domínio natural com características definidas (clima e vegetação) e se distribui por parte do território de nove países, dentre estes: Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia, Equador, Suriname, Guiana e Guiana Francesa (Figura 1). A Amazônia brasileira ou Amazônia Legal abrange os estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Acre, Amapá, Rondônia e Roraima, compreendendo 61% do território brasileiro (Portal Amazônia, 2017).

Mais da metade das florestas tropicais remanescentes do planeta encontram-se na Amazônia, que possui a maior biodiversidade em floresta tropical do mundo. O Acre possui 87% de sua floresta preservada, sendo o estado mais biodiverso da Amazônia brasileira, possuindo ainda, florestas primárias. Sua política ambiental garante que as maiores porções de terras sejam destinadas à manutenção, conservação e uso sustentável dos recursos naturais (Amazônia, 2017).

A cobertura vegetal da Amazônia é situada acima e abaixo da linha do equador, sendo a área zoogeográfica mais importante do planeta, e cerca de 60% total desta área localiza-se no Brasil (Migueis, 2001).

A Amazônia é o maior bioma do Brasil. Em um território de 4.196.943 de km<sup>2</sup>, crescem 2.500 espécies de árvores (ou um terço de toda a madeira tropical do

mundo) e 30 mil espécies de plantas, equivalente a 30% das plantas da América do Sul. A bacia amazônica é a maior bacia hidrográfica do mundo, cobrindo cerca de 6 milhões de km<sup>2</sup> com 1.100 afluentes. Possui um quinto da disponibilidade mundial de água doce do planeta. Seu principal rio, o Amazonas, corta a região para desaguar no Oceano Atlântico, lançando ao mar cerca de 175 milhões de litros d'água a cada segundo (Ministério do Meio Ambiente, 2017).



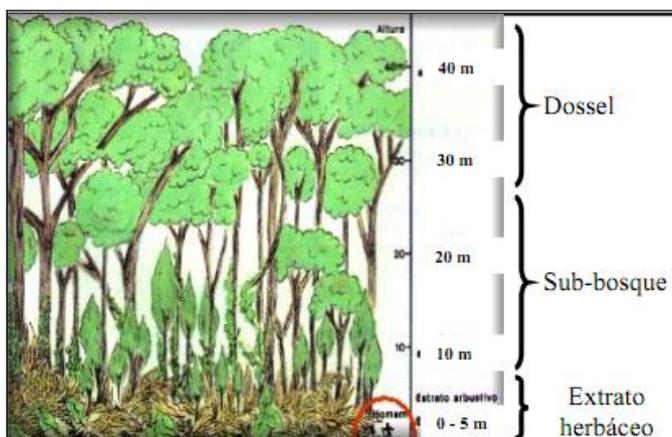
**Figura 1:** Mapa da Amazônia Internacional. Fonte: Dorling Kindersley, 2003.

Com o clima equatorial quente e úmido sofre grande influência da grande bacia hidrográfica, do processo de evapotranspiração e da zona de Convergência Intertropical que colocam grande quantidade de umidade no ar (Migueis, 2001).

Neste contexto, a Floresta Amazônica é considerada um dos 34 “hotspots” de biodiversidade no mundo, além de ser um ambiente pouco estudado, principalmente no que concerne as comunidades de parasitos (Mittermeier *et al.*, 2005).

A região Amazônica é muito diversa, quanto a sua fauna de vertebrados e invertebrados. A relação entre esses organismos é muito ampla, principalmente, no que se refere à relação parasito-hospedeiro, sendo que alguns parasitos possuem maior especificidade por seus hospedeiros (Costa *et al.*, 1992). Além disso, dada a enorme riqueza deste bioma, muitas espécies são endêmicas e podem exibir distintos padrões de interação com o ambiente, influenciando desta maneira na

composição de sua helmintofauna. Pode-se observar também a ocorrência de hábitos distintos, tal como a ocupação de nicho em diferentes estratos (Figura 2), sendo este um fator importante para a composição parasitária, visto que algumas espécies de animais podem ser encontradas com maior frequência no solo do que extrato herbáceo (Callinan & Westcott, 1986).



**Figura 2:** Representação da estratificação florestal: herbáceo, subosque e dossel.  
Fonte: [www.redeambiente.org.br](http://www.redeambiente.org.br)

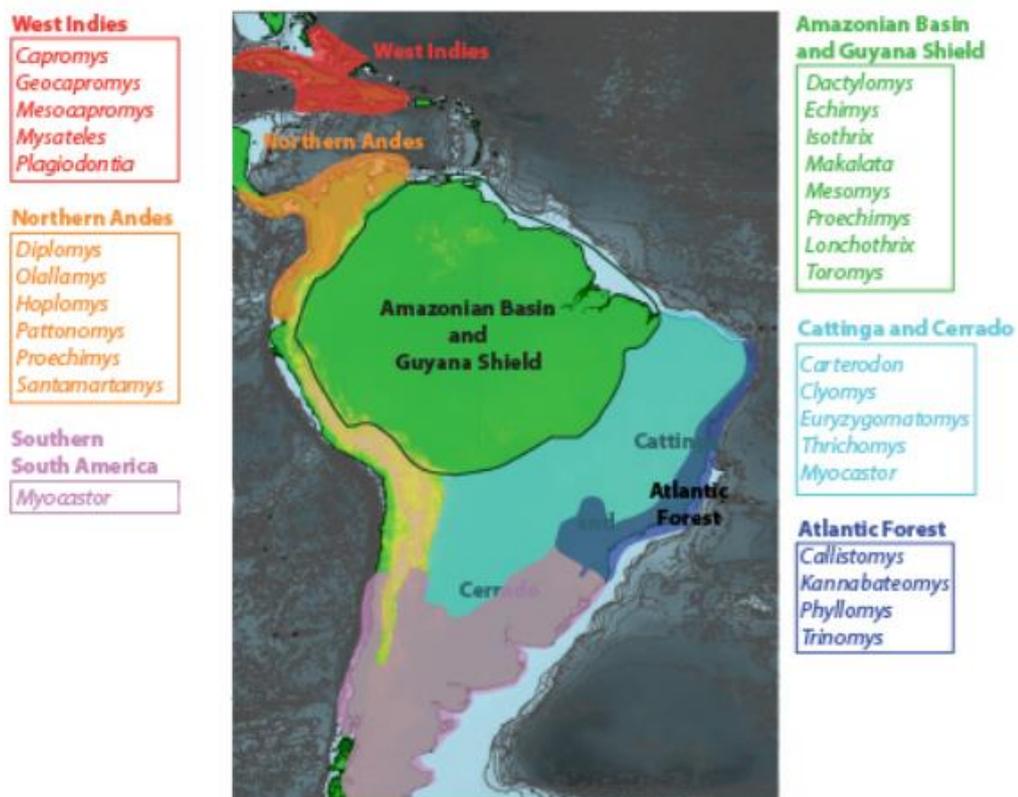
## 1.2 Roedores Equimídeos

A Ordem Rodentia é a mais diversa entre os mamíferos vivos, com mais de 2.000 espécies que exibem grande variação em tamanho, forma corporal e diversidade ecológica (Wilson & Reeder, 2005). Os roedores compartilham várias sinapomorfias, como crânio e porção rostral alongados, forame infraorbitário bem desenvolvidos etc. A ampla radiação dos roedores propiciou a colonização de diversos ambientes, e o desenvolvimento de diversos padrões corporais, existindo assim, roedores cursoriais, bípedes (saltadores), fossoriais, planadores, semi-aquáticos, arborícolas e escansoriais (Hafner & Hafner, 1988). É considerado um grupo monofilético, irmão de Ordem Lagomorpha (Honeycutt *et al.*, 2007).

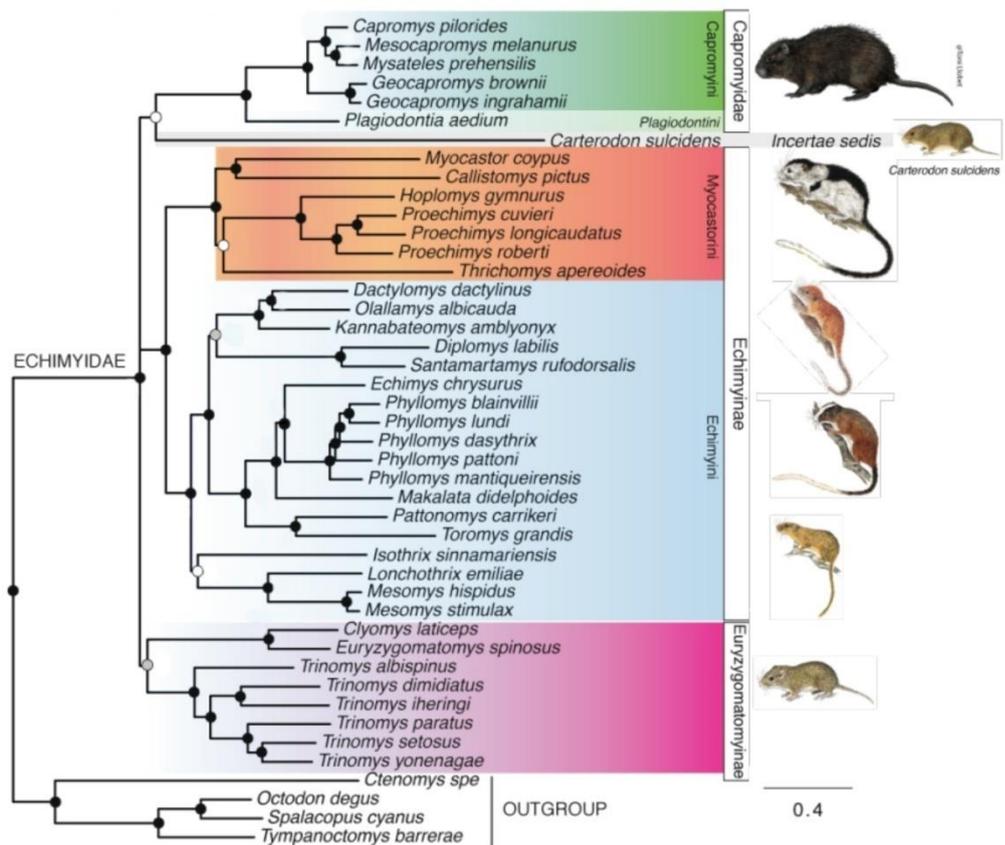
A fauna de roedores da América do Sul é constituída por grupos com histórias evolutivas e biogeográficas distintas: (1) a Subordem Hystriomorpha, Parvordem Caviomorpha (hystriognatas do Novo Mundo), com as famílias Erethizontidae, Caviidae, Cuniculidae, Dasyproctidae, Dinomyidae, Capromyidae, Ctenomyidae, Echimyidae, Myocastoridae, Octodontidae e Abrocomidae; (2) a Subordem Miomorpha com as famílias Cricetidae e Heteromyidae; e (3) a Subordem Sciuromorpha, com a família Sciuridae (Reig, 1981).

Os roedores Hystricognathi (Hystricomorpha) compreendem formas asiáticas, africanas e sul-americanas. São considerados monofiléticos por análises morfológicas, filogenéticas e parasitológicas. Englobam os Phiomorpha e Bathyergomorpha, da Ásia e África, e os Caviomorpha de América do Sul. Estes roedores foram os primeiros a ocupar o continente sul americano, onde sofreram uma grande radiação evolutiva, após este se separar dos continentes Africano Indiano e Oceania durante o Período Jurássico (Patterson & Wood, 1982; Huchon & Douzery, 2001; Hugot, 2003; Vilela, 2005; Veniaminova *et al.*, 2007).

Dentre os caviomorfos a família Echimyidae é a família mais diversa de histicognatos, não sendo diversos apenas taxonomicamente, mas também em sua ecomorfologia. Habitam vários nichos ecológicos, com hábito semi-fossorial, terrestre, arborícola e semi-aquático, distribuídos ao longo de diferentes regiões neotropicais, desde áreas florestadas úmidas até áreas abertas e secas (Figura 3). Estimativas baseadas em dados moleculares colocam a diversificação das linhagens existentes no Mioceno, quando barreiras foram formadas após mudanças climáticas e/ou elevação de montanhas que contribuíram para a divergência biótica e o endemismo Neotropical, resultando em 22 gêneros diferentes (Figura 4) (Patton *et al.*, 2015; Fabre *et al.*, 2016).



**Figura 3:** Distribuição dos Equimiídeos na América do Sul. Fonte: Fabre *et al.*, 2016.



**Figura 4:** Filogenia da família Echimyidae. Fonte: Adaptado de Fabre *et al.*, 2016.

### 1.2.1 Gênero *Mesomys*

Constituem de roedores pequenos e com pelos espinhosos, com cauda de tamanho igual ou maior que o comprimento do corpo, grupo irmão de *Lonchothrix* Thomas, 1920 pela composição e distribuição da pelagem e pela análise molecular (Patton *et al.*, 2015).

Algumas características morfológicas do gênero são pelagem muito dura e espinhosa, coloração geral do dorso castanho-avermelhada, pelagem da parte posterior do dorso com aspecto salpicado. Superfície ventral alaranjada ou amarelada, podendo apresentar manchas brancas na garganta, axilas, centro do peito e região inguinal. Cauda castanho-escuro coberta de pêlos curtos que não obstruem as escamas, mas com pincel de pêlos na ponta. Patas curtas e largas, com a superfície superior clara e dígitos com tufo ungueais claros (Bonvicino *et al.*, 2008; Patton *et al.*, 2015).

Os indivíduos são comumente encontrados no dossel e extratos mais baixos da Floresta Tropical Bacia Amazônica e a região da Guiana, mas se estendem a uma elevação de 2.000 m nas montanhas inferiores ao longo da encosta oriental dos

Andes. Podem ser especialmente comuns em quedas de árvores ou em áreas de perturbações em torno de aldeias (Patton *et al.*, 2015).

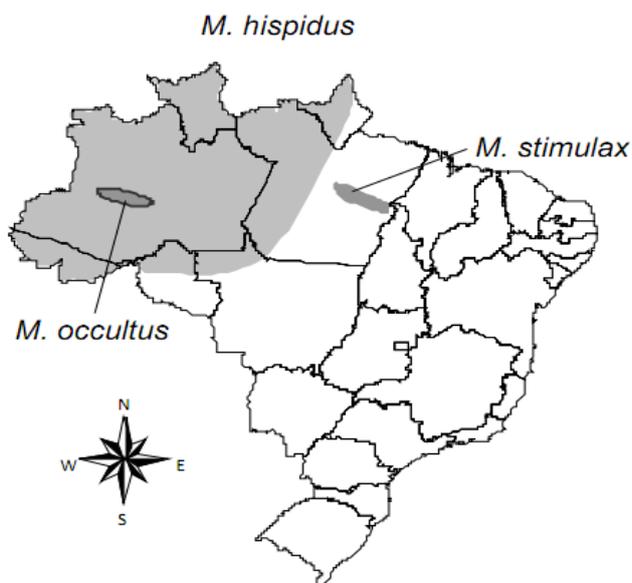
O gênero *Mesomys* Wagner, 1845 possui quatro espécies descritas: *Mesomys leniceps* Thomas, 1926, que é uma espécie restrita das montanhas do Peru, *Mesomys stimulax* Thomas, 1911, *Mesomys occultus* Patton, da Silva & Malcolm, 2000 e *Mesomys hispidus* Desmarest, 1817, que são encontradas na Floresta Amazônica no Brasil (Patton *et al.*, 2015).

*Mesomys hispidus* apresenta pequeno tamanho (peso em torno de 220g), possui focinho curto e arredondado, orelhas pequenas e pernas curtas. O aspecto geral da coloração é castanho-acinzentada, com a pelagem dorsal recoberta por pêlos modificados em espinhos curtos, largos, achatados e relativamente flexíveis que apresentam coloração acinzentada e ponta amarelada, dando um aspecto salpicado ao animal. A região ventral apresenta coloração creme 'sujo', sendo bem demarcada da região lateral do corpo (Figura 5) (Da Silva *et al.*, 2007).

Apresenta como distribuição geográfica o norte da Bacia Amazônica e leste da Bolívia, do leste do Peru, leste de Equador, sudeste da Colômbia, sul da Venezuela, as Guianas e todo o estado do Amazonas, exceto a parte leste do rio Tapajós e sul da do Rio Amazonas (Figura 6). Reproduzem ao longo do ano com ninhada de um a três filhotes (Patton *et al.*, 2000; Patton *et al.*, 2015).



**Figura 5:** Fotografia de *Mesomys hispidus*. Fonte Bonvicino *et al.*, 2008.



**Figura 6:** Distribuição do gênero *Mesomys* no Brasil. Fonte: Bonvicino, 2008.

### 1.3 Nematódeos parasitos de roedores da Amazônia

No Brasil, os primeiros estudos hemintológicos foram realizados entre 1829 e 1835, quando o naturalista austríaco Johann Natterer esteve na região amazônica realizando coletas de helmintos. Porém os estudos dos helmintos se intensificaram na metade do século XIX a partir das pesquisas do Dr. Adolpho Lutz e Dr. Pedro Severiano de Magalhães que contribuíram significativamente para a helmintologia brasileira. Já no século XX no Instituto de Manguinhos, trabalhos com helmintos foram iniciados pelos pesquisadores Gomes de Faria e Adolpho Lutz, seguido por Lauro Pereira Travassos (Sá *et al.*, 1999).

Em um artigo publicado por Lent & Teixeira de Freitas (1938), que foram discípulos de Travassos, foram estudados alguns roedores da Amazônia, provenientes do estado do Pará. Posteriormente Pinto & Gomes (1980) contribuíram para o conhecimento de helmintos, estudando três diferentes roedores: *Neacomys* sp., *Proechimys oris* Thomas, 1904 (= *Proechimys guyanensis oris*) e *Dasyprocta* sp..

Várias excursões foram em seguida realizadas na Amazônia, com a coleta de helmintos, por diversos pesquisadores da FIOCRUZ o que acarretou no depósito de vários espécimes na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), sendo que algumas espécies continuam sem identificação.

Noronha *et al.* (2002) realizaram um estudo com espécies depositadas no CHIOC e dentre as espécies identificadas encontram-se nematódeos dos roedores

proveniente da região amazônica como *Dasyprocta leporina* (Linnaeus, 1758) e *Cuniculus paca* (= *Agouti paca* Linnaeus, 1766). Gonçalves *et al.* (2002), também identificou nematódeos de 22 vertebrados da região amazônica e depositados no CHIOC contribuindo com novos registros de distribuição geográfica e novos hospedeiros.

Gonçalves *et al.* (2006), reportaram a helmintofauna de duas espécies de roedores: *Dasyprocta* sp. e *Cuniculus paca*, todos provenientes do Rio Negro, no estado do Amazonas. No ano seguinte, Gonçalves, Pinto e Durette-Desset (2007) descreveram um novo gênero e uma nova espécie de nematódeo, *Freitastrongylus angelae*, encontrado em *D. fuliginosa* Wagler, 1832 e *D. leporina* também no estado do Amazonas.

Moreira *et al.*, (2013) também relataram a presença de *Calodium hepaticum* Bancroft, 1893 em roedores sinantrópicos na Amazônia, alertando assim para um possível risco de transmissão para população humana. Recentemente em uma colaboração com o Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Reservatórios Silvestres (LABPMR), Cordeiro *et al.*, (2015) descreveram um novo gênero e uma nova espécie de nematódeo parasito de *Proechimys roberti* Thomas, 1901, coletado na Floresta Nacional Tapirapé-Aquirí no estado do Pará.

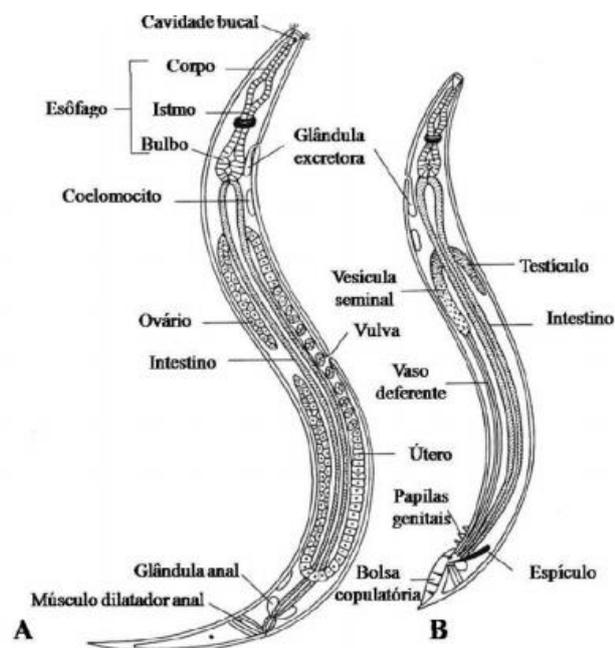
#### 1.4 Nematoda

Os nematódeos representam um dos mais bem-sucedidos planos de organização funcional desenvolvido pela natureza (Rey, 2015). É considerado o grupo de metazoários mais abundantes da biosfera, com aproximadamente 80% de todo os metazoários (Ruppert *et al.*, 2005). A diversidade estimada é de 100.000 a um milhão de espécies existentes, incluindo os de vida livre e os parasitos (Lambshhead, 1993; Hugot *et al.*, 2001). Os nematódeos possuem ampla distribuição sendo considerado um grupo taxonômico generalista quanto ao habitat, podendo habitar água doce, solos, ambientes bentônicos marinhos, e são parasitos em uma grande variedade de hospedeiros (Johnstone *et al.*, 1996). Podem estabelecer vários tipos de relações com outros seres vivos como: parasitismo, forésia, saprofitismo, necromeria ou viver livre no ambiente (Bush *et al.*, 2001).

O estudo do filo Nematoda se faz necessário pela sua importância em diversas áreas, podendo ser utilizados no controle biológico de pragas em cultivos, controlando as infestações de insetos. Porém a maior parte dos estudos

relacionados ao filo está relacionada às diversas doenças causadas aos homens, animais (vertebrados e invertebrados) e plantas (Webster & Wilson, 1980).

Os nematódeos são caracterizados por exibir um alto grau de uniformidade em sua organização estrutural básica (Figura 7). Possui corpo triploblástico (possui os três tipos de tecido, ectoderme, mesoderme e endoderme), não segmentado, simetria bilateral, sem cílios e fusiformes (com as duas extremidades afiladas). São tipicamente dióicos, com dimorfismo sexual e fecundação interna, ovíparos, com algumas exceções, tamanho variando de um  $\mu\text{m}$  a um m de comprimento. O desenvolvimento dos jovens até forma adulta muitas vezes envolve mudas (Smyth, 1994; Ruppert *et al.*, 2005).



**Figura 7:** Estruturas internas de nematódeos. A) Fêmea. B) Macho. Fonte: Rey, 2008.

Os nematódeos estão entre os animais mais difíceis de serem identificados, por ser um grupo altamente diverso e possuírem história evolutiva heterogênea. Os estudos de classificação eram baseados unicamente em características morfológicas comuns, sendo conhecida como classificação aristotélica. Posteriormente, o sistema de classificação binária de Lineu deu origem ao que conhecemos como taxonomia clássica. A partir dos anos 70, pelo rápido progresso das técnicas moleculares houve a introdução de novos métodos de análise taxonômica, e novas ferramentas para identificação foram incorporadas, surgindo

assim a Taxonomia Integrativa que utiliza várias técnicas laboratoriais para a identificação dos nematódeos (Moura, 2006).

#### 1.4.1 Características da superfamília Oxyuroidea

A superfamília Oxyuroidea Railliet, 1916 é dividida em três famílias: Pharyngodonidae Travassos, 1919, Heteroxynematidae Skrjabin & Shikhobalova, 1948 e Oxyuridae Cobbold, 1864 (Anderson *et al.*, 2009).

Na família Oxyuridae os helmintos geralmente são ovíparos, com ovos elipsóides (mais compridos e assimétricos). Fêmeas com cauda longa, com dois ovários, vulva situada na parte posterior do corpo. Macho sem ventosas pré-anais ou com algum desenvolvimento especial dos músculos pré-anais. Cauda de forma irregular, às vezes truncada, com ou sem apêndice dorsal, às vezes com grandes papilas digitiformes cercadas por asa caudal. Espículo simples ou duplo e gubernáculo presente ou ausente (Vicente *et al.*, 1997).

Os helmintos da família Oxyuridae têm sido relatados parasitando diversas ordens de mamíferos, entre elas Artiodactyla, Dermoptera, Hyracoidea, Lagomorpha, Didelphimorphia, Perissodactyla, Primata e Rodentia (Adamson, 1994).

A evolução dos Oxyuridae pode ser observada através dos caracteres genitais, como a redução do número de papilas genitais e a diferenciação das partes genitais cuticularizadas, e com base em caracteres cefálicos, como a redução dos dentes esofageanos e o desenvolvimento de estruturas labiais e interlabiais (Anderson *et al.*, 2009).

Hugot *et al.* (2013) determinaram recentemente a relação entre as espécies dessa família através de um estudo filogenético, corroborando estudos anteriores (Hugot, 1988). Constataram a semelhança entre a filogenia das espécies da família Oxyuridae e a de seus hospedeiros como sugerido por Huchon *et al.* (2007). Essas semelhanças são resultado das particularidades dos oxyurídeos e suas adaptações ao comportamento dos hospedeiros, evidenciando a ocorrência de co-evolução parasita-hospedeiro.

