

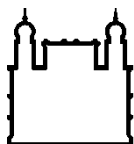
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Diversidade fenotípica e molecular de *Aspidodera raillieti*
Travassos, 1913 (Nematoda: Heterakoidea), parasito de marsupiais
Didelphini Gray, 1821, da Mata Atlântica.**

KARINA VARELLA ARPON

Rio de Janeiro
Março de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

KARINA VARELLA ARPON

Diversidade fenotípica e molecular de *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913
(Nematoda: Heterakoidea), parasito de marsupiais Didelphini Gray, 1821, da Mata
Atlântica.

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

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

RIO DE JANEIRO

Março de 2020

Arpon, Karina Varella.

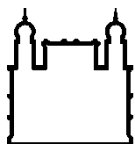
Diversidade fenotípica e molecular de *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913 (Nematoda: Heterakoidea), parasito de marsupiais Didelphini Gray, 1821, da Mata Atlântica. / Karina Varella Arpon. - Rio de Janeiro, 2020.
120