#### 1.4.2 Aspectos da superfamília Trichostrongyloidea

A superfamília Trichostrongyloidea Cram, 1927 é dividida em quatorze famílias. As principais características que reúnem esse grupo tão diverso em

gêneros e espécie são: cápsula bucal reduzida, ciclo monoxeno e habitam estômago ou intestino delgado de seus hospedeiros. A bolsa copuladora e a sínlofe (cristas cuticulares ao longo do corpo) são caracteres essenciais para o diagnóstico, uma vez que cada grupo taxonômico apresenta estruturas características (Anderson *et al.*, 2009). Parasitam diversos hospedeiros de vertebrados: roedores, marsupiais, bovinos, caprinos etc.

A família Trichostrongylidae Leiper, 1912 tem sido submetida à constante reestruturação e já foi reorganizada por diversas vezes (Yamaguti, 1961; Durette-Desset & Chabaud, 1977; Gibbons & Khalil, 1982). Durette-Desset *et al.* (1999) em uma análise cladística (sistemática filogenética) da superfamília Trichostrongyloidea propuseram nova classificação para a família Trichostrongylidae, elevando as subfamílias Haemonchinae e Cooperiinae a família (Haemonchidae e Cooperiidae). A subfamília Graphidiinae foi subdividida e os dois gêneros pertencentes a essa subfamília foram introduzidos nas subfamílias Ostertagiinae (*Graphidium*) e Trichostrongylinae (*Graphidioides*).

A família Haemonchidae é parasita de roedores e principalmente Artiodactylas, possui seis gêneros diferentes e tem como característica principal: um ou cinco dentes na cavidade bucal, derídeos em forma de ganchos e raios laterais não agrupados (Durette-Desset *et al.*, 1999).

As relações entre as famílias da superfamília Trichostrongyloidea são constantemente estudadas e as técnicas moleculares tem auxiliado para o entendimento dessas relações (Chilton *et al.*, 2003, 2006, 2015).

## 1.5 Justificativa

Os estudos visando o conhecimento da helmintofauna de pequenos roedores da Amazônia Brasileira ainda são escassos. Deste modo, desconhece-se a biodiversidade de seus parasitos, a relevância que apresentam para a saúde do ambiente inclusive aqueles significantes para a saúde pública, agravado pelo fato de corresponderem a espécies endêmicas de um bioma que tem sido submetido à grande pressão antropogênica.

Recentemente, a colaboração do nosso grupo de pesquisa com o Laboratório de Biologia Celular e Helmintologia Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Reinalda Marisa Lanfredi da Universidade Federal do Pará possibilitou a descrição de novas espécies de helmintos de roedores ainda não conhecidos da ciência e presença de helmintos com importância para saúde pública (Cordeiro *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2013), o que sugere a necessidade de intensificarmos os estudos no bioma amazônico.

A oportunidade de estudarmos a helmintofauna amazônica na forma de estudo a longo prazo se materializou no decurso do projeto estabelecido entre o Instituto Federal do Acre (IFAC) e o Instituto Oswaldo Cruz que tem por objetivo a formação de doutores da instituição acreana. Nesse contexto, associado aos estudos realizados por um dos estudantes sob orientação do Dr. Paulo Sérgio D'Andrea, tivemos a oportunidade de participar da construção do delineamento experimental que previa a coleta de roedores e helmintos.

Atualmente contamos com um acervo de mais de uma centena de amostras de helmintos de roedores da Amazônia acreana. Esse fato nos assegurou a possibilidade de execução de estudo inédito e que tem por objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade dos helmintos parasitos de roedores da Amazônia brasileira.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Estudar os nematódeos gastrointestinais de *Mesomys hispidus* coletados na Amazônia brasileira do estado do Acre.

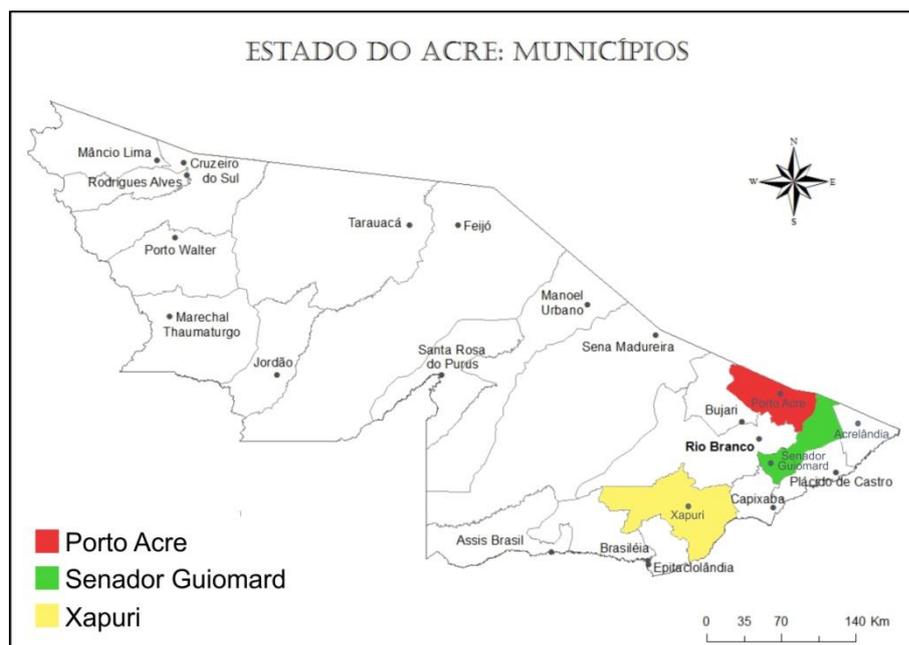
### 2.2 Objetivos Específicos

- Descrever as espécies de nematódeos de *M. hispidus* através da análise morfológica, morfométrica e ultraestrutural.
- Caracterizar geneticamente as espécies de nematódeos que foram encontradas parasitando o *M. hispidus*.
- Propor hipótese filogenética para as espécies estudadas através de dados moleculares.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização da Área de Estudo

O estudo foi desenvolvido em três áreas distintas da floresta amazônica no estado do Acre (Figura 8). A primeira área localiza-se 218 km da capital Rio Branco no município Xapuri, denominada Floresta do Seringal Cachoeira ( $10^{\circ}49'40,79''\text{L}$ ;  $68^{\circ}21'38,89''\text{O}$ ), onde situa-se o Projeto de Assentamento Agroextrativista Chico Mendes. Apresenta fisionomia florestal predominante caracterizada por floresta ombrófila aberta com alta densidade de bambu (*Guadua weberbaueri*) e floresta ombrófila densa de terras baixas com dossel emergente. A segunda área de estudo denominada Floresta do Humaitá ( $9^{\circ}54'17,70''\text{L}$ ;  $67^{\circ}17'8,01''\text{O}$ ) tem aproximadamente 3.700 ha, cuja altitude varia de 130 m a 179 m, localiza-se a 30 km da capital Rio Branco, no município Porto Acre. A tipologia florestal predominante é de floresta ombrófila aberta com bambu (*Guadua weberbaueri*) em solos mais argilosos e siltosos; e no Gleissolo do terraço aluvial (várzea e/ou baixo) e floresta aberta com Palmeiras. A terceira área chamada de Fazenda Experimental Catuaba ( $10^{\circ}09'39,0''\text{L}$ ;  $67^{\circ}44'17,6''\text{O}$ ) está localizada a 24 km da capital Rio Branco, no município de Senador Guimard. A vegetação predominante é floresta ombrófila aberta com alta densidade de bambu (*Guadua weberbaueri*) (ACRE, 2006).



**Figura 8:** Localização geográfica dos municípios onde ocorreram as coletas dos roedores. Fonte: Adaptado de Google Imagens.

### 3.2 Métodos de Coleta dos pequenos mamíferos

Foram realizadas coletas do roedor *Mesomys hispidus* nas três áreas selecionadas, sendo cada área amostrada duas vezes ao ano: uma na estação seca e outra na chuvosa. As coletas foram realizadas nos anos de 2014, 2015 e 2016. Nas estações de captura foram dispostas armadilhas apropriadas para a captura de pequenos mamíferos vivos com até 3Kg. As armadilhas usadas foram Tomahawk (modelo 201, Tomahawk Live Trap, Hazelhurst, Wisconsin; 16X5X5 polegadas [40.6X12.7X12.7 cm]) e Shermant (modelo XLK, H.B. Sherman Traps, Tallahassee, Florida; 3X3.75X12 polegadas [7.6X9.5X30.5 cm]).

Cada expedição de coleta teve duração de cinco noites consecutivas de captura. Em cada captura foram anotados os seguintes dados de cada espécime de mamífero capturado: espécie, ponto de captura, tipo de armadilha, posição da armadilha, peso, sexo, condição reprodutiva, tamanho corpóreo e da cauda, além de observações individuais. As espécies de roedores foram identificadas através da morfologia externa, morfometria craniana e análise cariotípica. Os animais coletados foram taxidermizados e seus esqueletos preparados, foram depositados como material testemunho em coleção científica temporária do LABPMR.

A eutanásia dos animais foi realizada atendendo às normas estabelecidas pela Resolução nº. 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, de 20 de junho de 2002. Todos os procedimentos com animais seguem protocolo experimental submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz Licença CEUA (L-0049/08) e Licença ICMBio (13373-1).

#### 3.2.1 Coleta e taxonomia de *Helmintos*

Os roedores foram necropsiados, os órgãos retirados e colocados separadamente em placas de Petri, onde foram lavados em solução fisiológica (NaCl a 0,85%) e dissecados com auxílio de microscópio estereoscópico. Todos os helmintos encontrados foram conservados em etanol 70% (AMATO *et al.*, 1991).

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. Os nematódeos foram diafanizados em lactofenol e montados entre lâmina e laminulas. Em algumas amostras foram efetuados cortes transversais com auxílio de uma lâmina de aço sob microscópio estereoscópico, possibilitando uma visão transversal da secção, a fim de auxiliar na identificação da espécie. Os cortes transversais foram montados entre lâmina e

laminula, ladeada por duas laminulas sobrepostas. Os registros fotográficos foram feitos com o auxílio microscópio óptico Zeiss Observer Z1 acoplado de uma câmara digital Zeiss Axio Cam HRC e processadas pelo Axio Vision Rel. 4,7 software.

Foram mensuradas todas as estruturas importantes para identificação taxonômica, sendo as medidas registradas em milímetros (mm) ou micrometros ( $\mu\text{m}$ ). Todas as medidas foram organizadas em tabelas utilizando-se o software Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>.

Para identificação das espécies foram considerados os caracteres morfológicos específicos de acordo com as chaves de identificação disponíveis em Travassos (1937), Yamaguti (1961), Vicente *et al.*, (1997), Gibbons & Khalil (1982), Hugot (1988), Durette-Desset *et al.*, (1999), Anderson *et al.*, (2009), além dos artigos de descrição das espécies relacionadas.

Para a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), o protocolo seguido foi modificado de Souza *et al.*, 2017. Os helmintos foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90% e etanol absoluto) por 20 minutos cada etapa, e secos pelo método de ponto crítico com dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Em seguida os espécimes foram montados em “*stub*” fixados a fita adesiva dupla face. As amostras foram submetidas ao processo de metalização com ouro formando camadas de espessura aproximada de 20 nm. Finalmente, os espécimes foram examinados usando o microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth – IOC/Fiocruz.

### **3.3 Análises moleculares e filogenéticas**

Foram utilizados dois espécimes fêmea de cada gênero de nematódeos estudado para a análise molecular. Os helmintos foram retirados do conservante (etanol 70%) colocados em tubos de 1,5 mL, lavados com água destilada e após três dias foram submetidos a extração do DNA.

O DNA genômico foi individualmente extraído. Para tal, cada espécime foi macerado em solução de extração, contendo a proteinase K e incubado por doze horas a 56°C. Em seguida o material digerido foi aplicado a mini-coluna de purificação Qiagen QIAamp DNA Mini Kit, de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o momento do seu uso.

Fragments do gene mitocondrial da subunidade 1 do citocromo c oxidase (MT-CO1) foram amplificados por meio da Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) descrito por Okamoto *et*

*al.* (2007). Já os fragmentos de partes dos genes das subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal foram amplificados através da PCR utilizando um conjunto de sete pares de oligonucleotídeos iniciadores descritos por Chilton *et al.*(2003) e um par de oligonucleotídeos iniciadores descrito por Gomes *et al.* (2015) (Tabela 1).

O procedimento de amplificação da PCR seguiu a literatura original (Okamoto *et al.*, 2007; Chilton *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2015), e foi realizada no termociclador Veriti Thermal Cycler (Life Technologies). A detecção do produto da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1,5%) e revelado com GelRed™. Os produtos de PCR foram purificados utilizando um Kit GE de Health care Illustra GFX PCR DNA and Gel Band (Purification kit). O sequenciamento foi realizado utilizando o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA). O procedimento de sequenciamento foi conduzido para Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz, PDTIS / FIOCRUZ, subunidade RPT01A – Sequenciamento de DNA.

As seqüências de DNA obtidas foram analisadas, editadas e reunidas em consensos (*contigs*), utilizando o programa Geneious R9 (Kearse *et al.*, 2012). Em seguida, foi realizada uma pesquisa buscando similaridade no "GenBank" ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Após verificação, as seqüências geradas foram reunidas com as seqüências provenientes do "GenBank" e alinhadas através do alinhamento múltiplo baseado em tradução de aminoácidos usando os algoritmos do programa Cluster W, executado no servidor web Translator X (Abascal *et al.*, 2010) e Sina Silva (Pruesse *et al.*, 2012).

As sequencias obtidas através do "GenBank" para a construção da matriz do gênero *Boehmiella* encontram-se na tabela 2. As sequencias obtidas através do "GenBank" para a construção da matriz do gênero *Helminthoxys* foram: *Aspicularis tetraptera* (KT764937), *Enterobius vermicularis* (EU281143), *Passarulus ambiguus* (KT879302), *Rauschtineria eutamii*, (KT875323), *Syphacia frederici* (MF142425), *Syphacia montana* (AB282581), *Syphacia obvelata* (KT900946), *Syphacia stroma* (MF142420), *Syphatineria* sp. (LC038092) e *Wellcomia siamensis* (GQ332427).

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados em PCR.

Marcador	Primer	Sequência 5'→3'	Autor
MT-CO1	COI Sypha F	TGGTCTGGTTTTGTTGGTAGTT	Okamoto <i>et al.</i> , 2007
	COI Sypha R	AACCACCCAACGTAAACATAAA	Okamoto <i>et al.</i> , 2007
28S RNAr	NC16	AGTTC AATCGCAATGGCTT	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC2R	AGCGGAGGAAAAGAACTAA	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-1	ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-3	GACAGCAGGACGGTGGCCATG	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-5	TCCAAGGTGAACAGCCTCT	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-7	GACCCTGTTGAGCTTGACTC	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-9	GCGACGTTGCTTTTTGATCC	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC2	TTAGTTTCTTTTCTCCGCT	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28R	GCATAGTTCACCATCTTTCGGGT	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-12R	TTGATTCGGCAGGTGAGTTG	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-4R	AGCCAATCCTTTTCCCGAAG	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-6R	ATGTACCGCCCCAGTCAAAC	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC28-8R	GTCTAAACCCAGCTCACGTT	Chilton <i>et al.</i> , 2003
	NC18S-R	ATCTGCTCTAATGAGCCGT	Chilton <i>et al.</i> , 2003
18S RNAr	18SPhysa-RNA F	GCGAACGGCTCATTATAACA	Gomes <i>et al.</i> , 2015
	18SPhysa-RNA R	ATTTTCACCTCTCACGCA	Gomes <i>et al.</i> , 2015

A matriz de dados resultante foi modificada para o formato FASTA e analisada no programa Mesquite versão 3.03 (Maddison & Maddison, 2011), que, assim como o programa Geneious, exibe a tradução dos códons, permitindo verificação de erros no quadro de leitura, verifica a ocorrência de códons de parada de leitura e compara as sequências de aminoácidos com as de outros nematódeos. Além disso, o programa Mesquite permite converter a matriz de dados do formato FASTA para o formato NEXUS.

Para as reconstruções filogenéticas por inferência bayesiana, o bloco de comando para o programa Mr. Bayes versão 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) foi adicionado à matriz de caracteres no formato NEXUS, através do programa Mesquite. No bloco de comando, as cadeias markovianas foram configuradas para amostrar a cada cem (samplefreq = 100) em um total de dez milhões de gerações (ngen = 10000000). Como amostras de aquecimento (*burn-in*), foram descartados os primeiros valores amostrados até que a convergência para uma distribuição de equilíbrio fosse atingida. Com os valores restantes, foram calculados as probabilidades posteriores e um consenso por regra de maioria dos 50% foi gerado. O programa Mr. Bayes foi executado na plataforma Cipres Science Gateway (Miller *et al.*, 2010) para reduzir o tempo computacional das análises.

As análises de saturação foram realizadas no programa DAMBE (Xia & Xie, 2001), onde foi plotado o número de transições e transversões *versus* distância

genética, fornecendo um gráfico que permite visualizar se há ou não saturação destas substituições. O modelo evolutivo utilizado para calcular as distâncias genéticas foi JC 69 (Jukes & Cantor, 1969), que é o modelo mais simples no qual assume frequências de bases iguais e taxas de mutação iguais. Esta análise foi realizada separadamente para cada matriz.

O teste de Xia (Xia *et al.*, 2003; Xia & Lamey, 2009) foi realizado no programa DAMBE, onde foi verificado o nível de saturação das substituições. Os valores de *I*ss (índice de saturação nas substituições) e *I*ss.c (*I*ss crítico) foram calculados para todos os sítios da matriz, cada matriz separadamente. Portanto, o valor de *I*ss deve ser menor do que o valor de *I*ss.c. Quando o valor de *I*ss é maior do que o valor de *I*ss.c, significa que as sequências experimentam saturação severa nas substituições. São considerados valores de *I*ss.c diferentes para topologias simétricas e assimétricas. Foram calculados valores diferentes de *I*ss e *I*ss.c para diferentes números de OTUs (Operational Taxonomic Unit) número de táxons.

As reconstruções filogenéticas por máxima parcimônia foram realizadas no programa PAUP versão 4.0 a 150 (Swofford, 2003), a fim de encontrar a árvore mais parcimoniosa. A procura pela árvore com o menor número de passos evolutivos foi realizada por meio do método de busca heurística utilizando adição por passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos TBR (*tree bisection-reconnection*) com 1.000 réplicas. Os valores de suporte para os ramos foram obtidos utilizando reamostragens por *bootstrap* com 10.000 pseudoréplicas também no programa PAUP. Valores de *bootstrap* menores do que 50% não foram mostrados na árvore de consenso estrito.

As reconstruções filogenéticas por máxima verossimilhança foram realizadas no programa PhymL 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), utilizando a mesma matriz de caracteres convertida para o formato Phylip.

**Tabela 2-** Lista das espécies e sequências nucleotídicas de 18S e 28S do "GenBank" utilizadas nos estudos moleculares com *Boehmiella wilsoni*.

Famílias	Sub-Famílias	Espécies	28S DNAr	18S DNAr
Amidostomatidae	-	<i>Amidostomum cygni</i>	AM039745	AJ920353
Herpetostrongylidae	Globocephaloidinae	<i>Amphicephaloides thylogale</i>	LN715232	-
Ancylostomatidae	-	<i>Ancylostoma caninum</i>	AM039739	AJ920347
Herpetostrongylidae	Herpetostrongylinae	<i>Austrostrongylus chandleri</i>	LN715224	-
Herpetostrongylidae	-	<i>Beveridgiella iota</i>	LN715228	-
Haemonchidae	Ostertagiinae	<i>Camelostongylus mentulatus</i>	LN715234	-
Cooperiidae	Cooperiinae	<i>Cooperia curticei</i>	LN715235	-
Dromaeostrongylidae	-	<i>Dromaeostrongylus bicuspis</i>	LN715218	-
Dromaeostrongylidae	-	<i>Filarinema flagrifer</i>	AM039746	AJ920354
Herpetostrongylidae	Herpetostrongylinae	<i>Globocephaloides macropodis</i>	LN715231	-
Haemonchidae	Ostertagiinae	<i>Graphidium strigosum</i>	LN715219	-
Haemonchidae	Haemonchinae	<i>Haemonchus contortus</i>	AM039742	EU086374
Heligmosomidae	-	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	AM039747	AJ920355
Herpetostrongylidae	Herpetostrongylinae	<i>Herpetostrongylus pythonis</i>	AM039750	AJ920358
Herpetostrongylidae	Herpetostrongylinae	<i>Hyostrongylus rubidus</i>	LN715237	-
Cooperiidae	Libyostrongylinae	<i>Libyostrongylus douglassi</i>	LN715233	-
Mackerrastrongylidae	-	<i>Mackerrastrongylus isoodon</i>	LN715221	-
Ancylostomatidae	-	<i>Necator americanus</i>	AM039740	AJ920348
Molineidae	-	<i>Nematodirus battus</i>	AM039752	AJ920360
Molineidae	-	<i>Nematodirus helvetianus</i>	LN715238	-
Nicollinidae	-	<i>Nicollina cameroni</i>	AM039749	AJ920357
Heligmonellidae	-	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	LN715229	AJ920356
Heligmonellidae	-	<i>Nippostrongylus magnus</i>	AM039748	-
Heligmonellidae	-	<i>Odilia binae</i>	LN846131	-
Molineidae	-	<i>Ollulanus tricuspis</i>	LN715220	-
Haemonchidae	Ostertagiinae	<i>Ostertagia leptospicularis</i>	AM039744	AJ920351
Herpetostrongylidae	Herpetostrongylinae	<i>Paraustrostrongylus bettongia</i>	LN715226	-
Herpetostrongylidae	Herpetostrongylinae	<i>Patricialina hickmani</i>	LN715227	-
Dromaeostrongylidae	-	<i>Peramelistrongylus skedastos</i>	LN715222	-
Herpetostrongylidae	Herpetostrongylinae	<i>Sutarostrongylus johnsoni</i>	LN715225	-
Mackerrastrongylidae	-	<i>Tachynema baylisi</i>	LN715223	-
Haemonchidae	Ostertagiinae	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	LN715236	-
Mackerrastrongylidae	-	<i>Tetrabothriostongylus mackerrasae</i>	AM039751	AJ920359
Trichostrongylidae	Trichostrongylinae	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	AM039743	AJ920350
Herpetostrongylidae	Herpetostrongylinae	<i>Woolleya monodelphis</i>	LN846132	-

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas, ao longo de três anos, seis coletas nas áreas de estudo, onde foram capturados 11 indivíduos de *Mesomys hispidus* (Tabela 3), sendo cinco espécimes infectados com helmintos. Os helmintos do gênero *Helminthoxys* Quentin, 1969 foram encontrados no intestino delgado de cinco espécimes, enquanto os helmintos do gênero *Boehmiella* Gebauer, 1932 foram encontrados no estômago de um espécime.

**Tabela 3** - Espécimes de *M. hispidus* coletados no Estado do Acre

Localidade	Xapuri		Porto Acre		Senador Guiomard	
	Mar 2014	Ago 2014	Jun 2015	Dez 2015	Maio 2016	Dez 2016
<i>Mesomys hispidus</i>	0	4	1	3	0	3
Positivos	-	2	1	1	-	1

### 4.1 *Helminthoxys freitasi* Quent, 1969

**Família:** Oxyuridae Cobbold, 1864

**Gênero:** *Helminthoxys* Freitas, Lent & Almeida, 1937

**Espécie:** *Helminthoxys freitasi* Quentin, 1969

#### 4.1.1 - Análise Morfológica e Morfométrica.

Foram recuperados a partir do intestino grosso de *Mesomys hispidus* vinte e sete nematódeos fêmeas e quatro machos (Figuras 9A, 10A) pertencentes à família Oxyuridae. Os dois sexos apresentaram a extremidade anterior formada por três pseudolábios proeminentes, sendo um dorsal e dois latero-ventrais, intercalados por três dentes esofageanos localizados na cavidade vestibular (Figuras 9B, 9C). Na superfície externa da extremidade anterior observa-se uma placa cefálica, alongada lateralmente, contendo um anfídeo e duas papilas submedianas próximo a cada pseudolábio latero-ventral ladeado por asas cervicais que se estendem até o terço anterior do corpo (Figuras 9C, 11A, 11B).

Nos machos encontram-se dois mamelões cuticulares que se projetam como expansões cuticulares estriadas, localizados na porção posterior do corpo (Figuras 10C, 11F). Após o segundo mamelão observa-se uma fileira de 18 ornamentações ventrais, na forma de pequenas cristas cuticulares longitudinais (Figuras 9H, 10B, 11E). Um gancho acessório, e três pares de papilas genitais, sendo dois pares de papilas laterais, adanais e sésseis e um par de papilas pedunculadas pós-cloacais são observados. Os fasmídeos estão situados lateralmente e posterior ao último par

de papilas laterais (Figuras 9D, 11C, D). O espículo é único e gubernáculo encontra-se presente (Figura 10D). Foram realizados cortes transversais ao longo do corpo do macho evidenciando a asa lateral, o mamelão e a ornamentação ventral (Figuras 9E, F, G, H). Nas fêmeas a vulva encontra-se na porção posterior do corpo (Figura 10E). O útero encontra-se dobrado sobre si, abrindo-se em dois ovidutos (Figura 9I). Os ovos são em formato elipsóides e encontram-se em grande quantidade (Figura 10F). Abertura do ânus da fêmea localiza-se no final do corpo próximo a cauda (Figura 11G).

As medidas dos espécimes aqui estudados em comparação com outras espécies do gênero são apresentadas na tabela 4. As fêmeas apresentaram o corpo alongado, com comprimento de  $10325 \pm 1168$  [8750-11675] (n=7) e largura de  $407 \pm 65$  [325-500] (n=7). O anel nervoso e o poro excretor estão localizados respectivamente a  $249 \pm 38$  [215-317] (n=7) e  $1200 \pm 240$  [830-1530] (n=6) da extremidade anterior. O vestíbulo e as asas cervicais apresentam  $27 \pm 10$  [15-40] (n=4) e  $60 \pm 3,5$  [57-72] (n=4) da extremidade anterior, respectivamente. O esôfago mede  $482 \pm 16$  [460-500] (n=5) de comprimento, o bulbo  $219 \pm 8$  [205-227] de comprimento por  $179 \pm 9$  [160-187] (n=6) de largura. A abertura da vulva localiza-se na parte posterior do corpo  $4657 \pm 739$  [3475-5525] (n=5). A cauda é longa com  $913 \pm 390$  [710-1370] (n=7) de comprimento. O útero encontrava-se repleto de ovos, de formato alongado, com uma camada externa hialina e sem opérculo com  $88 \pm 6$  [82-95] (n=4) de comprimento por  $38 \pm 3$  [32-40] (n=4) de largura.

Os espécimes machos apresentavam comprimento de  $3725 \pm 335$  [4060-3390] (n=2) e  $230 \pm 0$  [230] (n=2) de largura. O anel nervoso e o poro excretor estão situados respectivamente a  $183 \pm 1,25$  [182-185] (n=2) e 840 (n=1) da extremidade anterior. O vestíbulo e as asas cervicais apresentam 17.5 (n=1) e 55 (n=1) respectivamente. O esôfago possui  $360 \pm 12$  [347-372] (n=2) de comprimento e o bulbo  $172 \pm 12$  [160-185] (n=2) de comprimento e  $124 \pm 7$  [117-132] (n=2) de largura. Na região ventral posterior do corpo, localizam-se dois mamelões respectivamente a  $2325 \pm 0,065$  [2260-2390] (n=2) e  $2565 \pm 0,115$  [2450-2680] (n=2) da região anterior do corpo. Os mamelões localizados na parte posterior, latero-ventral do corpo direcionados para o lado esquerdo do corpo, medem  $132 \pm 10$  [122-142] (n=2) (anterior) e  $125 \pm 10$  [115-135] (n=2) (posterior). O espículo e o gubernáculo medem 580 (n=1) e  $42 \pm 2,5$  [40-45] (n=2), respectivamente. A cauda e ponta da cauda medem 390 [360-420] (n=2) e 318 [297-340] (n=2), respectivamente.

### **Sumário Taxonômico**

*Helminthoxys freitasi* Quentin, 1969

Hospedeiro: *Mesomys hispidus* (Desmarest, 1817).

Sítio de infecção: Intestino grosso

Localidade: Municípios de Porto do Acre, Xapuri e Senador Guiomard, do estado do Acre, Brasil.

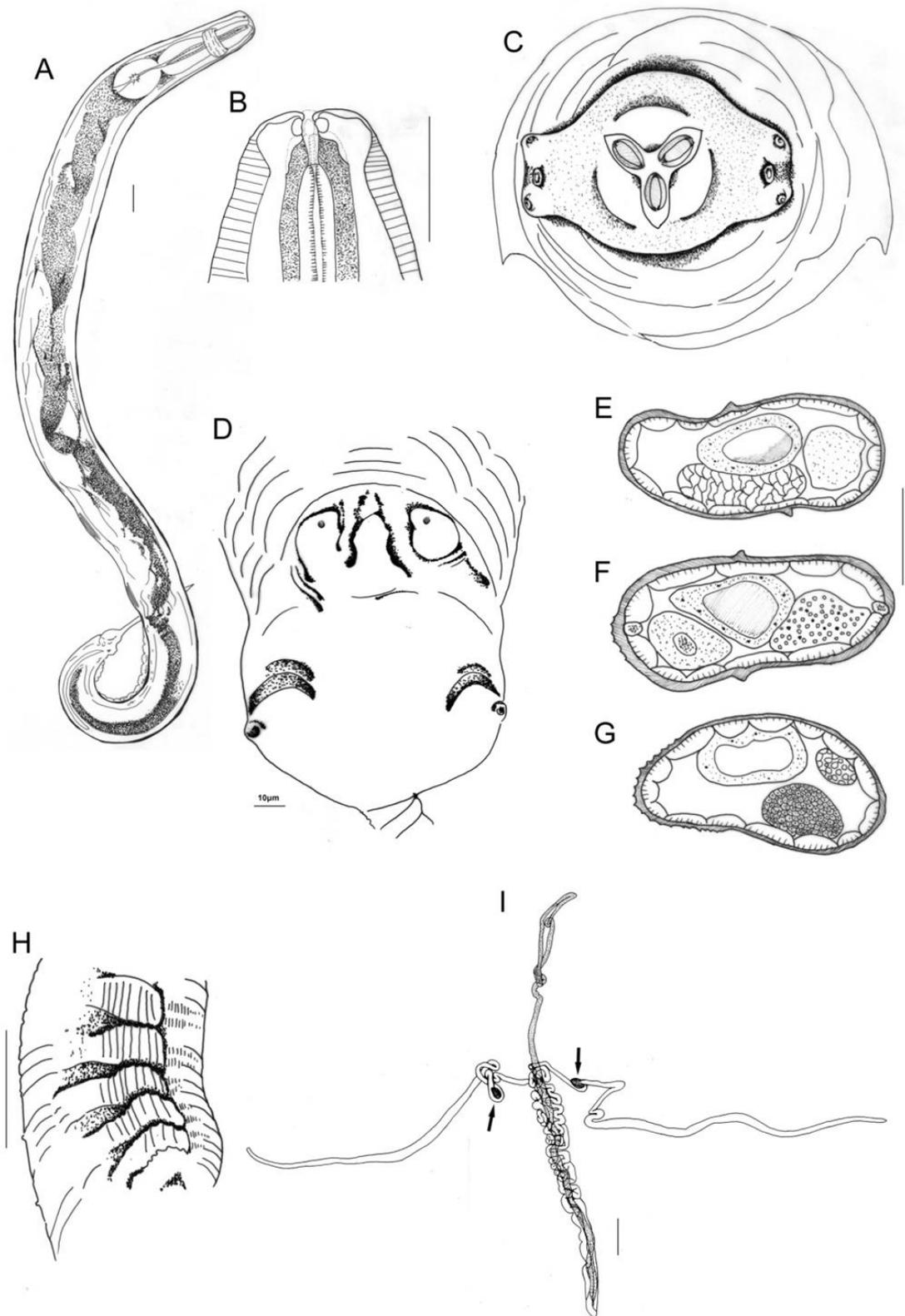
Coordenadas: (9°54'17,70"L 67°17'8,01"O; 10°49'40,79"L 68°21'38,89"O; 10°09'39,0"L 67°44'17,6"O ).

Prevalência: 45,4 % (5 roedores positivos em 11 coletados).

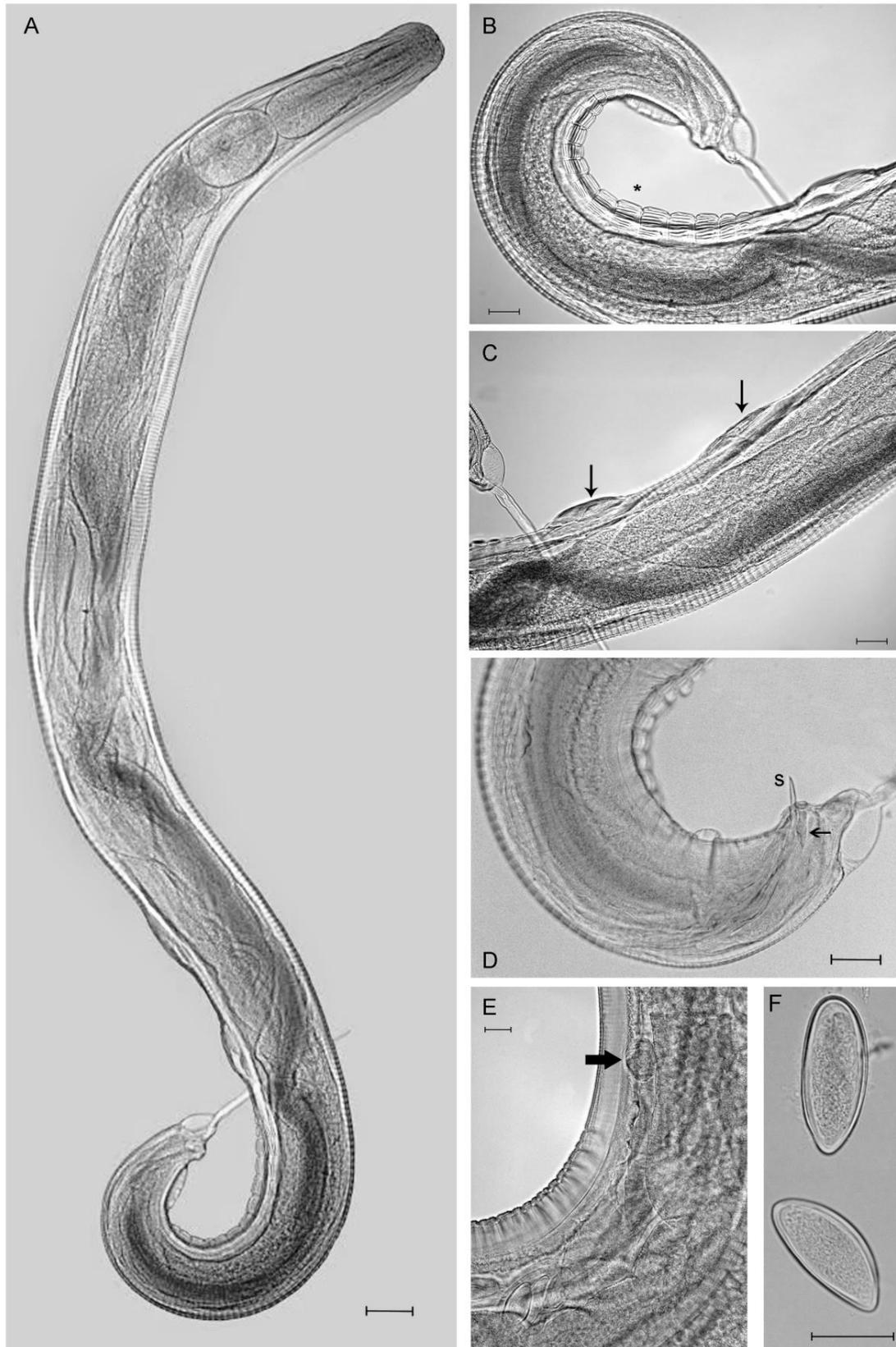
Intensidade média de infecção: 6,2 (31 espécimes de helmintos / 5 roedores positivos).

Abundância de espécies: 2,81(31 espécimes de helmintos / 11 roedores coletados).

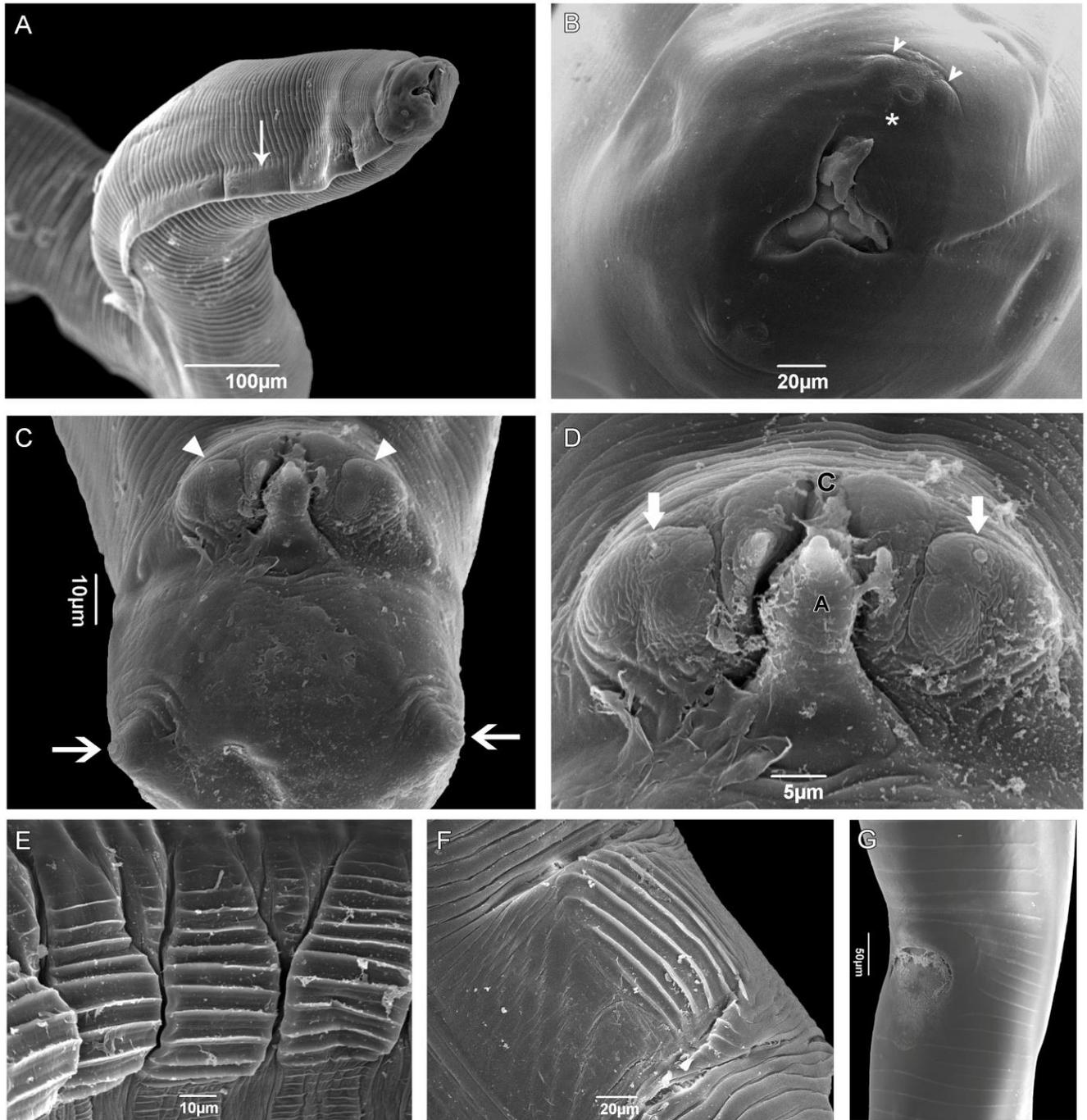
Espécimes representativos: CHIOC Nº: 38502 (Depósito em meio líquido).



**Figura 9:** Desenho em câmara clara de espécimes adultos de *Helminthoxys freitasi*. A) Espécime adulto macho, vista lateral. B) Vista lateral da região anterior, fêmea. C) Vista apical da parte anterior fêmea. D) Vista ventral da parte posterior do macho mostrando a cloaca e as papilas. E-G) Corte transversal do corpo do macho. H) Vista ventral da ornamentação ventro-lateral na parte posterior da cauda do macho. I) Útero com um par de espermatecas (setas). Escala: A, I, 100µm; B, C, D, E, F, G, H, 50 µm.



**Figura 10:** Fotomicrografia por microscopia ótica de helmintos adultos de *Helminthoxys freitasi*. A) Visão lateral de espécime macho. B) Vista lateral da cauda do macho, detalhe da ornamentação ventral posterior ao segundo mamelão (asterisco). C) Vista lateral dos dois mamelões (setas). D) Vista lateral da cauda, detalhe do espículo (S) e do gubernáculo (seta). E) Vista lateral da fêmea, detalhe da vulva (seta). F) Ovos. Escala: A, 100 $\mu$ m; B, C, D, 50  $\mu$ m; E, F, 10 $\mu$ m.



**Figura 11:** Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de helmintos adultos de *Helminthoxys freitasi*. A) Vista da parte anterior da fêmea, detalhe da asa lateral (seta). B) Vista apical da placa cefálica, anfédeo (asterisco) e duas papilas (cabeça de seta). C) Vista ventral da cauda do macho, detalhe um par de papilas sésseis (cabeça de seta) e um par de papilas pedunculadas (seta). D) Idem, detalhe da cloaca (C), mostrando um par de papilas sésseis (seta grande), gancho acessório (A). E) Ornamentação ventral posterior ao segundo mamelão. F) Detalhe da superfície do mamelão. G) Vista ventral do ânus de uma fêmea.

**Tabela 4 - Morfometria ( $\mu\text{m}$ ) de *Helminthoxys* spp., hospedeiro tipo, localidade tipo e autores.**

Características Morfométricas Machos	<i>H. caudatus</i> ( <i>H. pujoli</i> )	<i>H. effilatus</i> ( <i>H. velizy</i> )	<i>H. gigantea</i>	<i>H. quentini</i>	<i>H. tiflophila</i>	<i>H. abrocomae</i>	<i>H. urichi</i>	<i>H. freitasi</i>	<i>H. freitasi</i> Espécime em Estudo
Comprimento	5,500	6,800	6,320	5,240	6,550	11,672	3,000	5,030	3,725
Largura	330	360	-	-	340	367	200	230	230
Anel Nervoso	190	200	180	200	240	306	120	170	183
Anel Nerv. CxL	-	-	?x140	-	-	?x234	-	-	80x32,5
Poros Excretor	-	1250	1,200	1,200	1,400	1,151	900	930	840
Esôfago Total	660	800	700	730	860	957	350	370	546
Bulbo CxL	170x160	290x200	200x115	220x160	200x150	285x153	130x110	150x120	172x124
Cauda Total	930	550	900	490	650	1,365	410	475	390
Ponta da Cauda	830	420	850	-	-	1,243	350	430	319
1º Mamelão	3,100	3,400	3,400	-	-	5,938	-	2,450	2,325
2º Mamelão	3,500	3,880	3,900	-	-	7,099	-	2,730	2,565
Espículo	320	295	234	175	420	866	230 *533Hugot,86	630	580
Gubernáculo	45	50	80	38	120	152	45	60	42,5
Fêmeas									
Comprimento	11,620	20,660	13,500	12,480	19,200	21,211	8,640	13,000	10,325
Largura	530	800	420	790	800	654	600	525	407
Anel Nervoso	270	400	270	270	200	512	110	215	249
Anel Nerv. CxL	-	-	-	-	-	-	-	-	118x49
Poros Excretor	-	2,470	1,830	1,170	2,250	3,023	1,400	1,700	1,200
Esôfago Total	710	1,300	1,150	990	1,250	1,383	580	650	697
Bulbo CxL	250x190	380x250	270x180	290x270	350x-	359x205	180x180	225x200	219x179
Cauda Total	1,150	3,130	1,900	1,310	1,600	3,381	1,220	1,720	562
Ânus	212	-	-	-	-	-	-	-	-
Vulva	4,160	7,680	5,000	5,300	8,000	8,146	5,570	8,000	4,657
Ovos CxL	104x41	115x65	-	-	90x40	77x33	-	-	88x38
Hospedeiro	<i>Microcavia australis</i> (Caviidae)	<i>Lagidium viscacia boxi</i> (Chinchillidae)	<i>Octodon degus</i> (Octodontidae)	<i>Capromys pilorides</i> (Capromyidae)	<i>Mysateles prehensilis</i> (Capromyidae)	<i>Abrocoma cinérea</i> (Abrocomidae)	<i>Dasyprocta aguti</i> (Dasyproctidae)	<i>Trichomys laurentius</i> (Echimyidae)	<i>Mesomys hispidus</i> (Echimyidae)
Localidade	Argentina	Argentina	Argentina	Cuba	Cuba	Andes da Bolívia	Trindade	Pernambuco, Brasil	Acre, Brasil
Autor / Ano	Freitas, Lent & Almeida, 1937	Schuermans-Stekhoven, 1951	Quentin, Courtin & Fontecilla, 1975	Barus, 1972	Vigueras, 1943	Hugot & Gardner, 2000	Cameron & Reesal, 1951	Quentin, 1969	Presente estudo

#### 4.1.2 - Análise Filogenética

No presente estudo parte do gene da subunidade mitocondrial CO1 (MT-CO1) de dois exemplares, de dois hospedeiros de diferentes localidades, do nematódeo *H. freitasi* foram amplificados com sucesso a partir do DNA total isolado.

A partir das ampliações de parte do MT-CO1, para o espécime coletado em Senador Guimard (A) foram obtidas duas sequências com cromatogramas de boa qualidade que foram reunidas em uma sequência de consenso com 819 pares de bases (pb). Já para o espécime coletado em Porto Acre (B), foram obtidas 16 sequências com cromatogramas de boa qualidade que foram reunidas em uma sequência de consenso com 819 pares de bases (pb).

A matriz formada utilizando o fragmento de gene MT-CO1, composta por nossas sequências e as sequências provenientes do "Genbank", resultou em um total de 12 táxons, com 819 caracteres, após o alinhamento e retirada das extremidades onde as bases de parte das sequências eram desconhecidas. Dentre todos os caracteres, 528 caracteres foram constantes e 126 foram variáveis, sendo 363 informativos e 165 não informativos para parcimônia.

As curvas de saturação representadas nos gráficos (Figuras 12, 13 e 14) demonstraram que para transições (TS) nas primeiras e segundas posições dos códons houve muita saturação. As transversões (TV) também se apresentaram altas nas primeiras e nas segundas posições dos códons. Para as terceiras posições dos códons tanto as TS quanto as TV apresentaram saturações aceitáveis.

Para os resultados do Teste de Xia, considerando que nossas topologias não são totalmente simétricas e nem totalmente assimétricas, os valores de *I<sub>ss</sub>*, para toda a matriz (MT-CO1), foram menores, do que os valores *I<sub>ss.cSim.</sub>* e *I<sub>ss.cAssim.</sub>*, demonstrando que há pouca saturação nas substituições. As primeiras e segundas posições dos códons apresentaram pouca saturação, com valores de *I<sub>ss</sub>* menores, significativamente, do que os valores de *I<sub>ss.cSim.</sub>* e *I<sub>ss.cAssim.</sub>*. As terceiras posições dos códons, quando considerada uma topologia simétrica, houve saturação substancial, com valores de *I<sub>ss</sub>* menores, significativamente, que os valores de *I<sub>ss.cSim.</sub>*. Quando considerada uma topologia assimétrica, as terceiras posições dos códons apresentaram pouca saturação, sendo o valor de *I<sub>ss</sub>* maior do que o valor de *I<sub>ss.cAssim</sub>* (Tabela 5).

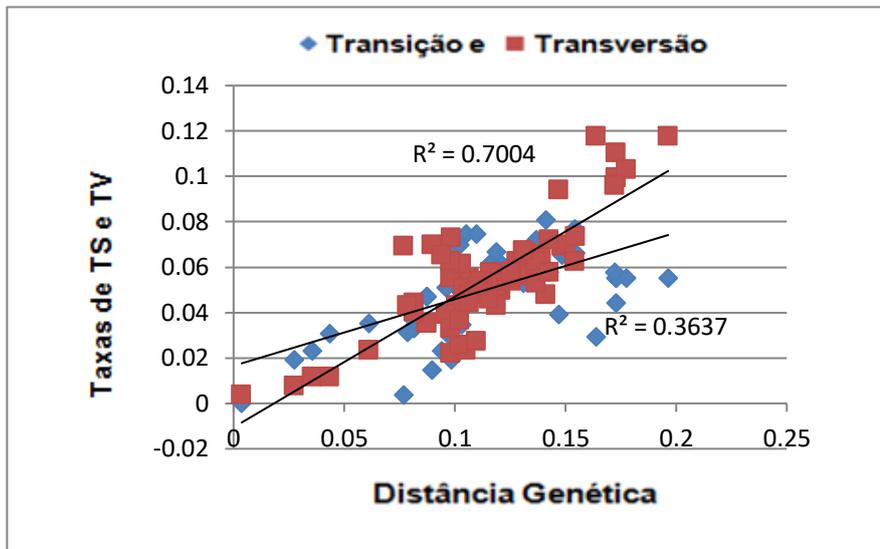


Figura 12: Gráfico de saturação das primeiras posições dos códons.

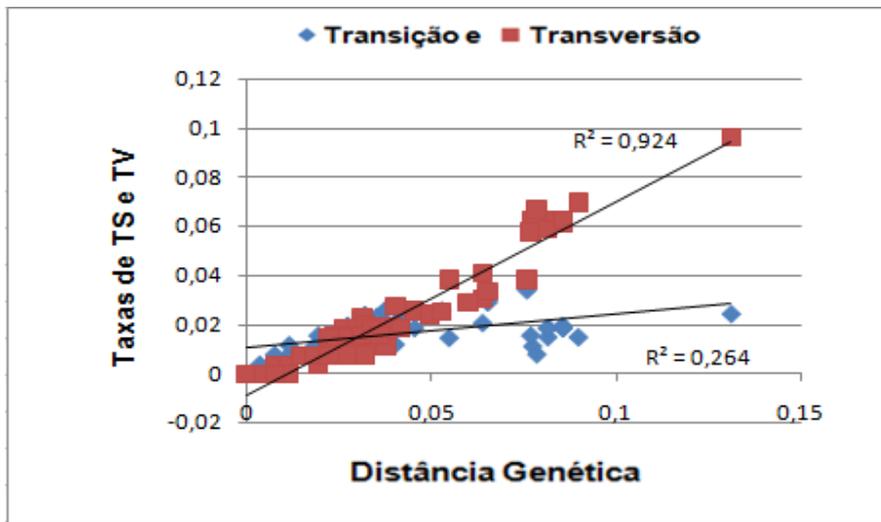


Figura 13: Gráfico de saturação das segundas posições dos códons.

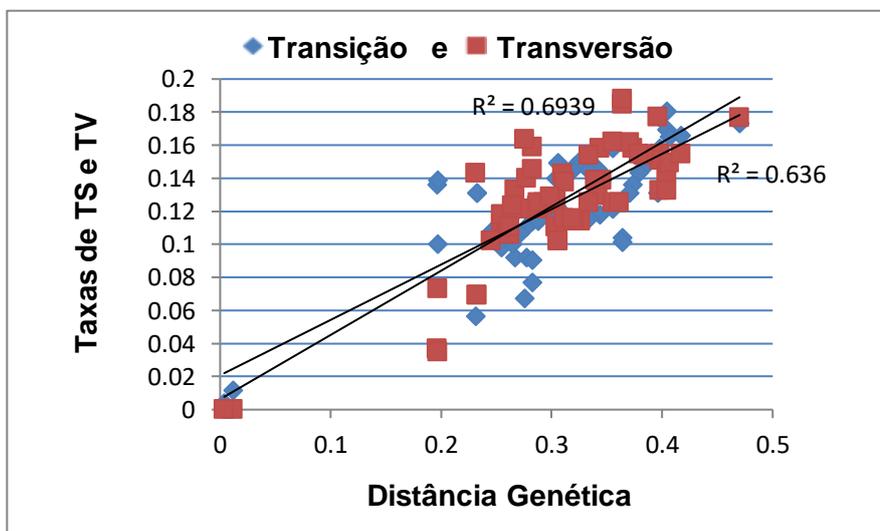


Figura 14: Gráfico de saturação das terceiras posições dos códons.

**Tabela 5** - Valores de *I*ss, *I*ss.c para topologia simétrica (*I*ss.cSim.) e *I*ss:c para topologia assimétrica (*I*ss.cAssim.) de toda a matriz, e as 1º, 2º e 3º posições dos códons; e respectivos valores de *p*.

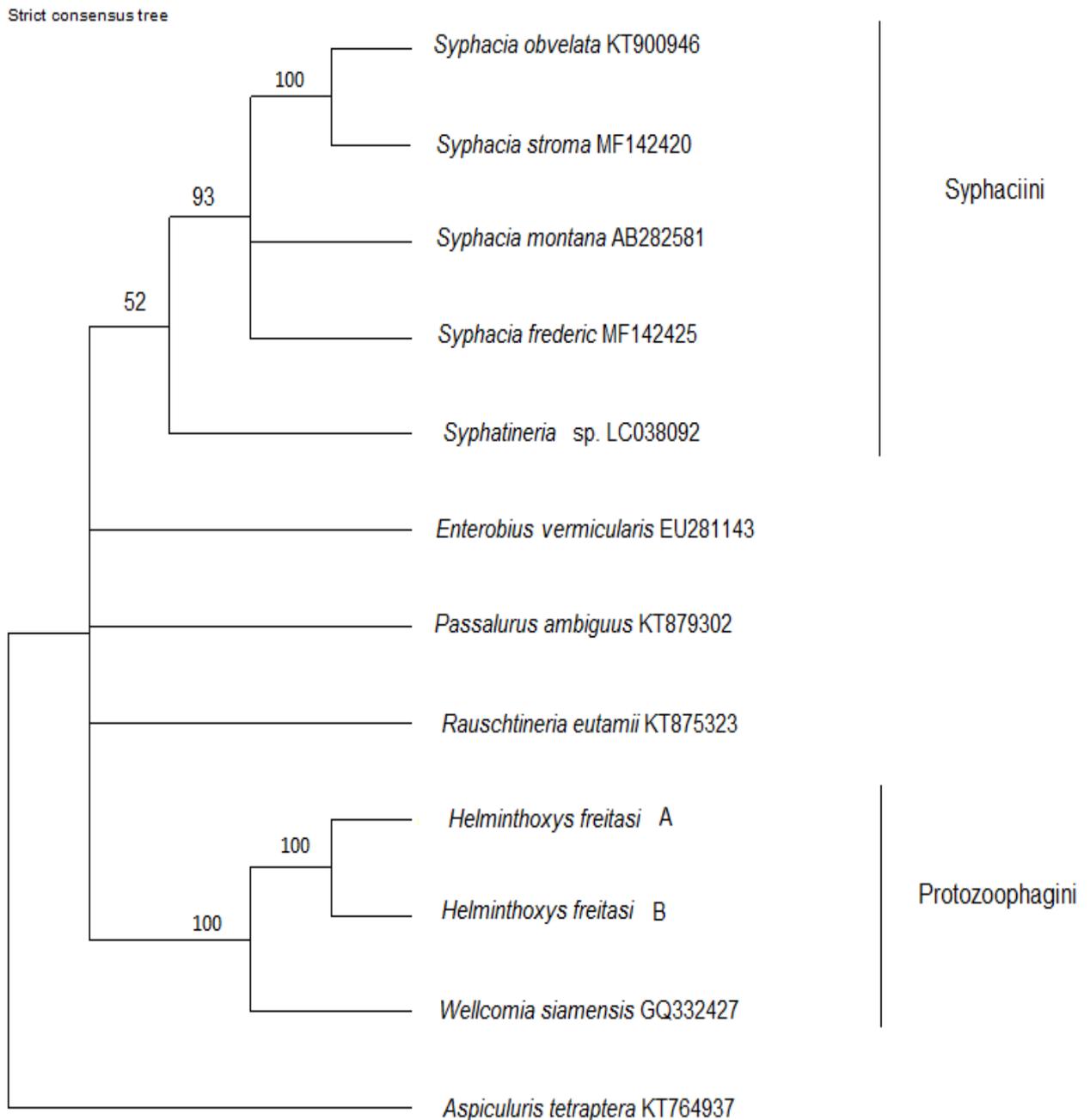
	<i>I</i> ss	<i>I</i> ss.cSim	<i>p</i>	<i>I</i> ss.cAssim.	<i>p</i>
<b>Matriz</b>	0,2834	0,7543	0,0000	0,5921	0,0000
<b>1º Posição do Códon</b>	0,2313	0,6889	0,0000	0,5266	0,0000
<b>2º Posição do Códon</b>	0,1598	0,6889	0,0000	0,5266	0,0000
<b>3º Posição do Códon</b>	0,6114	0,6889	0,0348	0,5266	0,2120

#### *Resultados das Reconstruções Filogenéticas por Máxima Parcimônia*

A análise de máxima parcimônia (MP) resultou em uma árvore de consenso estrito a partir das cinco árvores mais parcimoniosas com 2682 passos (Figura 15).

Nas reconstruções filogenéticas por MP, as duas espécies do gênero *Helminthoxys freitasi* formaram um grupo monofilético com *bootstrap* (BP) de 100%. A espécie *Wellcomia siamensis* aparece irmã do grupo citado com *bootstrap* (BP) de 100%.

Dois clados foram obtidos e identificados como tribo Syphaciini e Protozoophagini. O clado da tribo Syphaciini apresentou 53% de BP, porém entre os representantes do gênero *Syphacia* encontramos 93% de BP, enquanto o clado da tribo Protozoophagini apresentou 100% de BP. As espécies *E. vermicularis*, *P. ambiguus* e *R. eutamii* formaram uma politomia (BP ≤ 50%).

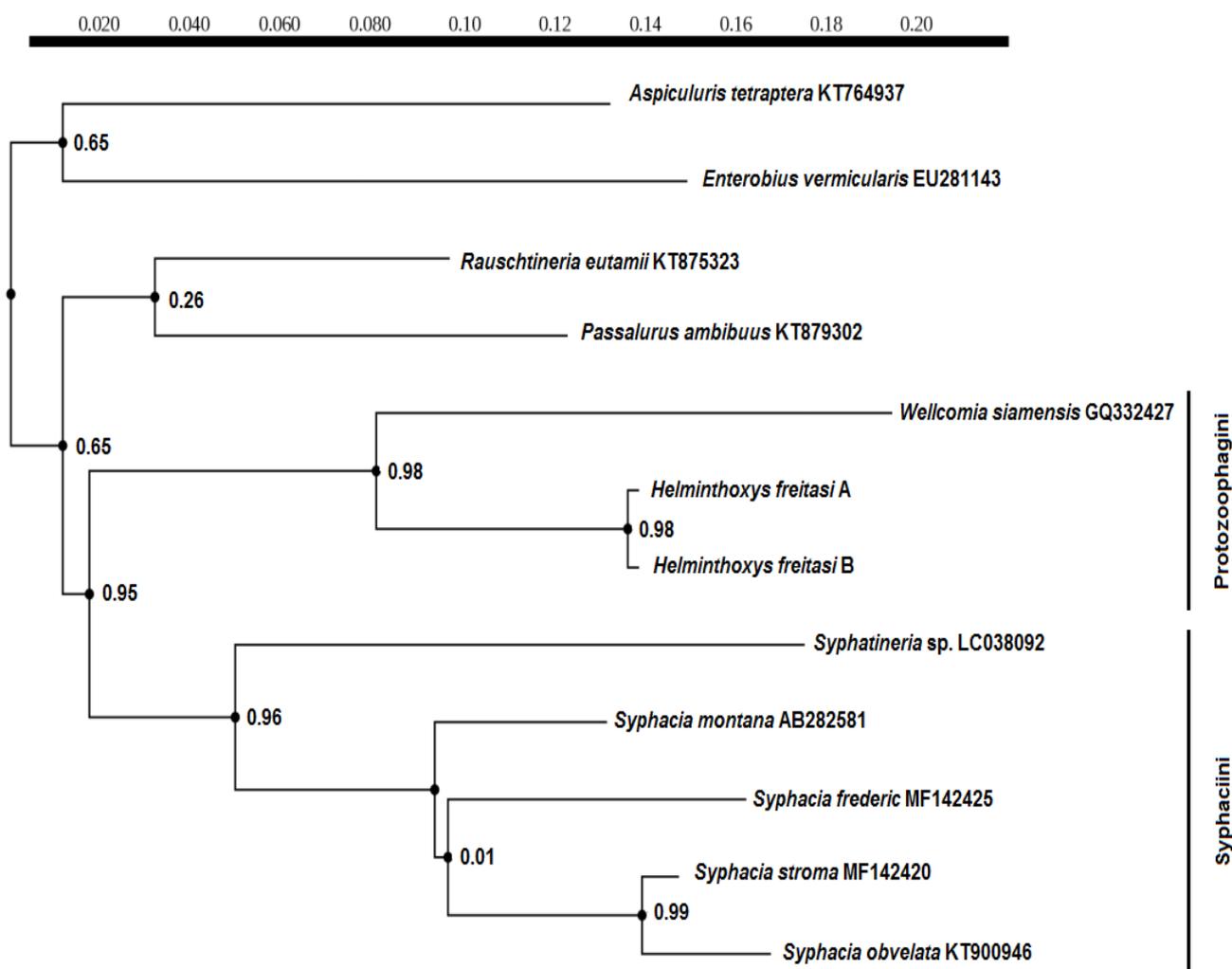


**Figura 15:** Reconstrução filogenética de sequências do gene MT-CO1 de 11 táxons da família Oxyuridae e um táxon como grupo externo pelo método de máxima parcimônia (MP): árvore de consenso estrito das cinco mais parcimoniosas, com 2682 passos; obtidas por meio de busca heurística por adição de passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos TBR (*tree bisection and reconnection*) com 10.000 réplicas; Valores de *bootstrap* obtidos com 10.000 réplicas estão representados acima dos ramos.

### Resultados das Reconstruções Filogenéticas por Máxima Verossimilhança

A análise de máxima verossimilhança (ML) resultou em uma árvore mais verossímil com LnL -3541.75522 (Figura 16). As frequências estimadas de bases foram para: A = 0,19486; C = 0,08549; G = 0,23376 e T = 0,48589.

Nas reconstruções filogenéticas por ML, os espécimes de *H. freitasi* formaram um grupo monofilético com 98% de *bootstrap*. O gênero *W. siamensis* formou um grupo irmão com 98% de *bootstrap* ao *H. freitasi*. As espécies de *Syphacia* spp. formaram um grupo irmão de *Syphatineria* sp. com 96% de *bootstrap*. As duas tribos Protozoophagini e Syphaciini formaram um grupo irmão com 95% de *bootstrap*. A espécie *E. vermicularis* agrupou com a espécie *A. tetraptera*, que é o grupo externo com um suporte baixo 65%. Já as espécies *P. ambiguus* e *R. eutamii* formaram um clado com suporte baixíssimo 26% (BP ≤ 50%).

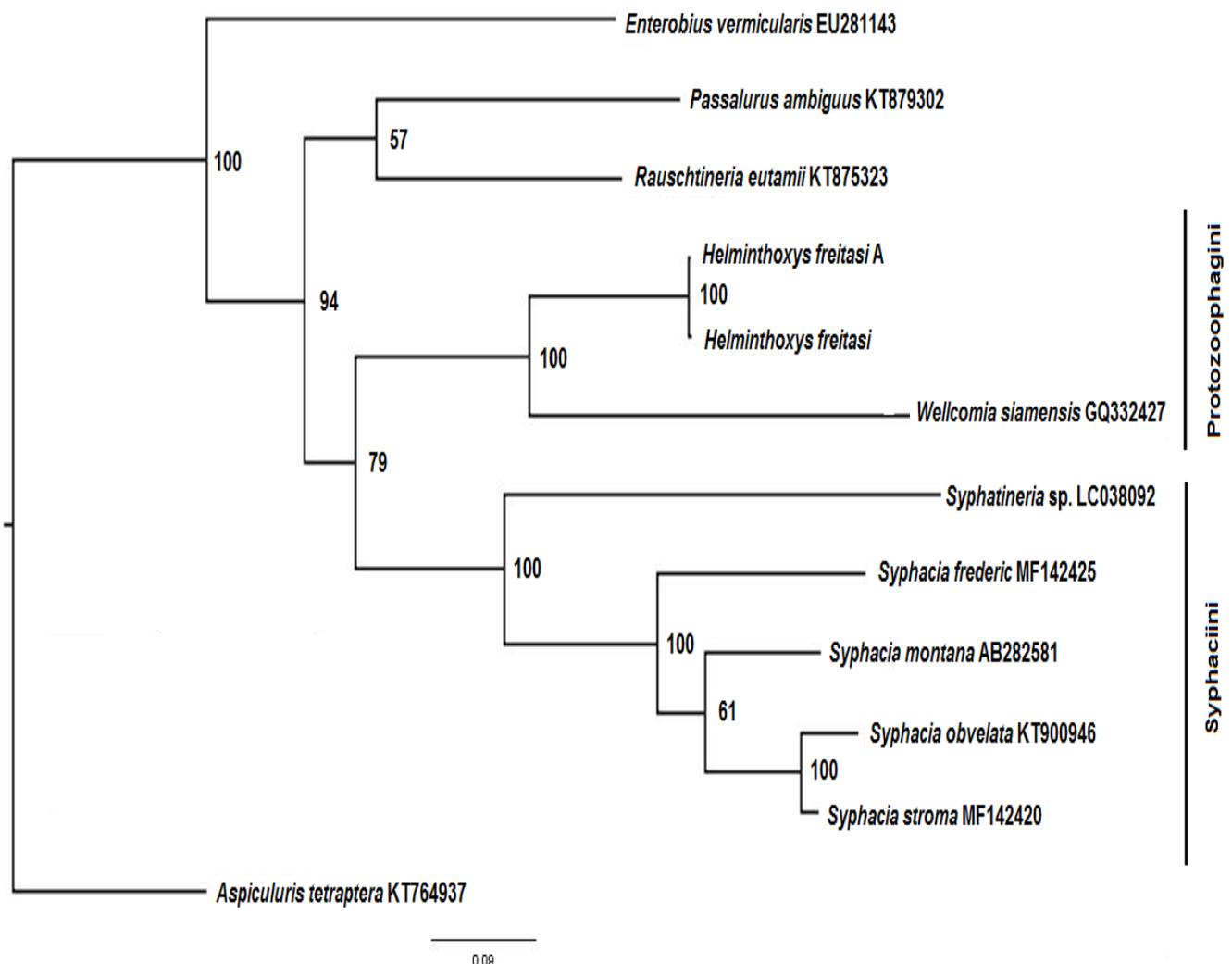


**Figura 16:** Reconstrução filogenética de seqüências do gene MT-CO1 pelo método de máxima verossimilhança (ML). Filograma da árvore obtida por meio de busca heurística por adição de passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR (*tree bisection and reconnection*). Modelo TN93.

### Resultados das Reconstruções Filogenéticas por Inferência Bayesiana

A análise de inferência bayesiana (IB) resultou em uma árvore consenso pela regra de maioria de 50% (Figura 17). Nas reconstruções filogenéticas por inferência bayesiana (IB), espécies do gênero *H. freitasi* e a espécie do gênero *W. siamensis* formaram um grupo monofilético, com probabilidades posteriores bayesianas (BPP) de 100%. O clado formado pelos gêneros da tribo Syphaciini apresentou 100% BPP.

Os gêneros *P. ambiguus* e *R. eutamii* formaram um clado apresentando 57% BPP, sendo este clado irmão ao grupo das tribos Syphaciini e Protozoophagini com 94% de BPP. O gênero *E. vermicularis* é representante da subfamília Enterobiinae, apresentando-se assim como grupo irmão com 100% de BPP para as espécies da subfamília Oxyurinae.



**Figura 17:** Reconstrução filogenética de sequências do gene MT-CO1 pelo método de inferência bayesiana (IB): árvore de consenso pela regra de maioria (50%). Os números dos ramos são os valores das probabilidades posteriores bayesianas.

#### 4.1.3 Discussão

##### Aspectos taxonômicos

Ao realizar a análise morfológica destes espécimes concluímos se tratar da espécie *Helminthoxys freitasi* pela presença de dois mamelões no corpo, de ornamentações ventrais, pelo tamanho do espículo e do gubernáculo e pela localização da vulva nas fêmeas, que se encontra na parte posterior do corpo.

O gênero *Helminthoxys*, proposto por Freitas, Lent e Almeida (1937) é caracterizado por possuir corpo com cutícula estriada transversalmente, presença de asas cervicais, boca trilabiada, esôfago com bulbo posterior. São ovíparos, com ovos assimétricos, fêmeas com vulva na parte posterior do corpo, cauda longa e afilada. Os machos apresentam na face ventral do corpo dois mamelões e ornamentações ventrais situadas antes da abertura cloacal. Espículo único, gubernáculo presente e três pares de papilas, sendo dois pares de papilas laterais e um par de papilas pós-cloacais.

O gênero possui atualmente oito espécies, destas *H. caudatus* Freitas, Lent & Almeida, 1937 (sin. *H. pujoli*, Quentin, 1973), é designada a espécie tipo, coletada em *Microcavia australis* (sin. *Caviella australis*) (I. Geoffroy & d'Orbigny, 1833), da Argentina; *H. tiflophila* Viguera, 1943 encontrada em *Mysateles prehensilis* (Poeppig, 1824) de Cuba; *H. effilatus* Schuurmans-Stekhoven, 1951 (sin. *H. velizi* Parra Ormenõ, 1953) coletada em *Lagidium viscacia boxi* (Thomas, 1921) da Argentina; *H. urichi* Cameron & Reesal, 1951 ocorre em *Dasyprocta aguti* (Linnaeus, 1766) de Trinidad e Tabago; *H. freitasi* Quentin, 1969 encontrado em *Trichomys laurentius* (sin. *Cercomys cunicularius*) (Lund, 1839) do Brasil; *H. quentini* Barus, 1972 encontrado em *Capromys pilorides* (Say, 1822) de Cuba; *H. gigantea* Quentin, Courtin & Fontecilla, 1975 encontrado em *Octodon degus* (Molina, 1782) da Argentina e *H. abrocomae* Hugot & Gardner, 2000 descrita em *Abrocoma cinerea* (Thomas, 1919) do Andes da Bolívia.

O oxiurídeo *H. freitasi* distingue-se das outras espécies do gênero por possuir pseudolábios dilatados; o espículo afunilado e a vulva abrindo-se na metade posterior do corpo. A posição da vulva posterior em relação ao corpo é observada em apenas duas espécies, *H. freitasi* e *H. urichi*, que resulta no maior tamanho do espículo nos machos dessas espécies em relação às demais espécies. Porém os mamelões dos machos da espécie *H. urichi* são mais desenvolvidos e localizados mais posteriormente quando comparado com os machos da espécie *H. freitasi*.

Apenas duas espécies pertencentes ao gênero *Helminthoxys* foram relatadas para o Brasil: *H. freitasi* parasitando o equimiídeo *Trichomys laurentius* no município de Exú no estado de Pernambuco e *H. urichi*, encontrado parasitando *Dasyprocta* sp. no município de Manaus, no estado do Amazonas (Pinto & Gomes, 1980). Posteriormente Gonçalves e colaboradores (2006) relataram a ocorrência de *H. urichi* em *D. fuliginosa* no município de Barcelos, também no estado do Amazonas. Subsequentemente essa espécie foi também relatada parasitando *Dasyprocta prymnolopha* no município de Teresina, no estado do Piauí (Macedo, 2008).

Estudos anteriores demonstraram a alta especificidade de *Helminthoxys* por seus hospedeiros, evidenciando que sua distribuição possua filogenia paralela a da família de seus hospedeiros (Hugot, 1988, Hugot *et al.*, 2013). *Helminthoxys freitasi* foi descrito inicialmente como parasita de *T. laurentius* no bioma Caatinga e no presente trabalho ampliamos a distribuição geográfica para a espécie ao bioma Amazônia. Também foi corroborado o limite de especificidade parasitária dos roedores da família Echimyidae, uma vez que o roedor do gênero *Mesomys*, está incluso da tribo Echimyini, enquanto o roedor *T. laurentius* pertencente à tribo Myocastorini. Sugerimos assim que *H. freitasi* possa ser encontrado parasitando outras espécies de roedores da família Echimyidae e não se encontrar restrito aos biomas Caatinga e Amazônia.

Quentin (1969) apresentou uma descrição taxonômica clássica baseando-se apenas em dados obtidos por microscopia de luz (ML). O presente trabalho utiliza além da ML, microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo o primeiro a descrever o gênero por essa técnica, acrescentando detalhes morfológicos que são de difícil visualização por microscopia de luz contribuindo assim, com a taxonomia da espécie. Foram incluídas também a morfometria dos ovos, a distância do ânus a extremidade da cauda e do anel nervoso a extremidade anterior.

### **Aspectos Filogenéticos**

A subfamília Syphaciinae Railliet, 1916 (*sensu* Hugot, 1988) possui várias tribos, dentre elas a tribo Protozoophagini é composta por três gêneros: *Helminthoxys* Freitas, Lent & Almeida, 1937; *Wellcomia* Sambon, 1907 e *Protozoophaga* Travassos, 1923 com base em caracteres morfológicos de estruturas genitais de machos e placas cefálicas, de acordo com algumas sinapormofias que ambos os gêneros possuem (Hugot, 1988).

Estudos baseados em inferência filogenética molecular confirmaram a relação evolutiva entre *Wellcomia* e *Protozoophaga* (Nadler *et al.*, 2007). Verifica-se, entretanto, a ausência de estudos filogenéticos com base em sequências moleculares que incluam na tribo Protozoophagini, representantes do gênero *Helminthoxys*, e a tribo Syphaciini. Em nosso trabalho, analisamos por sequências moleculares (MT-CO1) espécies representantes das tribos Syphacini e Protozoophagini.

Nossas reconstruções filogenéticas obtidas por máxima verossimilhança (ML), por máxima parcimônia (MP) e inferência bayesiana (IB) apontaram os espécimes de *H. freitasi* (A e B) como um grupo monofilético. O gênero *W. siamensis* foi obtido em todas as análises, com suporte alto, como grupo irmão de *H. freitasi*, caracterizando assim a relação entre os dois gêneros.

O clado formado pelos gêneros *Syphatineria* sp. e *Syphacia* spp., representantes da tribo Syphaciini, foi obtido apenas por MP, com baixo suporte. Já nas topologias por ML e IB esse clado apresentou um alto suporte.

A relação entre as duas tribos, Syphaciini e Protozoophagini, obtiveram alto suporte para as topologias de ML e IB, e com baixo suporte para MP.

Nossos dados corroboram trabalhos anteriores realizados por morfologia (Hugot, 1988; Hugot *et al.*, 2013), confirmando a relação taxonomica entre os gêneros *Helminthoxys* e *Wellcomia*, mostrando a relação desses gêneros dentro da tribo Protozoophagini através da análise molecular.

## 4.2 *Boehmiella wilsoni* Luker, 1943

**Família:** Haemonchidae Durette-Desset *et al.*, 1999

**Gênero:** *Boehmiella* Gebauer, 1932

**Espécie:** *Boehmiella wilsoni* Lucker, 1943

### 4.2.1 - Análise Morfológica e Morfométrica.

Foram recuperados do estômago de *Mesomys hispidus* vinte nove nematódeos (12 fêmeas e 17 machos) pertencentes à família Haemonchidae. Nos dois sexos a extremidade anterior é formada por uma cavidade bucal, sem lábios, em forma de Y (Figuras 18 A, 21 C). Anfídeos e papilas cervicais submedianas e ventro-laterais estão presentes (Figura 22 D). Neodente presente seguido por dois pares de dentículos situados no lúmen do esôfago (Figuras 21 B, D). Anel nervoso e poro excretor situados bem próximos a extremidade anterior do corpo (Figuras 21 A, 22 A, C).

Nos machos encontra-se um par de papilas pré cloacais bem desenvolvidas (Figuras 22 F, G). Bolsa copuladora trilobada assimétrica, com lobo dorsal rudimentar (Figura 18 D). Raios dorsais com pontas trirradiadas. Raios posterolaterais, mediolaterais e externolaterais altamente quitinizados (Figura 20 A). Gubernáculo e telamon presente (Figura 18 E). Espículo curto, largo, muito complexo e quitinizado (Figuras 20 B, 22 H). Nas fêmeas a vulva apresenta borda protuberante, localizada na parte posterior do corpo (Figuras 18 B, 20 C). Útero didelfo (Figura 18B, C). Espermateca presente ao final do útero (Figura 20 F). Ovos com casca fina e hialina, larvados, em grande quantidade (Figuras 20 D, E). Ânus próximo ao final do corpo, com cauda afilada na ponta, sem espinho (Figuras 18 B, 22 E).

Todas as medidas estão registradas em milímetros. Os espécimes machos apresentam comprimento de  $15,07 \pm 1,29$  [13,66-17,32] (n=5) e  $0,25 \pm 0,03$  [0,21-0,29] (n=5) de largura. O anel nervoso e o poro excretor situados respectivamente a  $0,30 \pm 0,01$  [0,28-0,31] (n=5) e  $0,35 \pm 0,03$  [0,32-0,39] (n=5) da extremidade anterior. O esôfago com  $0,94 \pm 0,05$  [0,86-1,01] (n=5) de comprimento. Espículo com comprimento médio de  $0,31 \pm 0,01$  [0,29-0,33] (n=10). Gubernáculo  $0,11 \pm 0,01$  [0,10-0,12] (n=5).

As fêmeas apresentam comprimento de  $37,06 \pm 2,85$  [36,71-39,79] (n=5) e  $0,44 \pm 0,05$  [0,37-0,50] (n=5) de largura. Comprimento do esôfago foi de  $1,33 \pm 0,11$  [1,22-1,49] (n=5). O anel nervoso e o poro excretor estão situados respectivamente a

0,37±0,03 [0,34-0,45] (n=5) e 0,39±0,05 [0,35-0,45] (n=4) da extremidade anterior. A distância da vulva e do ânus até a extremidade posterior, 7,36±0,95 [6,58-8,55] (n=4) e 0,49±0,02 [0,46-0,50] (n=3), respectivamente. Comprimento total da cauda foi de 0,35±0,06 [0,31-0,41] (n=3). O aparelho reprodutor da fêmea foi mensurado, separando entre anterior e posterior, pois as mesmas são didelficas. Parte anterior com vagina vera com 0,11±0,03[0,09-0,14] (n=3), vestíbulo 0,11±0,03[0,09-0,14] (n=4), esfíncter com comprimento de 0,11[0,11] (n=2) e largura de 0,06[0,06] (n=2), infundíbulo 0,54±0,13[0,40-0,66] (n=3) e útero com 4,48±0,39[4,11-4,97] (n=4) de comprimento. A parte posterior apresentou as seguintes medidas: vagina vera 0,11±0,03[0,07-0,14] (n=3), vestíbulo 0,11±0,01[0,10-0,12] (n=4), esfíncter com comprimento de 0,10[0,10] (n=3) e 0,07[0,06-0,07] (n=3) de largura, infundíbulo 0,54±0,14[0,46-0,70] (n=3) e útero com comprimento de 5,18±1,23[4,34-6,97] (n=4).

Foram realizados cortes transversais em dois espécimes, uma fêmea e um macho, para descrição das sínlofes no corpo. Nas fêmeas, ao nível da região cervical, as sínlofes são encontradas em número de 81, na região média do corpo encontram-se 142 e na parte posterior 90. Nos machos, ao nível da região cervical, as sínlofes são encontradas em número de 64, na região média do corpo encontram-se 126 e na parte posterior 78 (Figura 19 A-F).

Com base na revisão da literatura foi elaborada uma tabela (Tabela 6), onde são comparadas as medidas das espécies de *Boehmiella* estudadas até o momento.

### **Sumário Taxonômico**

*Boehmiella wilsoni* Luker, 1943

Hospedeiro: *Mesomys hispidus* (Desmarest, 1817).

Sítio de infecção: Estômago

Localidade: Fazenda Experimental Catuaba, Senador Guiomard, Acre, Brasil.

Coordenadas: 10°09'39.0"L; 67°44'17.6"O.

Prevalência: 9 % (1 roedor positivo de 11 roedores coletados).

Intensidade de infecção: 29 (29 espécimes de helmintos / 1 roedor positivo).

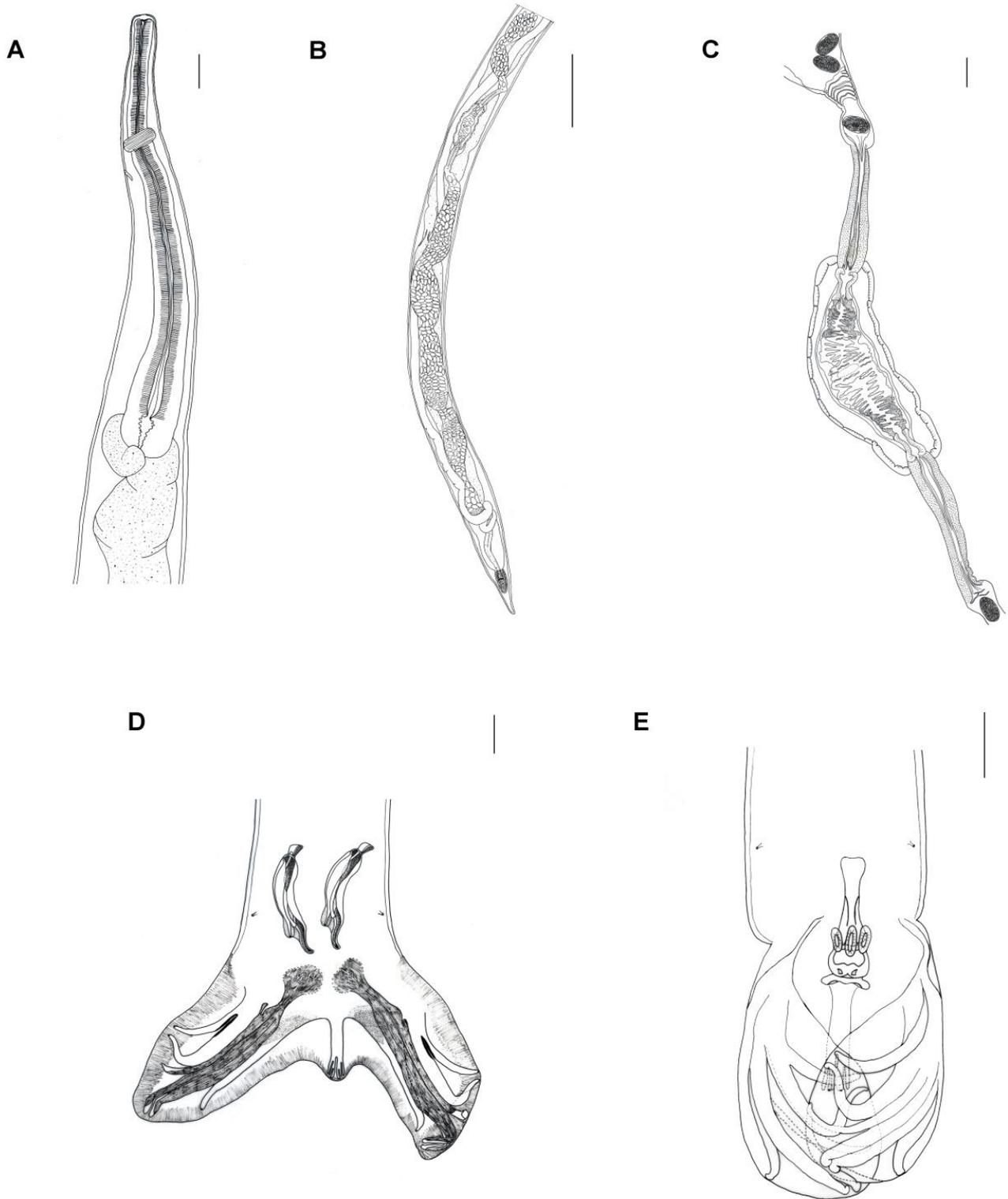
Abundância de espécies: 9,66 (29 espécimes de helmintos / 11 roedores coletados).

Espécimes representativos: CHIOC Nº: 38568 (Depósito em meio líquido).

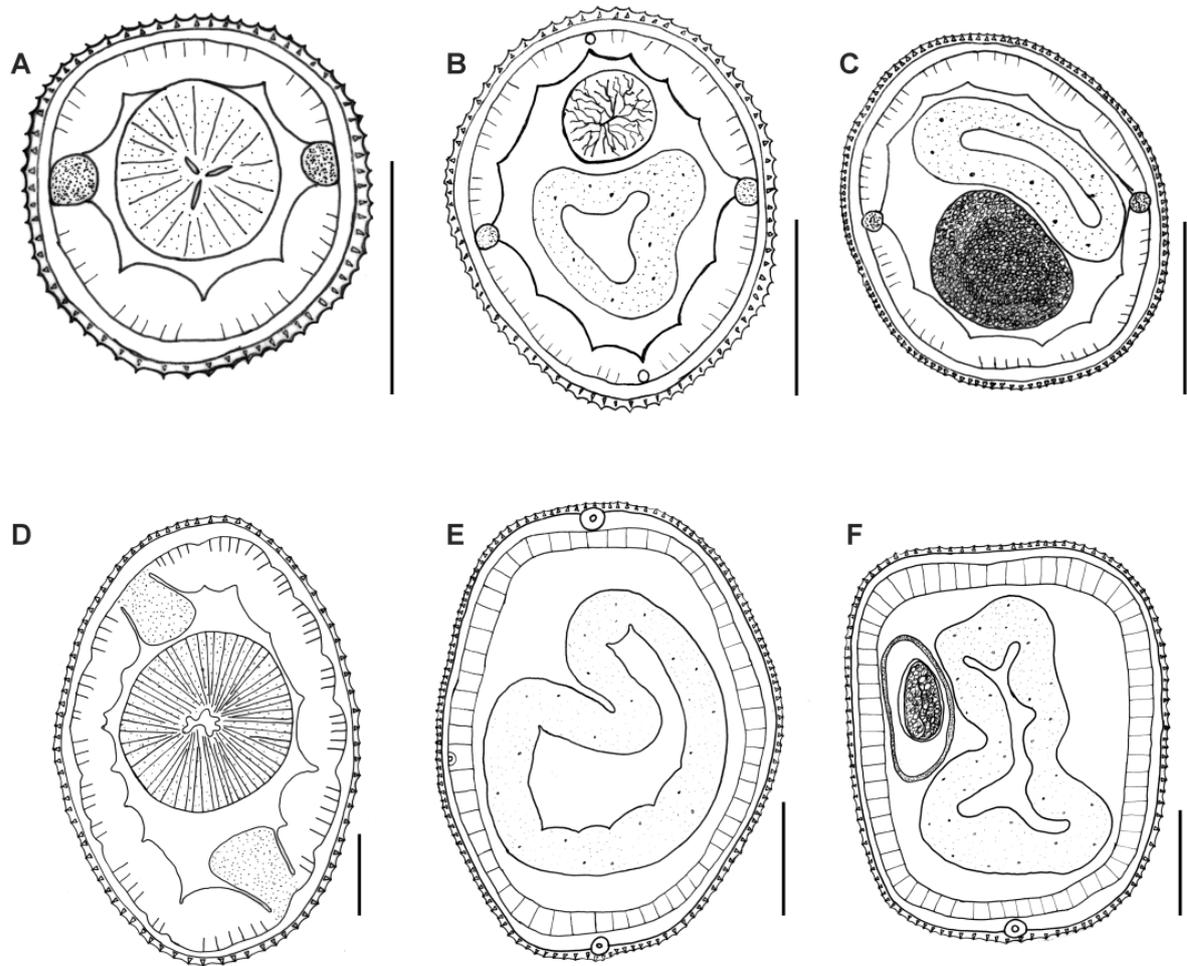
**Tabela 6** - Morfometria (mm) de *Boehmiella perichitinea* e *Boehmiella wilsoni*, hospedeiro, localidade e autores.

Características				
Morfométricas (mm)	<i>B. perichitinea</i>	<i>B. wilsoni</i>	<i>B. wilsoni</i>	<i>B. wilsoni</i>
<b>Machos</b>				
Comprimento	15-18	17,1-20,3	13,6-17,3	15,8-19,5
Largura	0,24	0,21-0,24	0,21-0,29	0,18-0,21
Esófago	-	0,84-0,94	0,86-1,01	0,87-0,96
Anel Nervoso*	-	0,32-0,45	0,28-0,31	0,29-0,48
Poros Excretor*	-	-	0,32-0,39	0,37-0,57
Tipo de Bolsa	2-1-2	2-1-2	2-1-2	2-1-2
Espículo	0,26	0,30-0,32	-	0,29-0,31
Gubernáculo	0,1	0,12-0,14	-	0,11-0,14
Telamon	Ausente	Presente	Presente	Presente
Cloaca	-	-	-	0,22-0,24
Raio Dorsal	0,2	-	-	0,17-0,18
Raios Laterais	Quitinizado	Quitinizado	Quitinizado	Quitinizado
<b>Fêmeas</b>				
Comprimento	21-25	37,3-43,3	32,4-39,7	39,3-45,9
Largura	0,24-0,31	0,40-0,58	0,37-0,50	0,34-0,46
Esófago	-	1,00-1,29	1,22-1,49	1,17-1,39
Anel Nervoso*	-	-	0,34-0,42	0,34-0,36
Poros Excretor*	-	-	0,35-0,45	0,48-0,49
Vulva	-	-	-	7,88-9
Cauda	0,32-0,37	-	-	0,38-0,46
Vagina ant.	-	-	-	0,09-0,14
Vestíbulo ant.	-	-	-	0,09-0,14
Esfíncter CxL ant.	-	-	-	0,11x0,06
Infundíbulo ant.	-	-	-	0,40-0,66
Útero ant.	-	-	-	4,1-4,9
Vagina post.	-	-	-	0,07-0,14
Vestíbulo post.	-	-	-	0,10-0,12
Esfíncter CxL post.	-	-	-	0,10x0,06
Infundíbulo post.	-	-	-	0,46-0,70
Útero post.	-	-	-	4,3-6,9
Ovos (µm)	-	88-105 x 50-62	87,5-92,5 x 52,5	85-98,4 x 49,5-54
Hospedeiro	<i>Myocastor coypus</i>	<i>Sciurus carolinensis</i>	<i>Dasyprocta variegata</i>	<i>Mesomys hispidus</i>
Localidade	Alemanha	Estados Unidos	Bolívia	Acre, Brasil
Autor / Ano	Gebauer, 1932	Lucker, 1943	Mollericonna, 2016	Presente estudo

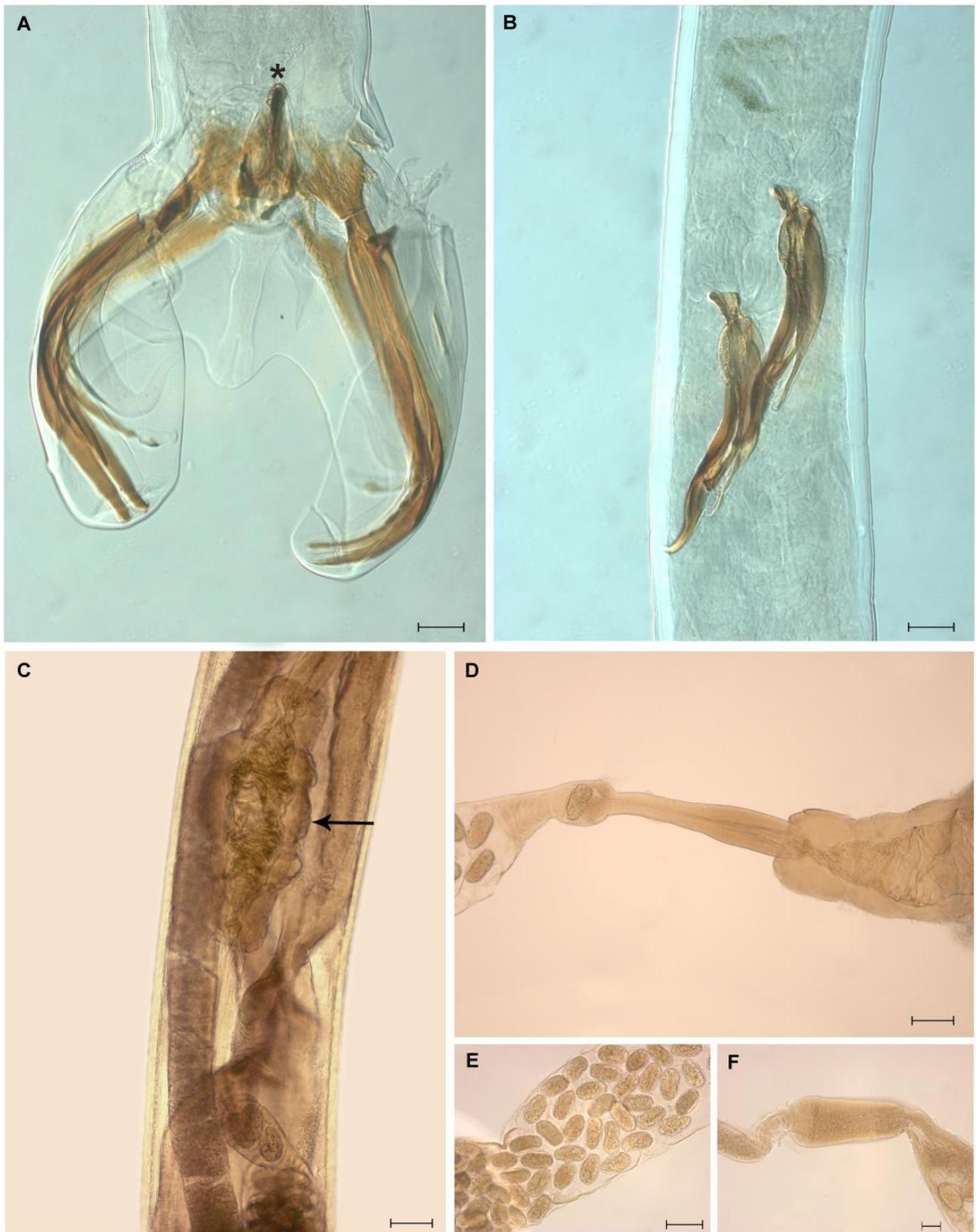
Abreviações: Asterisco (\*), distância até a extremidade anterior; ant., anterior; post., posterior.



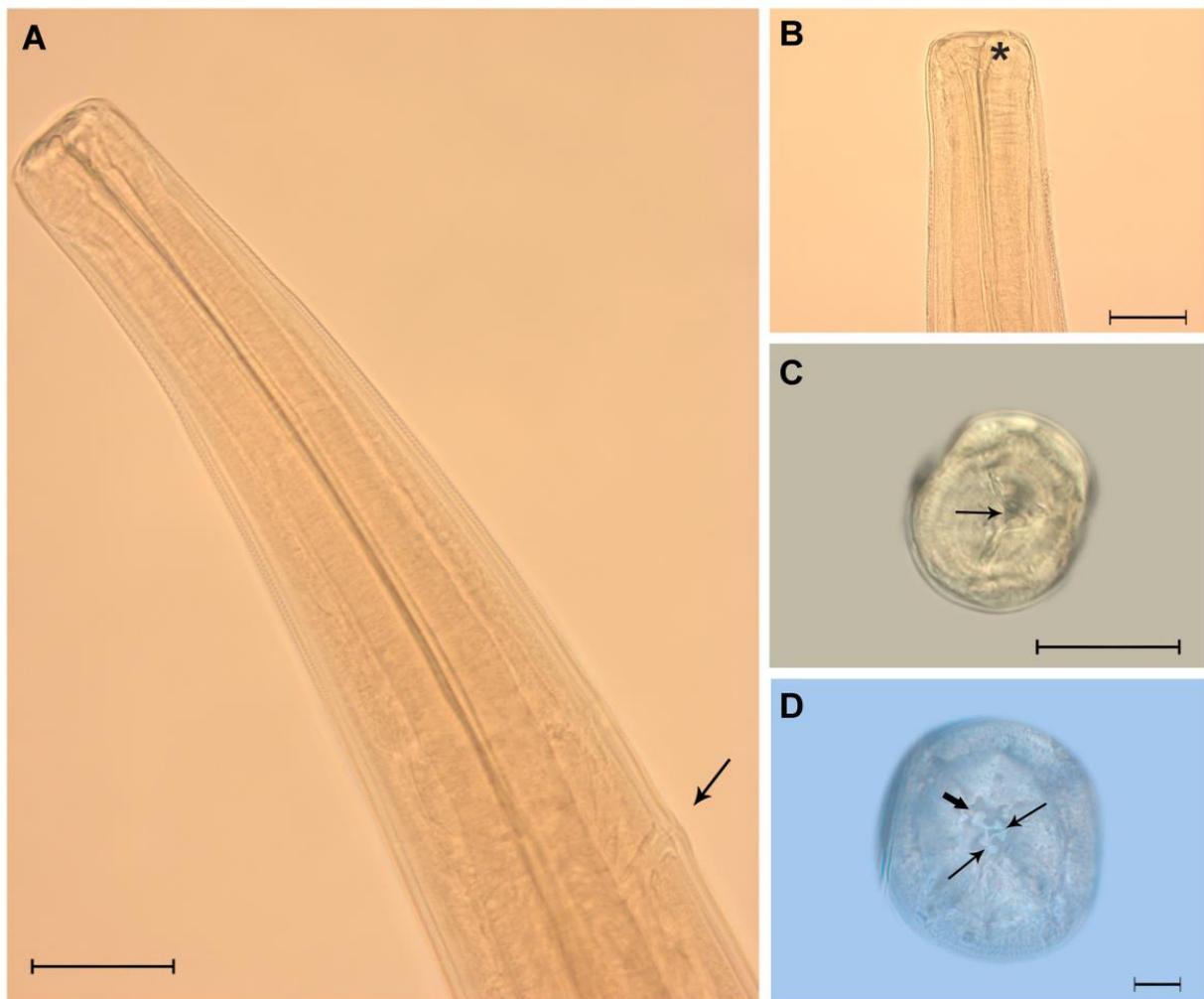
**Figura 18:** Desenhos em câmara clara de espécimes adultos de *Boehmiella wilsoni*. A) Região anterior da fêmea, vista lateral, esôfago, anel nervoso e poro excretor. B) Região posterior da fêmea, vista lateral, vulva, vagina, esfíncter, infundíbulo e útero com ovos. C) Aparelho reprodutor da fêmea dissecado, vulva, vagina, esfíncter e infundíbulo. D) Parte posterior do macho, com bolsa copuladora e raios laterais quitinizados, vista ventral. E) Parte posterior do macho com bolsa copuladora retraída, cone genital gubernáculo e telamon, vista ventral. Escala: 50  $\mu$ m.



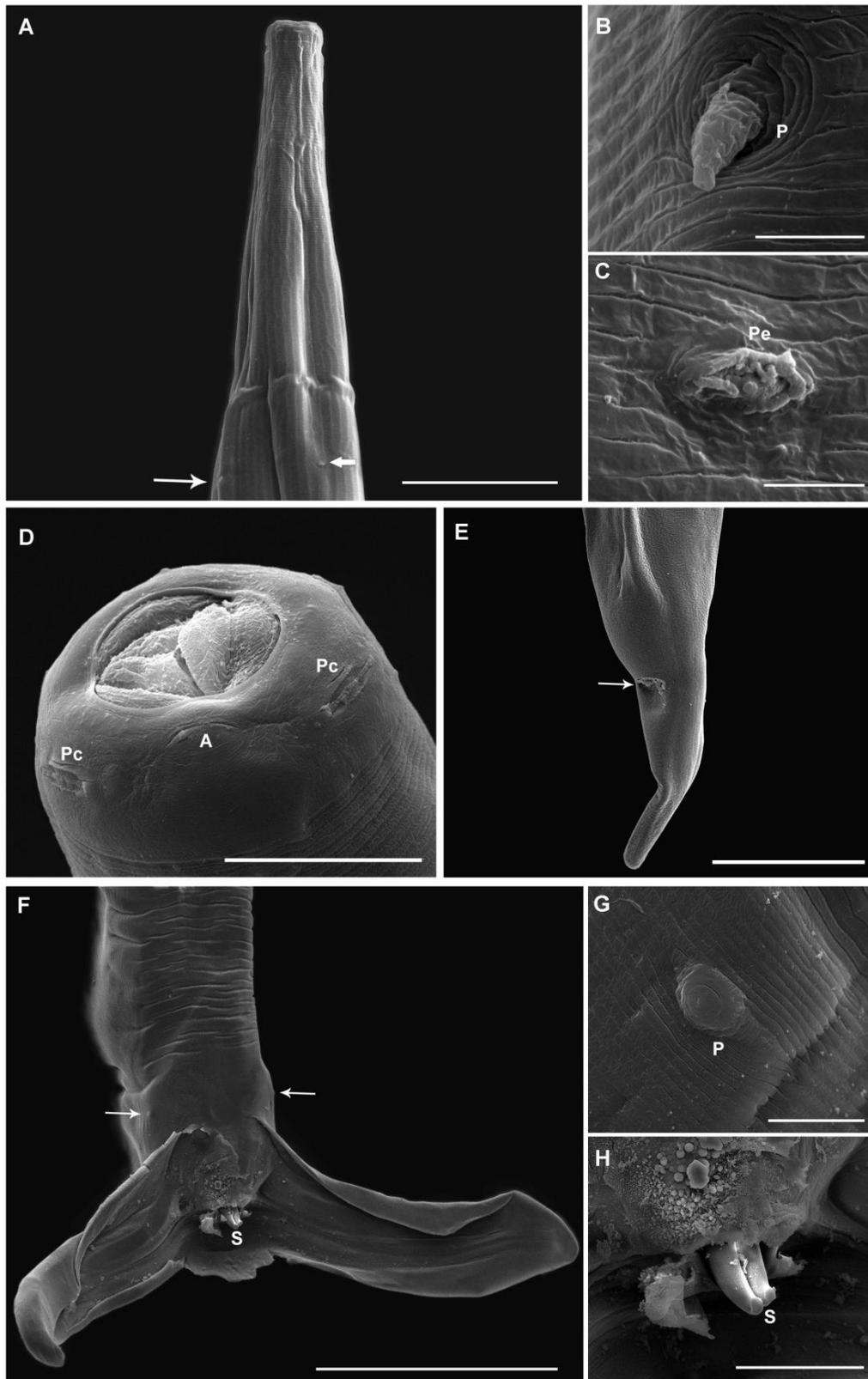
**Figura 19:** Desenhos em câmara clara de cortes transversais de espécimes adulto de *Boehmiella wilsoni*. A) Extremidade anterior, macho. B) Ao nível do corpo, macho. C) Anterior à bolsa copuladora, macho. D) Extremidade anterior, fêmea. E) Ao nível do meio do corpo, fêmea. F) Posterior a vulva, fêmea. Escala: A, B, C, E e F 50 $\mu$ m; D 10 $\mu$ m.



**Figura 20:** Fotomicrografia por microscopia de luz de helmintos adultos de *Boehmiella wilsoni*. A) Bolsa copuladora, macho, vista ventral, gubernáculo (asterisco). B) Espículos. C) Vulva (seta), fêmea, vista lateral. D) Aparelho reprodutor da fêmea dissecado. E) Útero repleto de ovos. F) Parte posterior do útero, espermateca. Escala: A, B, C, D, E, 50  $\mu$ m; F, 10 $\mu$ m.



**Figura 21:** Fotomicrografia por microscopia de luz de helmintos adultos de *Boehmiella wilsoni*. A) Parte anterior, fêmea, vista lateral, com poro excretor (seta). B) Extremidade anterior, fêmea, vista lateral, com neodente (asterisco). C) Extremidade anterior, vista apical, macho, abertura bucal (Seta). D) Corte transversal da extremidade anterior do macho com neodente (Seta grossa) e denticulos (setas finas). Escalas: A 100µm. B, C, D 50 µm.



**Figura 22:** Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de espécimes adultos macho e fêmea de *Boehmiella wilsoni*. A) Extremidade anterior, vista lateral, fêmea, papila cervical (seta fina), poro extretor (seta grossa). B) Papila cervical (P). C) Poro excretor (Pe). D) Extremidade anterior, fêmea, vista apical, papilas cefálicas (Pc), anfídeos (A). E) Parte posterior, fêmea, ânus (seta). (F) Bolsa copuladora, vista ventral mostrando papilas prébursais (setas), espículos (S). G) Detalhe da papila prebursal. H) Detalhe dos espículos. Escala: A, 100  $\mu\text{m}$ ; B, 4  $\mu\text{m}$ ; C, 3  $\mu\text{m}$ ; D, 30  $\mu\text{m}$ ; E, F, 300  $\mu\text{m}$ ; G, 10  $\mu\text{m}$  e H, 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 - Análise Filogenética

No presente estudo partes dos genes das subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal de um exemplar do nematódeo *B. wilsoni* foram amplificadas com sucesso a partir do DNA total isolado.

A partir das ampliações de partes do 28S, foram obtidas 24 sequências com cromatogramas de boa qualidade, que foram reunidas em uma sequência de consenso com 2734 pares de bases (pb). As ampliações de parte do gene da subunidade 18S do RNA ribossomal, deram origem a duas sequências com aproximadamente 798 pares de bases (pb), apresentando cromatogramas de boa qualidade.

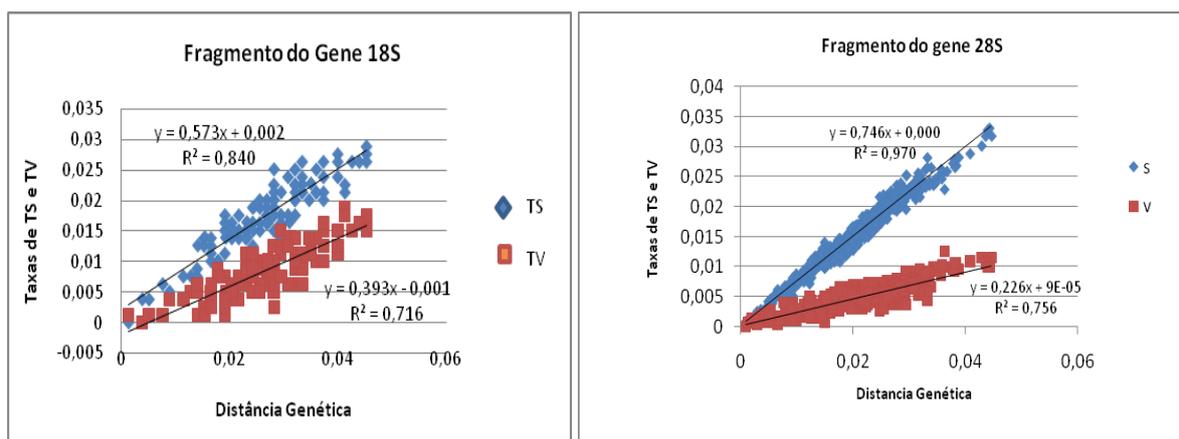
A matriz formada, utilizando o fragmento de gene 28S, composta por nossa sequência e as sequências provenientes do "Genbank", resultou em um total de 36 táxons, com 3075 caracteres, após o alinhamento e retirada das extremidades onde as bases de parte das sequências eram desconhecidas. Dentre todos os caracteres, 2734 caracteres foram constantes e 341 foram variáveis, sendo 207 informativos e 134 não informativos para parcimônia.

A matriz formada, utilizando o fragmento de gene 18S, composta por nossa sequência e as sequências provenientes do "Genbank", resultou em um total de 15 táxons, com 798 caracteres, após o alinhamento e retirada das extremidades onde as bases de parte das sequências eram desconhecidas. Dentre todos os caracteres, 724 caracteres foram constantes e 73 foram variáveis, sendo 40 informativos e 33 não informativos para parcimônia.

As matrizes de 28S e 18S foram reunidas em uma matriz concatenada com um total de 15 táxons, com 3872 caracteres, após o alinhamento e retirada das extremidades onde as bases de parte das sequências eram desconhecidas. Dentre todos os caracteres, 3527 caracteres foram constantes e 175 foram variáveis e 171 não informativos para parcimônia.

As curvas de saturação representadas nos gráficos (Figura 23) demonstraram poucas saturações para transições (TS) e transversões (TV) tanto na matriz de 28S quanto na matriz de 18S.

Para os resultados do Teste de Xia, considerando que nossas topologias não são totalmente simétricas e nem totalmente assimétricas, os valores de *I*<sub>ss</sub>, para todas as duas matrizes (28S e 18S) e para a matriz concatenada, foram menores, significativamente, do que os valores *I*<sub>ss.cSim.</sub> e *I*<sub>ss.cAssim.</sub>, demonstrando que há pouca saturação nas substituições (Tabela 7).



**Figura 23:** As relações entre as transições (TS) e as transversões (TV) dos dois fragmentos de genes (28S e 18S). As linhas de tendências foram construídas por regressão linear e apresentam seus respectivos  $R^2$ .

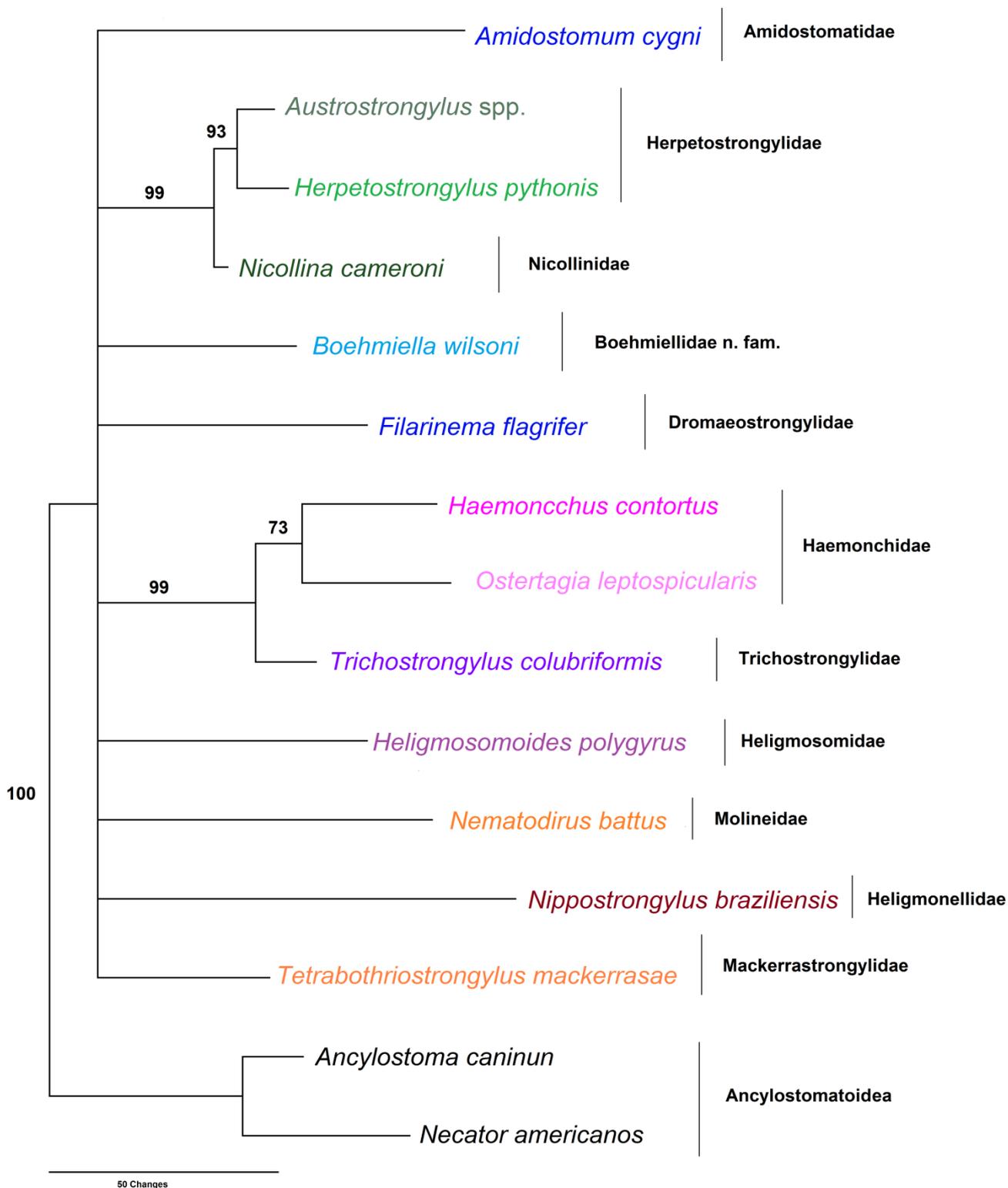
**Tabela 7** - Valores de *I*ss, *I*ss.c para topologia simétrica (*I*ss.cSim.), *I*ss.c para topologia assimétrica (*I*ss.cAssim.) e valores de *p* da matriz de 18S, 28S e a matriz concatenada.

	<i>I</i> ss	<i>I</i> ss.cSim	<i>p</i>	<i>I</i> ss.cAssim.	<i>p</i>
<b>Matriz 18S</b>	0,0357	0,7499	0,0000	0,5555	0,0000
<b>Matriz 28S</b>	0,0510	0,8050	0,0000	0,5455	0,0000
<b>Matriz Conactenada</b>	0,0459	0,8212	0,0000	0,6714	0,0000

#### *Resultados das Reconstruções Filogenéticas por Máxima Parcimônia*

A análise de máxima parcimônia (MP), para a matriz 28S, resultou em 252 árvores mais parcimoniosas com 791 passos. Para a análise de MP, para a matriz 18S, foi obtida uma árvore mais parcimoniosa com 121 passos. A análise de MP, para a matriz concatenada 28S e 18S, resultou em uma árvore mais parcimoniosa com 644 passos.

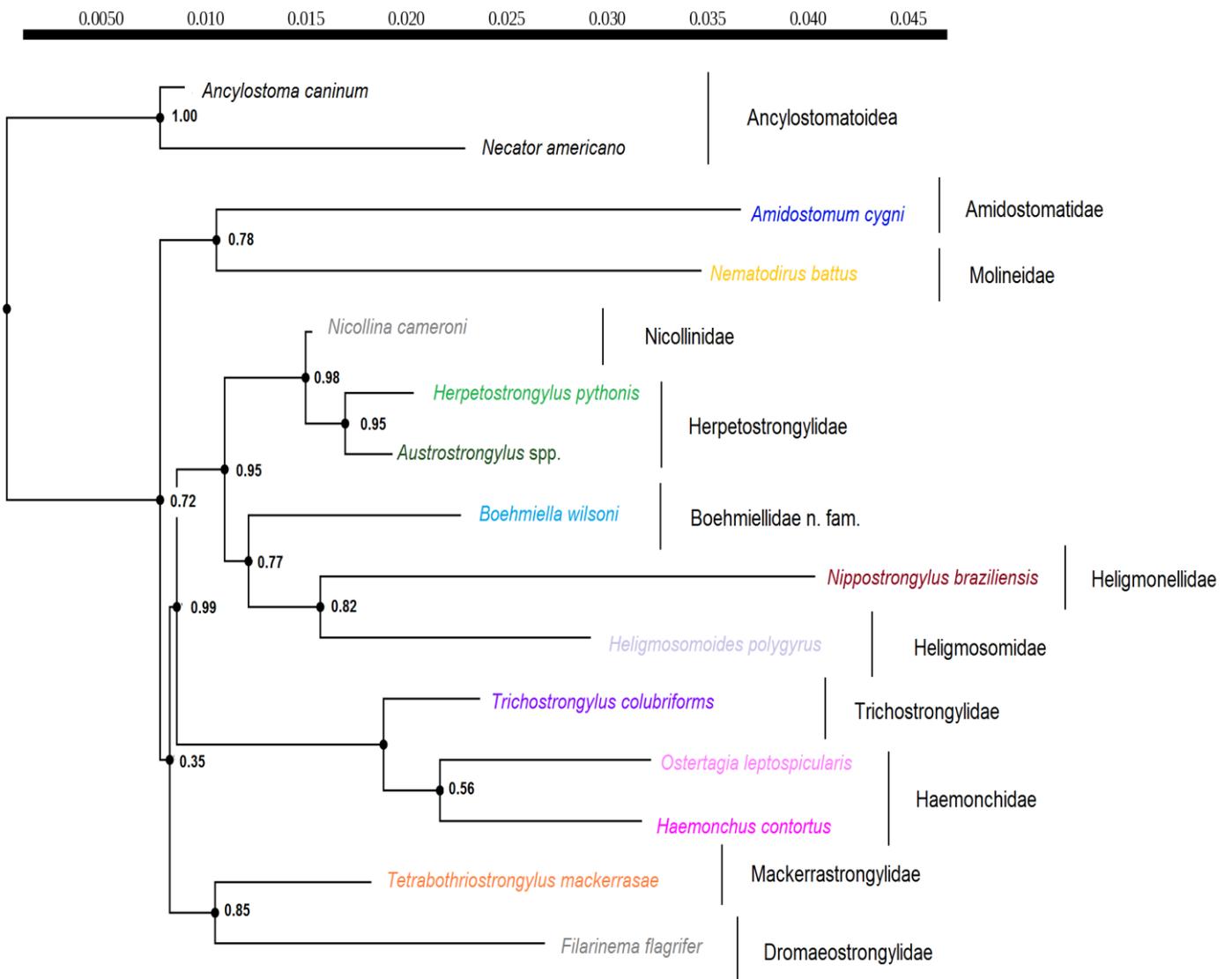
No resultado da filogenia da matriz concatenada (Figura 24) o gênero *Boehmiella* apareceu em politomia. Enquanto o grupo formado pela família australiana Herpetostrongylide e Nicollinidae apresentaram altos valores de suporte. Igualmente observado para as famílias Trichostrongylidae e Haemonchidae. Os resultados das filogenias para as matrizes de 28S e 18S, separadamente, não foram congruentes.



**Figura 24:** Reconstrução filogenética da matriz concatenada (28S e 18S), sendo 13 exemplares da superfamília Trichostrongyloidea e dois gêneros da superfamília Ancylostomatoidea como grupo externo, pelo método de MP. Cladograma da árvore de consenso estrito, sendo a mais parcimoniosa, obtida por meio de busca heurística por adição de passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos TBR (*tree bisection and reconnection*) com 10.000 réplicas. Valores de *bootstrap* obtidos com 10.000 réplicas estão representados acima dos ramos.

### Resultados das Reconstrução Filogenética por Máxima Verossimilhança

A análise de máxima verossimilhança (ML), para matriz 28S resultou uma árvore mais verossímil com LnL -8642.113107. As frequências estimadas de bases, foram para: A = 0,25175; C = 0,20711; G = 0,27756 e T = 0,26358, usando o modelo GTR+G+I. Para a matriz de 18S a análise de ML, resultou em uma árvore mais verossímil com LnL -1820.22588. As frequências estimadas de bases, foram para: A= 0,28333; C = 0,18675; G = 0,23559 e T = 0,29433, usando o modelo HKY85. A análise de ML, para matriz concatenada (Figura 25) obteve uma árvore mais verossímil com LnL -8896.73040. As frequências estimadas de bases, foram para: A = 0,25726; C =0,20367; G = 0,27352 e T = 0,26555, usando o modelo GTR.



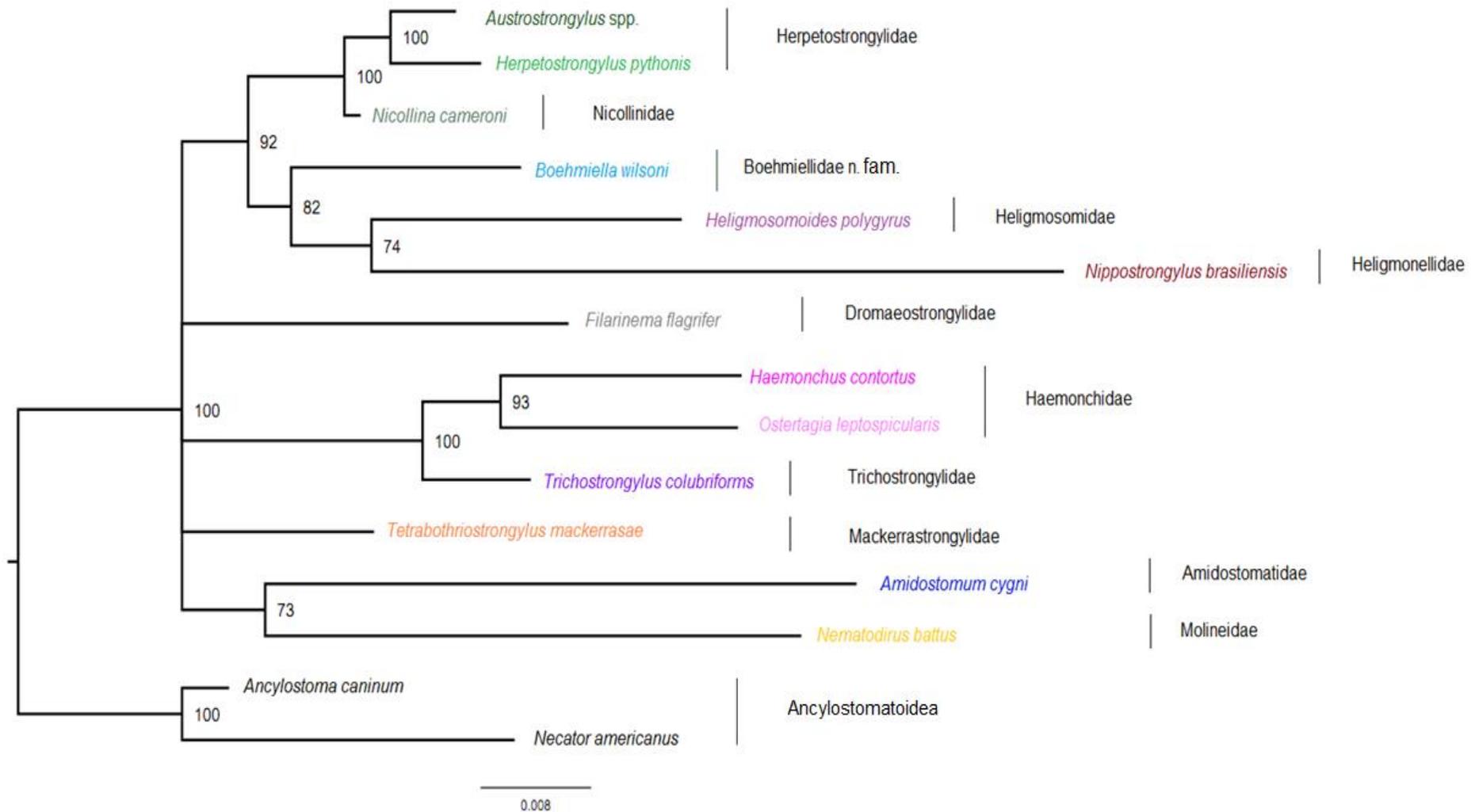
**Figura 25:** Reconstrução filogenética da matriz concatenada (28S e 18S) pelo método de máxima verossimilhança (ML). Cladograma da árvore obtida por meio de busca heurística por adição de passos (*stepwise addition*) com algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR (*tree bisection and reconnection*). Modelo GTR.

### *Resultados das Reconstrução Filogenética por Inferência Bayesiana*

A análise de inferência bayesiana (IB) resultou uma árvore consenso pela regra de maioria de 50% para matriz 28S, o gênero *Boehmiella* agrupou-se, com 62% de probabilidades posteriores bayesianas (BPP), ao grupo monofilético dos gêneros *H. polygyrus* e *N. brazilienses*. Na análise de IB, para a matriz 18S, na árvore consenso o gênero *Boehmiella* não agrupou com nenhum táxon. Na reconstrução filogenética por IB, para a matriz concatenada (Figura 26), o gênero *Boehmiella* agrupou-se, com 82% de BPP ao grupo monofilético dos gêneros *H. polygyrus* e *N. brazilienses*.

Esse clado formado por *Boehmiella* agrupou-se com 92% de BPP, na matriz concatenada, ao clado formado por três gêneros: *Nicollina*, que pertence à família Nicollinidae, *Autrostrongylus* e *Herpetostrongylus* que pertence à família Herpetostrongylidae, que obtiveram 100% de BPP entre si.

Enquanto outro clado foi formado com suporte alto de 100% para os gêneros *Haemonchus contortus* e *Ostertagia leptospicularis* da família Haemonchidae, que obtiveram 93% de BPP entre si, e o gênero *Trichostrongylus colubriformis* da família Trichostrongylidae, com 100% de BPP para os gêneros da família Haemonchidae.



**Figura 26:** Reconstrução filogenética da matriz concatenada (28S e 18) pelo método de inferência bayesiana (IB). Cladograma árvore de consenso pela regra de maioria (50%). Os números dos ramos são os valores das probabilidades posteriores bayesianas.

### 4.2.3 Discussão

#### Aspectos taxonômicos

O gênero *Boehmiella*, encontra-se atualmente classificado na família Haemonchidae de acordo com Durette-Desset *et al.*, (1999), e compreende duas espécies: *B. perichitinae* Gebauer, 1932 e *B. wilsoni* Luker, 1943. De acordo com Gebauer (1932) o gênero é caracterizado por possuir um neodente desenvolvido emergindo da parte anterior do esôfago seguido de quatro dentículos situados no lúmen do mesmo, oito papilas cefálicas e duas papilas cervicais, sem cápsula bucal e vesícula cervical, com raios laterais altamente quitinizado, gubernáculo presente e vulva situada na parte posterior do corpo.

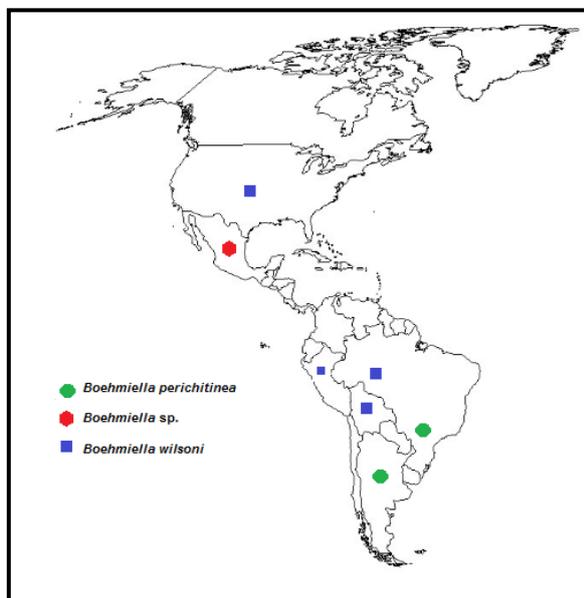
As distinções morfológicas presentes em *B. wilsoni* são papilas pré-cloacais, telamon, ausência da asa cervical, espículos de forma e orientação diferente, gubernáculo maior e fêmea com vulva situada anteriormente e maior número de cristas na sínlofe.

*Boehmiella perichitinea* foi reportada inicialmente parasitando o equimiídeo *Myocastor coypus* (Molina, 1782) na Alemanha e posteriormente em *M. coypus* no Brasil e na Argentina (Lent & Freitas 1934; Martinez *et al.*, 2004). Acredita-se que a presença de *B. perichitinea* na Europa decorra da introdução do *M. coypus*, seu hospedeiro, como espécie exótica, uma vez que esse roedor é endêmico da América do Sul.

Inicialmente *B. wilsoni* foi descrita parasitando o esquilo *Sciurus carolinensis* (Gmelin, 1788) nos Estados Unidos seguido de outros roedores incluídos como hospedeiros definitivos. Rausch & Tiner (1948) reportaram *Sciurus niger* (Linnaeus, 1758) parasitado por essa espécie nos Estados Unidos; enquanto Murphy (1952) constatou o parasitismo do roedor Cricetidae *Neotoma floridana* (Ord, 1818) nos Estados Unidos. Já, Falcón-Ordáz & García-Prieto (2004) encontraram *B. wilsoni* parasitando *Sciurus deppei* (Peters, 1863) no México, enquanto, Baquedano (2014) reportou sua ocorrência em *Cuniculus paca* (Brisson, 1762) (sin. *Agouti paca* Linnaneus, 1766) no Peru. Recentemente Mollericonna *et al.*, (2016) assinalam a espécie infectando *Dasyprocta variegata* (Tschudi, 1845) na Bolívia (Figura 27).

De acordo com os dados disponíveis na literatura verificamos que apesar dessas espécies terem sido repetidamente coletadas, a morfologia e morfometria do aparelho reprodutor das fêmeas deste gênero não foi devidamente descrito. No contexto do presente trabalho foi possível mensurar diversas estruturas internas do aparelho reprodutor das fêmeas deste helminto pela primeira vez. Ao fazer a

dissecção do espécime foi possível observar uma estrutura anatômica entre o final do útero e o início do oviducto, semelhante à espermateca, corroborada pela presença de espermatozóides o que sugere a presença de espermateca em *Boehmiella*.



**Figura 27:** Mapa de distribuição do gênero *Boehmiella* nas Américas.

Durette-Desset & Sutton (1979) posteriormente descreveram a sínlofe de *B. perichitinea* evidenciando a presença de cristas longitudinais no meio do corpo em de número de 28 nos espécimes machos e 34 nos espécimes fêmeas. Particularmente, observaram um conjunto de três cristas na metade anterior do corpo, que se encontravam espaçadas das demais. A crista central gradualmente se estende ao longo da região posterior do corpo, enquanto as duas adjacentes se desenvolvem e formam uma asa em direção a região anterior do corpo.

Falcón-Ordaz & García-Prieto (2004) foram os primeiros a descrever a sínlofe da espécie *B. wilsoni* representada por pequenas cristas perpendiculares ao eixo do corpo. Ao nível da região cervical dos espécimes fêmea os autores observaram 34 cristas, na região onde se inicia o intestino 47, na parte pré-equatorial 46 e na região média do corpo 22. Já para os machos as cristas se limitam a região média do corpo, entretanto não fornecem informação quanto ao número.

Interessante observar que Durette-Desset & Sutton (1979) descreveram a sínlofe de *B. perichitinea* evidenciando a presença de um grupo de cristas encontrada lateralmente ao corpo, que são separadas das demais. Esse conjunto de três cristas na metade anterior do corpo é reduzido a uma crista simples, enquanto

as duas cristas adjacentes são desenvolvidas e formam estruturas em forma de asas. Estas asas gradualmente diminuem de tamanho ao longo do corpo até chegar à metade posterior do corpo, onde se reduz a uma única crista.

No presente estudo verificamos que os espécimes de *B. wilsoni* provenientes de *M. hispidus* coletados no estado do Acre possuíam elevado número de cristas, discordando das observações realizadas por Falcón-Ordaz & García-Prieto (2004) para espécime parasito do esquilo *S. deppei* no México. O número reduzido de cristas e a presença de uma crista lateral desenvolvida na região anterior presente na espécie *B. perichitinea* nos sugere que Falcón-Ordaz & García-Prieto (2004) tenham analisado de fato espécimes de *B. perichitinea* e não de *B. wilsoni* como relatado pelos autores, pois os espécimes estudados apresentaram crista lateral da sinlofe desenvolvida, característica não presente em *B. wilsoni*. Os autores também utilizaram como características para identificação dos espécimes os mesmos caracteres utilizados para a identificação do gênero, tais como raios laterais quitinizados, espículos dividido em ramos e a presença de um neodente o que se revela insuficientes para determinar a espécie.

A utilização da MEV e a aplicação de cortes transversais ao longo do corpo realizadas no presente estudo permitiram corroborar detalhes do número e padrão das cristas da sinlofe de *B. wilsoni*, evidenciando nos espécimes fêmeas assim como nos machos o número de cristas é bem superior ao descrito por Falcón-Ordaz & García-Prieto (2004). Face ao menor número de cristas observadas para os espécimes estudados por Falcón-Ordaz & García-Prieto (2004) e a inconsistência de caracteres morfológicos específicos observados corroboramos a presença de *B. perichitinea* parasitando *S. deppei* no México.

### **Aspectos Filogenéticos**

Os dados obtidos pelas análises filogenéticas no presente estudo indicaram que o gênero *Boehmiella* não pertence à família Haemonchidae como proposto por Durette-Desset *et al.* (1999). O gênero apresenta-se bem suportado como um grupo monofilético que não pertencente à Trichostrongylidae (*sensu* Durette-Desset, 1985). No entanto, o gênero apresentou uma relação filogenética consistente com as famílias de trichostrongilídeos australianos (Herpetostrongylidae e Nicollinidae) consistindo as relações mais bem apoiadas estatisticamente. Para tal confirmação são propostas duas hipóteses: uma biogeográfica e outra morfológica.

Embora a primeira descrição de *Boehmiella* tenha ocorrido na Alemanha, Sutton (1971) sugere que a origem do helminto seja a América do Sul, pois o hospedeiro, *Myocastor coypus* (Echimyidae) é uma espécie invasora da região Holártica.

Durette-Desset & Sutton (1979) sugerem que o gênero *Boehmiella* seja a primeira linha evolutiva dos Haemonchidae, parasitando roedores da América do Sul e a segunda linha evolutiva tenha parasitado a maioria dos ruminantes, com distribuição cosmopolita. Nas famílias Haemonchidae e Cooperiidae os parasitos em sua grande parte infectam Artiodactyla, que tem origem Paleártica, o que nos sugere que sua diversificação inicial tenha ocorrido no Velho Mundo (Durette-Desset, 1985).

Posteriormente, Durette-Desset *et al.* (1999) postularam que durante o Mioceno Superior (acerca de 24 milhões de anos) tenha ocorrido o aparecimento do gênero *Boehmiella*, coincidindo com a entrada dos esquilos (Sciuridae) na América do Norte. Secundariamente a autora propõe que *Boehmiella* tenha invadido a região Holártica recentemente através da introdução do *M. coypus*.

Sugerimos que os helmintos ancestrais ao gênero *Boehmiella* tenham surgido durante a era Mesozóica, no período Jurássico, quando da formação do supercontinente do Sul, a Gondwana (América do Sul, África, Antártica, Austrália e Índia).

Verificamos que o gênero *Boehmiella* constitui um clado irmão de tricostrongilídeos australianos das famílias Herpetostrongylidae e Nicollinidae parasitos de marsupiais australianos. De fato, o gênero *Boehmiella* apresenta diversos caracteres morfológicos presentes em Herpetostrongylidae e Nicollinidae tais como: um neodente esofagiano robusto, espículos complexos com dois ramos e bolsa copuladora com lobo dorsal reduzido o que interpretamos representarem caracteres simplesiomórficos presentes em *Boehmiella*, Herpetostrongylidae e Nicollinidae. Para as famílias que formaram um clado com *Boehmiella*, os caracteres morfológicos compartilhados em Heligmonellidae são: a fêmea sem espinho na cauda. Já a família Heligmosomidae não compartilha nenhum caracter morfológico.

Postula-se que os marsupiais tiveram sua origem na Ásia durante o período Cretáceo e que poderiam ter migrado para a Europa via América do Norte ou vice-versa (Vullo *et al.*, 2009). Porém, no período de transição entre o Cretáceo e o Terciário sugere-se ter ocorrido o desaparecimento dessas espécies no hemisfério norte, concomitantemente com a diversificação de marsupiais na América do Sul, a partir de migrantes vindos, possivelmente, da América do Norte. Já durante o

Paleoceno e o Eoceno, teria ocorrido a migração através da Antártica para a Austrália destes marsupiais (Williamson *et al.*, 2014).

A conexão entre a Antártica e a Austrália foi mantida pela maior parte do Paleoceno, 45 milhões de anos (Ma). O que permitiu a migração dos marsupiais da América do Sul para a Antártica e para a Austrália (Li & Powell, 2001). Considerando que os marsupiais australianos provavelmente descendem de uma linhagem basal de marsupiais da América do Sul (Nilsson *et al.*, 2004), provavelmente esses marsupiais tenham usado esta rota para transitar entre a Austrália, Antártica e América do Sul e vice-versa até a separação total desses continentes.

Sugerimos que o gênero *Boehmiella* tenha surgido na América do Sul a partir de marsupiais basais oriundos da Austrália ou Antártica antes do fim da conexão entre Antártica e América do Sul. Tal hipótese é consubstanciada pelo fato de encontrarmos atualmente o marsupial *Dromiciops gliroides* como único membro existente da ordem Microbiotheria, que através de análises filogenéticas mostram mais afinidade com marsupiais australianos do que com marsupiais sul-americanos, mesmo este sendo endêmico da região Sul-americana (Celis-Diez *et al.*, 2012). De fato, nossas análises moleculares corroboraram o surgimento de *Boehmiella* a partir de uma linhagem irmã de trichostrongilídeos australianos das famílias Herpeostrongylidae e Nicollinidae.

Os caviomorfos, no entanto, chegaram à América do Sul há cerca de 41 Ma, onde ocorreu uma grande diversificação das espécies. Propomos que, tenha ocorrido a captura de roedores caviomorfos pelos helmintos de uma linhagem mais basal parasita de marsupiais vindos da Austrália ou Antártica.

A partir disso, diferentemente do que foi sugerido por Durette-Desset *et al.* (1999), acreditamos que a dispersão de *Boehmiella* no hemisfério do Norte tenha ocorrido recentemente, a partir da introdução nesse continente de *M. coypus* e posterior captura de ciurídeos.

Analisando a morfologia de *Boehmiella*, constatamos que alguns caracteres não agrupam este gênero à família Haemonchidae.

As características morfológicas que definem a família Haemonchidae são os raios externo-lateral (4), médio-lateral (5) e postero-lateral (6) não agrupados, raio externo-lateral (4) e/ou raio externo-dorsal (8) atingindo a borda da bolsa caudal e derídeos em forma de ganchos. Já as características que englobam a subfamília Haemonchinae (Skrjabin & Schulz, 1952) são: bolsa caudal do tipo 2-1-2; raios 5 e 6 juntos ou paralelos; raios ventro-ventral (2) e latero-ventral (3) com um longo tronco

comum, abertura bucal hexagonal e lateralmente conectada com um anel hexagonal (exceto para *Boehmiella*) (Durette-Desset *et al.*, 1999).

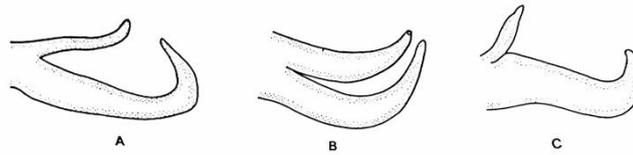
Diferentemente, *Boehmiella* apresenta abertura bucal triangular em forma de Y, com cinco dentes na parte anterior do esôfago que é uma característica autapomorfica para o gênero. Os derídeos em forma de gancho são uma característica apomorfica para os gêneros da família Haemonchidae, não sendo observado em *Boehmiella*.

Apesar de *Boehmiella* compartilhar uma bolsa caudal do tipo 2-1-2 com Haemonchidae, os raios 2 e 3 apresentam-se em forma de pinça e não possuem um tronco longo e comum, características não pertencentes a essa família. Os raios 4 e 8 atingindo a borda da bolsa caudal é uma característica apomorfica dos Strongylida. Os raios laterais possuem uma quitinização característica observada somente neste gênero. Travassos (1937) afirma que um estudo mais aprofundado poderia colocar o gênero *Boehmiella* em um grupo principal separado, mesmo desconsiderando a quitinização presente nos raios laterais da bolsa caudal.

Yamaguti (1961) propôs a criação de uma nova subfamília, Boehmiellinae, dentro da família Trichostrongylidae, que era composta por 16 subfamílias, para alocar o gênero *Boehmiella*. Para justificar tal proposta, o autor utilizou a presença de quitinização dos raios laterais, porém somente essa característica morfológica não foi o bastante para sustentar o gênero dentro de uma subfamília.

Posteriormente Durette-Desset & Chabaud (1977) reagruparam a família Trichostrongylidae em seis subfamílias Trichostrongylinae, Haemonchinae, Graphidiinae, Ostertagiinae, Cooperiinae e Libyostrongylinae. De acordo com a posição dos raios 2 e 3 (Figura 28) essas subfamílias foram definidas em três grupos.

Neste contexto a subfamília Haemonchinae, onde o gênero *Boehmiella* foi inserido, foi agrupada com a subfamília Trichostrongylinae tendo como característica os raios 2 e 3 separados, sendo o raio 2 menor que o raio 3. Porém o que observamos nos raios 2 e 3 de *Boehmiella* é característico das subfamílias Cooperiinae e Libyostrongylinae, que são raios 2 e 3 em forma de pinça, sendo o raio 2 menor que o raio 3, revelando inconsistência quanto a classificação proposta.



**Figura: 28** - Esquema dos raios 2 e 3 da família Trichostrongylidae. A: Libyostrongylinae e Cooperiinae B: Ostertagiinae e Graphidiinae C: Trichostrongylinae e Haemonchinae  
 Fonte: Adaptado de Durette-Desset & Chabaud, 1977.

Entretanto, Cooperiinae apresenta como característica da subfamília a presença de vesícula cefálica, enquanto Libyostrongylinae não possui a formação de um neodente, diferindo ambas de *Boehmiella*, o que nos leva a sugerir a necessidade da formação de um grupo principal separado para alocar o gênero *Boehmiella*.

De acordo com a chave de classificação de Gibbons & Khalil (1982) o gênero *Boehmiella* se diferencia dos outros gêneros da subfamília Haemonchinae pela presença de mais de um dente na cavidade bucal e pela quitinização dos raios laterais da bolsa caudal. Porém a formação de dente na cavidade bucal (neodente) aparenta ser uma homoplasia, já que outros gêneros de outras famílias também possuem essa característica (ex: Mackerrastrongylidae). Já a quitinização dos raios laterais é um caracter exclusivo do gênero *Boehmiella* dentre todas as famílias da superfamília Trichostrongyloidea, representando uma autapomorfia.

A partir das análises moleculares e do estudo aprofundado das características morfológicas propusemos uma nova chave de classificação, de acordo Anderson *et al.* (2009), incluindo uma nova família, Boehmiellidae.

#### Boehmiellidae n. fam.

Diagnóstico de família – Trichostrongyloidea: corpo filiforme, cápsula bucal ausente com um neodente seguido de quatro dentículos, bolsa trilobada assimétrica, com lobo dorsal reduzido, raios laterais quitinizados, espículo curto e complexo, gubernáculo presente. Fêmea com cauda sem espinho, vulva localizada na parte posterior do corpo, didelfa.

**Chave de Identificação da Superfamília Trichostrongyloidea**  
**(Adaptado de Anderson *et al.*, 2009)**

1 – (2) Ganchos intrabucais presentes.

Parasitas de morcegos Rhinolophidae

**Strongylacanthidae**

2 – (1) Ganchos intrabucais ausentes.

3 - (4) Raio 4 pequeno e curto, com porção terminal orientado anteriormente.

Fêmea com cauda delgada e sem espinho terminal.

Extremidade cefálica com cápsula bucal bem desenvolvida e papilas sensoriais localizadas na extremidade de longos pedúnculos ou sem cápsula bucal bem desenvolvida ou apêndices labiais denticulares.

Parasitas de aves aquáticas.

**Amidostomatidae**

4 – (3) Nematódeos sem essas características.

5-(16) Sínlofe geralmente ausente ou se presente simétrica bilateralmente (exceto para *Sprattelus*).

Corpo usualmente não enrolado.

Usualmente didelfica.

6 – (9) Nematódeos com mais dessas características:

Vesícula cefálica ausente (exceto *Dromaeostrongylus* e *Cooperiinae*).

Sínlofe ausente ou presente, mas não elaborada.

Espinho na cauda da fêmea ausente.

Raio 2 bem separado do raio 3 (exceto Graphidiinae, Ostertagiinae e alguns Dromaeostrongylidae).

Raio 4 geralmente longo, formando um tridente com raios 3 e 5 ou agrupado com raio 5.

Bolsa caudal usualmente com raios 2 e 3 ou 5 e 6 hipertrofiados.

7 – (8) Raio dorsal muito longo ou profundamente dividido

- Se o raio dorsal for muito longo, sínlofe presente

- Se o raio dorsal for profundamente dividido, sínlofe ausente.

Parasitas de aves ratitas, aves neotropicais e marsupiais australianos.

**Dromaeostrongylidae**

8 – (7) Raio dorsal usualmente pequeno e não profundamente dividido.

-Se o raio dorsal for muito longo, sínlofe ausente (exceto *Impalaia*, *Megacooperia* e alguns *Marshallagia* spp.).

-Se o raio dorsal for profundamente dividido, sínlofe presente (exceto alguns *Marshallagia* spp.).

Parasitas de mamíferos Eutheria, principalmente lagomorfos e ruminantes.

### **Trichostrongylidae**

9 – (6) Nematódeos com mais das características a seguir:

Vesícula cefálica presente (exceto *Batrachostongylus* e muitos Dictyocaulidae).

Sínlofe presente e usualmente elaborada (ausente em Dictyocaulidae, *Schulzia*, *Poekilostongylus* e *Filicapitis*).

Espinho presente na cauda da fêmea (exceto Amphibiophilidae e Dictyocaulidae).

Raio 2 perto do raio 3.

Raio 4 geralmente curto, às vezes amplamente separado dos raios 2 e 3 e raios 5 e 6, às vezes grupado com raio 3, às vezes surgindo anterior aos raios 5 e 6.

Bolsa caudal com raios 2 e 3 aproximadamente do mesmo tamanho que os raios 5 e 6.

10 -(11) Raios dorsais longo e raio 4 surgindo anterior aos raios 5 e 6.

Cápsula bucal presente e ovejetor com pequena vagina ver, ou cápsula bucal ausente e ovejetor com longa vagina vera.

Parasitas de anfíbios e lagomorfos (Ochotonidae).

### **Amphibiophilidae**

11-(10) Raio dorsal pequeno, ou se longo, raio 4 surgindo no mesmo nível que os raios 5 e 6.

Cápsula bucal ausente e ovejetor com pequena vagina vera.

12-(13) Bolsa caudal redonda.

Espinho presente na cauda da fêmea.

Vesícula cefálica ausente (exceto *Mertensinema*).

Sínlofe ausente.

Parasitas do trato digestivo de anfíbios e répteis e sistema respiratório de *Artiodactyla* e *Perissodactyla*.

### **Dictyocaulidae**

13-(12) Bolsa caudal raramente redonda.

Espinho usualmente presente na cauda da fêmea

Vesícula cefálica presente.

Sínlofe presente (exceto *Filicapitis*, *Schulzia* e *Poekilostrongylus*).

14-(15) Anel bucal ausente.

Raio extradorsal ausente.

Parasitos de anfíbios, répteis, carnívoros, morcegos, primatas, roedores primitivos, lagomorfos, ruminantes, Tenrecoidea, Tupaiidae, Xenarthra, Pholidota e Tubulidentata.

#### **Molineidae**

15-(14) Anel bucal presente

Raio extradorsal presente

Parasitos de monotremata e Dasyuridae.

#### **Mackerrastrongylidae**

16-(5) Sínlofe presente (exceto Globocephaloidinae), não simétrica bilateralmente.

Corpo usualmente enrolado em espiral sinistral.

Frequentemente monodelficas.

17-(20) Bolsa caudal do tipo 1-3-1 ou 3-2

Didelfica com ovejetor dividido diferentemente (exceto *Copemania*).

Cápsula bucal bem desenvolvida (exceto *Copemania*).

Dente dorsal oesofageano presente (exceto *Copemania*).

Abertura oral cercada por seis lábios ou duas estruturas semelhantes a mandíbulas presentes (exceto *Copemania* e *Batrachonema*).

Parasitos de anfíbios, répteis e mamíferos australianos.

18-(19) Bolsa caudal do tipo 1-3-1 e lobo dorsal não hipertrofiado.

Abertura oral cercada por seis lábios ou sem lábios.

Parasitos de anfíbios (Malaysia), monotrematas, raramente Dasyuridae.

#### **Nicollinidae**

19-(18) Bolsa caudal do tipo 3-2 ou lobo dorsal hipertrofiado.

Abertura oral por seis lábios ou duas estruturas semelhantes a mandíbulas presente.

Parasitos de répteis e marsupiais australianos.

#### **Herpetostrongylidae**

20-(17) Bolsa caudal do tipo 2-1-2, 2-2-1 ou 2-3.

Didelfica com ovejetor dividido igualmente ou monodelfica.

Cápsula bucal ausente ou muito pequena (exceto *Inglamidum*).

Dente dorsal oesofageano usualmente ausente (exceto *Inglamidum* e *Boehmiella*).

Abertura oral sem lábios e estruturas semelhantes a mandíbulas presentes.

Parasitas de aves e vários mamíferos (exceto mamíferos australianos).

21-(22) Bolsa caudal do tipo 2-1-2, trilobada com lobo dorsal reduzido.

Raios laterais quitinizados.

Dente dorsal oesofageano seguido por quatro dentículos.

Didelfica com ovejeter dividido igualmente.

Fêmea sem espinho na cauda.

Parasitas de roedores caviomorfos, cricetídeos e sciurídeos das Américas.

#### **Boehmiellidae n. fam.**

22-(23) Bolsa caudal do tipo 2-2-1, 2-1-2 ou irregular.

Sínlofe com três cristas ventral-esquerdo ou cristas orientadas da direita para esquerda, ventral e dorsal, mas deixando espaço livre laterais.

Parasitas de marsupiais do Novo Mundo e roedores caviomorfos.

#### **Viannaiidae**

23-(22) Nematódeos sem mais dessas características.

24-(25) Bolsa caudal do tipo 2-2-1

Sínlofe com simetria frontal.

Didelfica (exceto *Inglamidum*).

Parasitas de aves americanas, morcegos e roedores Geomyoidea, mais raramente aves do Velho Mundo, morcegos e cricetídeos neotropical (*Inglamidum*).

#### **Ornithostrongylidae**

25-(26) Nematódeos sem mais dessas características.

27-(28) Eixo de orientação das cristas subfrontal.

Espinho na cauda da fêmea.

Bolsa caudal geralmente do tipo 2-3.

Parasitas de Soricidae e roedores neotropicais.

#### **Heligmosomidae**

28-(25) Eixo de orientação das cristas quase sempre oblíquo.

Fêmea sem espinho na cauda.

Bolsa caudal geralmente do tipo 2-2-1

Parasitas de lagomorfos, roedores. Cosmopolita.

#### **Heligmonellidae**

## 5. CONCLUSÕES

- O estudo dos nematódeos gastrointestinais de *Mesomys hispidus* possibilitou a primeira descrição de helmintos parasitos para esse roedor coletado na Amazônia Brasileira no estado do Acre, contribuindo assim para o estudo sobre a biodiversidade de helmintos da Amazônia.
- Foram identificados através da morfologia, morfometria e análise de ultraestrutura dois nematódeos, um oxiurídeo, o *Helminthoxys freitasi* e um trichostrongilídeo, a *Boehmiella wilsoni*.
- Foi definida uma nova distribuição geográfica para as duas espécies estudadas, *H. freitasi* e *B. wilsoni*, sendo o primeiro registro de *B. wilsoni* no Brasil. *M. hispidus* foi descrito como novo hospedeiro para as duas espécies estudadas.
- Dados morfológicos e morfométricos foram acrescentados a descrição das duas espécies. Foram acrescidos para *H. freitasi* as medidas dos ovos, a visualização da asa lateral por MEV e a caracterização dos mamelões nos espécimes macho. Para *B. wilsoni* foi possível a caracterização, do aparelho reprodutor feminino, além de serem mensuradas todas as estruturas anatomicas. Dados da sínlofe foram acrescidos. A caracterização dos dois espécimes (*H. freitasi* e *B. wilsoni*) através da MEV foi realizada pela primeira vez.
- Dados moleculares das espécies estudadas (*H. freitasi* e *B. wilsoni*) são incluídos neste trabalho, enriquecendo assim os bancos de informação genética internacional.
- A relação filogenética entre *H. freitasi* e o gênero *Wellcomia* dentro da tribo Protozoophagini é confirmado através da análise molecular.
- A análise molecular não agrupou a espécie *B. wilsoni* com os gêneros *Haemonchus* e *Ostertagia*. Corroborando não estar inserido na mesma família, Haemonchidae.
- Foi proposta a criação de uma nova família, Boehmiellidae, para alocar o gênero *Boehmiella* fundamentada a partir de análises morfológicas, ultraestruturais e moleculares da espécie *B. wilsoni*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASCAL F, ZARDOYA R, TELFORD MJ. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic acids research*, p.291, 2010.
- ACRE. Governo do estado do Acre. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico do Estado do Acre. Zoneamento ecológico-econômico: recursos naturais e meio ambientes – documento final. v. 1, Rio Branco: SECTMA, 2006.
- ADAMSON M. Evolutionary Patterns in Life Histories of Oxyurida. *International Journal for Parasitology*. Vol. 24. Nº 8. p. 1167-1177, 1994.
- AMATO JFR, BOEGERW, AMATO SB. Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado. Rio de Janeiro: Imprensa Universitária, UFRRJ; 1991.
- AMAZÔNIA: Acre é destaque com políticas de conservação e sustentabilidade [Internet]. Acre: Instituto de Mudanças Climáticas e Regulação de Serviços Ambientais. Acesso em: Nov de 2017. Disponível em: <http://imc.ac.gov.br/?p=752>
- ANDERSON RC, CHABAUD AG, WILLMOTT S. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. CAB International, p. 463, 2009.
- BAQUEDANO LES. Presencia y lesiones gastrointestinales por helmintos del majaz *Agouti paca* de vida libre de la cuenca del Río Yavarí-Mirí (Loreto-Perú). Tese. National University of San Marcos; 2014.
- BARUS V. Remarks on the Cuban species of the genus *Helminthoxys* (Nematoda, Syphaciidae). *Folia Parasitologica*; 19:105-111, 1972 .

- BONVICINO CR, OLIVEIRA JA, D'ANDREA PS. Guia dos roedores do Brasil, com chave para gêneros baseados em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa- OPAS/OMS. 2008.
- BROOKS DR & HOBERG EP. Triage for the biosphere: The need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. *Comp. Parasitol.*, v. 6, n.1, p. 1 – 25, 2000.
- BUSH AO, *et al.* Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites. 1<sup>o</sup> Edition, Cambridge University Press, 2001.
- CALLINAN APL, WESTCOTT JM. Vertical distribution of trichostrongylid larvae on herbage and in soil. *Journal of Parasitology*, 16(3):241–4, 1986.
- CAMERON TWM, REESAL MR. Studies on the endoparasitic fauna of Trinidad mammals. VII. Parasites of hystricomorph rodents. *Canadian Journal of Zoology*, Ottawa, 29: 276-289, 1951.
- CARDOSO TS, SIMÕES RO, LUQUE JLF, MALDONADO AJR, GENTILE R. The influence of habitat fragmentation on helminth communities in rodent populations from a Brazilian Mountain Atlantic Forest. *Journal of Helminthology*, p: 1-9, 2015.
- CELIS-DIEZ JL, HETZ J, MARÍN-VIAL PA, FUSTER G, NECOCHEA P, VÁSQUEZ RA, JAKSIC FM, ARMESTO JJ Population abundance, natural history, and habitat use by the arboreal marsupial *Dromiciops gliroides* in rural Chiloé Island, Chile *Journal of Mammalogy*, 93(1):134–148, 2012.
- CHILTON NB, HUBY-CHILTON F, GASSER RB. First complete largesubunit rRNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: phylogenetic and diagnostic implications. *Mol Cell Probes* 17:33–39, 2003.
- CHILTON NB, HUBY-CHILTON F, GASSER RB, BEVERIDGE I. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. *Mol Phyl Evol* 40:118–128, 2006.

- CHILTON NB, HUBY-CHILTON F, KOEHLER AV, GASSER RB, BEVERIDGE I. The phylogenetic relationships of endemic Australasian trichostrongylin families (Nematoda: Strongylida) parasitic in marsupials and monotremes. *Parasitol Res* 114:3665–3673, 2015.
- COMBES C. Parasites, Biodiversity and ecosystem stability. *Biodiversity and Conservation*; 5(8):953–62, 1996.
- CORDEIRO HC, MELO FT, FURTADO AP, GIESE EG, MALDONADO A Jr, DOS SANTOS JN. *Squamasnema amazonica* n. gen. n. sp. (Heligmonellinae): A new parasite of *Proechimys roberti* (Rodentia: Echimyidae) in the Brazilian Amazon. *Acta Trop.* Aug;148:46-50, 2015.
- COSTA AL, FACCINI JLH, LEITE RC. Especificidade parasitária das espécies de *Railletia trouessert* (Acari: Gamasida) parasita de bovinos. *Revista Brasileira de Zoologia, Vet*, 1 (2):111-112, 1992.
- DA SILVA MNF, ARTEAGA MC, BANTEL CG, ROSSONI DM, LEITE RN, PINHEIRO OS, RÖHE F, ELER E. Mamíferos de pequeno porte (Mammalia: Rodentia & Didelphimorphia). p. 179-194. In: Rapp Py-Daniel, L.; DEUS CP, Henriques AL, Pimpão DM, Ribeiro OM. (orgs.). Biodiversidade do Médio Madeira: Bases científicas para propostas de conservação. INPA: Manaus, 244pp, 2007.
- DIGIANI MC, SUTTON CA, DURETTE-DESSET MC. A new genus of Nippostrongylinae (nematoda: heligmonellidae) from the water rat *Scapteromys aquaticus* (sigmodontinae) in Argentina. *J. Parasitol.*, 89(1), p. 124–132, 2003.
- DORLING KINDERSLEY. *World Atlas*. Dorling Kindersley Pub. p. 350, 2003.
- DURETTE-DESSET MC, CHABAUD AG. Essai de classification des Nématodes Trichostrongyloidea. *Annales de Parasitologie*, 52 (5):539-558, 1977.
- DURETTE-DESSET MC, SUTTON CA. Position systematique du genre *Boehmiella* Gebauer, 1932 (Nematoda, Haemonchinae). *Bull Mus natn Hist nat*, 4eme serie, 1, Section A:241±244, 1979.

- DURETTE-DESSET MC. Trichostrongyloid nematodes and their vertebrate hosts: Reconstruction of the phylogeny of a parasitic group. *Advances in Parasitology* 24: 239–306, 1985.
- DURETTE-DESSET MC, HUGOT JP, DARLU P, CHABAUD AG. A cladistic analysis of the Trichostrongyloidea (Nematoda). *Internacional Journal for Parasitology* 29:1065-1086, 1999.
- DURETTE-DESSET MC, DIGIANI MC, MAHLABA T, BEHNKE JM. Description of a new species of *Heligmonina* Baylis, 1928 (Nematoda: Heligmonellidae) a parasite of *Mastomys natalensis* (Rodentia: Muridae) from Swaziland and new data on the synopse of *Helignonina chabaudi* (Desset, 1966). *Parasite*, 14:271-280, 2007.
- FABRE PH, UPHAM NS, EMMONS LH, JUSTY F, LEITE YL, CAROLINA LOSS A, ORLANDO L, TILAK MK, PATTERSON BD, DOUZERY EJ. Mitogenomic phylogeny, diversification, and biogeography of south american spiny rats. *Mol Biol Evol.* 1;34(3):613-633, 2016.
- FALCÓN-ORDAZ J, GARCIA-PRIETO L. Análisis morfológico de algunos Trichostrongilinos (Strongylida) depositados en la Colección Nacional de Helminfos del Instituto de Biología, UNAM, México. *Revista Biología Tropical* 52(2): 377-386, 2004.
- FREITAS TEXEIRA JF. LENT L, ALMEIDA LL. Pequena contribuição ao estudo da fauna helmintológica de Argentina (Nematoda). *Mem. Inst. Ostraldo Cruz Rio de J.* 32, 195–209, 1937.
- GEBAUER O. *Bohmiella perichitinea* n. sp, ein neuer Trichostrongylide Nematodes des Nutria. *Zeitschrift fuer Parasitenkunde*, 4(4): 730-736, 1932.
- GENTILE R, SOARES MS, BARRETO MGM, GONÇALVES MML, D'ANDREA PS. The Role of Wild Rodents in the Transmission of *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Schistosomiasis*. Prof. Mohammad Bagher Rokni (Ed.), ISBN: 978-953-307-852-6, 2012.

- GIBBONS LM, KHALIL LF. A key for the identification of genera of the nematode family Trichostrongylidae Leiper, 1912. *Journal of Helminthology* 56: 185–233, 1982.
- GOMES AP, OLIFIERS N, SANTOS MM, SIMÕES RO, MALDONADO AJ. New records of three species of nematodes in *Cerdocyon thous* from the Brazilian Pantanal wetlands. *J. Vet. Parasitol.* 24 (3): 324-330, 2015.
- GONÇALVES AQ, VICENTE JJ, PINTO RM. Nematodes of Amazonian vertebrates deposited in the ological Collection of the Oswaldo Cruz Institute with new records. *Revta brasde Zool.* 19 (2): 453-465, 2002.
- GONÇALVES AQ, BÓIA MN, COURA JR, PINTO RM. New records for helminths of hystricognath rodents from the middle and high Rio Negro microregion, State of Amazonas, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*; 23 (3): 716-726, 2006.
- GONÇALVES AQ, PINTO RM, DURETTE-DESSET MC. Parasitism of two zoonotic reservoirs *Dasyprocta leporina* and *D. fuliginosa* (Rodentia) from Amazonas, with *Trichostrongylina* nematodes (Heligmonellidae): description of a new genus and a new species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 6, p. 763-768, september, 2007.
- GUINDON S, DUFAYARD JF, LEFORT V, ANISIMOVA M, HORDIJK W, GASCUEL O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3):307-21, 2010.
- HAFNER CH, HAFNER MS. Heterochrony in Rodents. In: MCKNNEY ML. *Heterochrony in evolution: a multidisciplinary approach*. New York, Plenum Press, p. 217-235, 1988.
- HERRERA L, D'ANDREA PS, XAVIER SCC, MANGLIA RH, FERNANDES O, JANSEN AM. 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. 99(5): 379-388, 2005.

HONEYCUTT RL, FRABOTTA LJ, ROWE DL. Rodent Evolution, Phylogenetics and Biogeography. In: WOLFF JO, SHERMAN PW. Rodent societies: an ecological and evolutionary perspective. Chicago and London: the University of Chicago Press, p. 8-23, 2007.

HUCHON D, DOUZERY E. From the Old World to the New World: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of hystricognath rodents. Molecular Phylogenetics and Evolution, 20: 238-251, 2001.

HUCHON D, CHEVRET P, JORDAN U, KILPATRICK CW, RANWEZ V, JENKINS PD, BROSIUS J, SCHMITZ J. Multiple molecular evidences for a living mammalian fossil. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 18, 7495–7499, 2007.

HUGOT JP. Les nématodes Syphaciinae, parasites de rongeurs et de lagomorphes. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle, série A. Zoologie 141: 1-148, 1988.

HUGOT JP. Etude morphologique d'*Helminthoxys urichi* (Oxyurata, Nematoda), parasite de *Dasyprocta aguti* (Caviomorpha, Rodentia). Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Série 4, 8, 133–138, 1986.

HUGOT JP, GARDNER SL. *Helminthoxys abrocomae* n. sp. (Nematoda: Oxyurida) from *Abrocoma cinerea* in Bolivia. Systematic Parasitology 47: 223–230, 2000.

HUGOT JP, BAUJARD P, MORAND S. Biodiversity in helminthes and nematodes as a field of study: an overview. Nematology, Vol.3(3),199-208, 2001.

HUGOT JP. New evidence for hystricognath monophyly from the phylogeny of their pinworms. In: PAGE RDM. Tangled Trees: Phylogeny, Cospetiation and Coevolution. Chicago: The University of Chicago Press, p. 144-173, 2003.

- HUGOT JP, FELIU C, DOUANGBOUPHA B, RIBAS A. *Laoxyuris laonasti* n. gen., n. sp. (Nematoda: Syphaciiinae) parasite of *Laonastes aenigmamus* (Rodentia: Diatomyidae): Morphology, biology, taxonomy, phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution* 16: 113–121, 2013.
- JOHNSTONE IL, SHAFI Y, MAJEED A, BARRY JD. Cuticular collagen genes from the parasite nematode *Ostertagia circumcincta*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 80: 103-112, 1996.
- JUKES TH, CANTOR CR. Evolution of protein molecules. In: MUNRO HN. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press. p.21-132, 1969.
- KEARSE M, MOIR R, WILSON A, STONES-HAVAS S, CHEUNG M, STURROCK S, BUXTON S, COOPER A, MARKOWITZ S, DURAN C, THIERER T, ASHTON B, MENTJIES P, DRUMMOND A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- LAMBSHEAD PJD. Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis* 19, 5–24, 1993.
- LENT H, FREITAS JFT. Sobre dois novos generos da subfamilia Trichostrongylinae Leiper, 1908, parasitos de *Tinamus solitarius* Vieill. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 28(2): 247-267, 1934.
- LENT H, FREITAS JFT. Pesquisas Helmintológicas realizadas no Estado do Pará. IV. Trichostrongilídeos de mamíferos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 33 (3):363-380, 1938.
- LIMA M, JULLIARD R, STENSETH NC, JAKSIC FM. Demographic dynamics of a neotropical small rodent (*Phyllotis darwini*): feedback structure, predation and climatic factors. *Journal of Animal Ecology*, 70:761-775, 2001.
- LUCKER JT. A new trichostrongylid nematode from the stomachs of American squirrels. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 33(3): 75-79, 1943.

- MACEDO EL. Nematódeos parasitos de cutias (*Dasyprocta* sp.) do município de Teresina- Pi. 2008. Dissertação de mestrado. Departamento de Parasitologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- MADDISON WP, MADDISON DR. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, 2011.
- MALDONADO JRA, VIEIRA GO, LANFREDI RM. *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology* 89(4): 800-808, 2003.
- MARTÍNEZ FA, TROIANO JC, RIGONATTO T, LEDESMA S, ANTONCHUK LA, FESCINA N. Comunicación corta: Nueva cita para la Argentina de *Strongyloides myopotami* (Nematoda, Strongyloidea). *Revista Salud Animal* 26(1): 66-68, 2004.
- MIGUEIS R. Uma introdução à geografia do Amazonas. Ed 1º, 130pp, 2001.
- MILLS JN. Biodiversity loss and emerging infectious disease: an example from the rodent borne hemorrhagic fevers. *Biodiversity*. 7(1), 2006.
- MILLER MA, PFEIFFER W, SCHWARTZ T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010.
- MINISTÉRO DO MEIO AMBIENTE. Amazônia. Acesso em: Nov de 2017. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/amaz%C3%B4nia>
- MITTERMEIER RA, GIL RP, HOFFMAN M, PILGRIM J, BROOKST T, MITTERMEIER CG, LAMOREUX J, FONSECA GAB. Hotspots revisited earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. 2<sup>nd</sup> ed. University of Chicago Press (Boston) Conservation International, 392p, 2005.

- MOLLERICONA JL, NASCIMENTO A, NALLAR R. Primer reporte en Bolivia de *Boehmiella wilsoni* (Nematoda: Strongylida) en *Dasyprocta variegata* (Rodentia: Dasyproctidae). *Ecología en Bolivia* 51(2): 169-174, 2016.
- MONTE TCC, GENTILE R, GARCIA J, MOTA E, SANTOS JN, MALDONADO JRA. Brazilian *Angiostrongylus cantonensis* haplotypes, ac8 and ac9, have two different biological and morphological profiles. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109(8): 1057-1063, 2014.
- MONTGOMERY SSJ, MONTGOMERY WI. Spatial and temporal variation in the infracommunity structure of helminths of *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae). *Parasitology*, 98:145-150, 1989.
- MORAND S, BOUAMER S, HUGOT J-P. Nematodes. In: MORAND S, KRASNOVBR, POULIN R. (editor). *Micromammals and Macroparasites: From Evolutionary Ecology to Management*. Tokyo, Japan: Springer, p. 63–80, 2006.
- MOREIRA VLC, GIESEEG, BAÍA DA SILVA DC, MELO FTV, FURTADO AP, MALDONADO AJR, SANTOS JN. *Calodium hepaticum* (Nematoda: Capillariidae) in synanthropic rodents (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) in Eastern Amazonia. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 265-269, 2013.
- MOURA RM. Histórico da taxonomia dos Nematóides. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*. Recife, Vol.3, p. 139-169, 2006.
- MURPHY MF. Ecology and Helminths of the Osage Wood Rat, *Neotoma floridana osagensis*, Including the description of *Longistriata neotoma* n. sp. (Trichostrongylidae). *The American Midland Naturalist*, v. 48, n. 1, p. 204-218, 1952.
- NADLER SA, CARRENO RA, MEJÍA-MADRID H, ULLBERG J, PAGAN C, HOUSTON R, HUGOT JP. Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology* (2007), 134, 1421–1442, 2007.

- NIELSEN NO. 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, 1995.
- NILSSOM MA, ARNASONA U, SPENCERB PBS, JANKE A. Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana. *Gene* 340: 189 – 196, 2004.
- NORONHA D, VICENTE JJ, PINTO RM. A survey of new host records for nematodes from mammals deposited in the Helminthological Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CHIOC). *Revta bras Zool* 19 (3):945-949, 2002.
- OKAMOTO M, URUSHIMA H, IWASA M, HASEGAWA H. Phylogenetic Relationships of Rodent Pinworms (genus *Syphacia*) in Japan Inferred from Mitochondrial COI Gene Sequences. *J. Vet Med Sci.* 69 (5): 545-547, 2007.
- PATTERSON B & WOOD AE. Rodents from the Deseadan Oligocene of Bolivia and the relationships of the Caviomorpha. *Bulletim of Museum of Comparative Zoology, Cambridge*, v. 149, p.371-543, 1982.
- PATTON JL, DA SILVA MNF, MALCOLM JR. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist. Bulletin*, 244:1–306, 2000.
- PATTON JL, PARDIÑAS UFJ, D'ELÍA G. *Mammals of South America, Volume 2.* University of Chicago Press, 2015.
- PINTO RM, GOMES DC. Contribuição ao conhecimento da fauna helmintológica da região amazônica. *Nematódeos. Atas Soc Biol RJ* 21:65-74, 1980.
- PORTAL AMAZÔNIA. Amazônia de A a Z [Internet]. *Amazon Sat.* 2001- 2018; Acesso em Nov de 2017. *Amazônia Brasileira.* Disponível em: <http://www.portalamazonia.com.br/secao/amazoniadeaz/interna.php?id=134>

- POULIN R & DICK AT. Spatial variation in population density across the geographical range in helminth parasites of yellow perch *Perca flavescens*. *Ecography*, v. 30: p. 629–636, 2007.
- PRUESSE E, PEPLIES J, GLÖCKNER F O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, v. 28 no. 14, p. 1823–1829, 2012.
- QUENTIN JC. *Helminthoxys freitasi* n. sp., Oxyure parasite d'un Rongeur Echimyidae du Bresil. *Bull. Mus. nac. Hist. nat., Paris, 3e ser., n° 167, Zool.* 112 : 1045-1096, 1969.
- QUENTIN JC, COURTIN LYON S, FONTECILLA GALLARDO J. *Octodonthoxys gigantean*. gen., n. sp., nuevo nematodo Oxyurinae, parasito de un roedor caviomorfo de Chile. *Boln. chilo Parasit.*, 30 : 21-25, 1975.
- RAUSCH R, TINER JD. Studies on the Parasitic Helminths of the North Central States. 1. Helminths of Sciuridae. *American Midland Naturalist*, v. 39, no. 3, 1948.
- REIG AO. Teoria del origen y desarrollo de La fauna de mamíferos de América Del Sur. *Monografia Naturae, Museu Municipal de Ciencias Naturales "Lorenzo Scaglia, Buenos Aires, v.1, p1-161, 1981.*
- REY L. *Bases da Parasitologia Médica. 3ª Edição, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2015.*
- REY L. *Parasitologia. Ed 4ª. Guanabara Koogan, 856p, 2008.*
- RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P, AYRES DL, DARLING A, HÖHNA S, LARGET B, LIU L, SUCHARD MA, HUELSENBECK JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, v. 61, n. 3, p. 539-42, 2012.

- RUPPERT EE, FOX RS, BARNES RD. Zoologia dos Invertebrados. 7ª Edição, Editora Roca. São Paulo, 1145p, 2005.
- SÁ MR, NORONHA D, MUNIZ-PEREIRA LC. A contribuição dos naturalistas viajantes para a Helminologia Brasileira: Natterer e as primeiras coleção de helmintos feitas no Brasil. Contrib Avulsas sobre a Hist. Nat. Brasil, ser His Nat 5:1-4, 1999.
- SCHUURMANS-STEKHOVEN, JH. Nematodos parasitos de anfibios, parajos y mamiferos de la Republica Argentina. Acta zool. lilloana, 10: 315-400, 1951.
- SIMÕES RO, GENTILE R, RADEMAKER V, D'ANDREA PS, HERRERA H, FREITAS T, LANFREDI R. 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: 266-275, 2010.
- SIMÕES RO, MALDONADO JRA, LUQUE JL. A new Heligmonellid (Nematoda: Heligmonellidae) from *oecomys mamorae* (Rodentia: Sigmodontinae) in the pantanal and new data on the synlophe of *Guerrerostrongylus zetta* from the atlantic forest, brazil. J. Parasitol., 98(4), p. 801–805, 2012.
- SIMÕES RO, LUQUE JL, GENTILE R, ROSA MCS, COSTA-NETO S, MALDONADO JRA. Biotic and abiotic effects on the intestinal helminth community of the brown rat *Rattus norvegicus* from Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Helminthology, 90: 21–27, 2016.
- SMYTH JD. Introduction to animal parasitology. 3ª Edition. Cambridge University Press, 1994.
- SOUZA JGRS, SIMÕES RO, THIENGO S, LIMA W, RODRIGUES-SILVA R, MOTA E, LANFREDI RM, MALDONADO JRA. A new metastrongilidae species (Nematoda): a lungworm from *Akodon montensis* (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil. Journal of Parasitology, 95: 1507-1511, 2009.

- SOUZA JGR, LOPES TORRES EJ, GARCIA JS, GOMES APN, RODRIGUES-SILVA R, MALDONADO JRA. Light and scanning electron microscopy study of in vitro effects of artesunate in newly excysted metacercariae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Digenea). *Experimental Parasitology* 174: 10-16, 2017.
- SUTTON CA. The presence of the nematode *Boehmiella perichitinea* Gebauer, 1932, in *Myocastor coypus bonariensis* Commerson. *Neotropica* 17 51:116-120, 1971.
- SWOFFORD DL. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods) Sunderland Sinauer Associates, 2003.
- TRAVASSOS, L. Revisão da família Trichostrongylidae Leiper 1912. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1937.
- VENIAMINOVA NA, VASSETZKY NS, LAVRENCENKO LA, POPOV SV, KRAMEROV DA. Phylogeny of the Order Rodentia Inferred from Structural Analysis of Short Retroposon B1. *Russian Journal of Genetics*, V.43, n.7, p.757-768, 2007.
- VICENTE JJ, RODRIGUES HO, GOMES DC, PINTO RM. Nematóides do Brasil. Parte V: nematóides de mamíferos. *Revista Brasileira de Zoologia*. 1997.
- VILELA RV. Estudo em roedores da família Echimyidae, com abordagens em sistemática molecular, citogenética e biogeografia. 2005. Dissertação (Mestrado). Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- VIGUERAS IP. Un genera y cinco especies nuevas de helminthos cubanos. *Univ. Habana*, 8, 315-356, 1943.
- VULLO R, GHEERBRANT E, MUIZON CD, NÉRAUDEAU D. The oldest modern therian mammal from Europe and its bearing on stem marsupial paleobiogeography. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 106: 19910–19915, 2009.

- WEBSTER CC, WILSON PN. Agriculture in the Tropics. Tropical Agriculture. 2<sup>o</sup> Edition. Logman. London, 1980.
- WILLIAMSON TE, BRUSATTE SL, WILSON GP. The origin and early evolution of metatherian mammals: the Cretaceous record. *ZooKeys* 465: 1–76, 2014.
- WILSON DE, REEDER DM. Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference. Ed 3<sup>o</sup>. Maryland: Johns Hopkins University Press, p. 2142, 2005.
- XIA X, XIE Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of heredity*, v. 92, n. 4, p. 371-373, 2001.
- XIA X, Zheng X, Marco S, Lu C, Yong W. An index of substitution saturation and its application. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2003.
- XIA X, LEMEY P. Assessing substitution saturation with DAMBE. *The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny*, v. 2, p.615-630, 2009.
- YAMAGUTI S. *Systema Helminthum. The nematodes of vertebrates*. Interscience Publishers, INC., New York, p.1225, 1961.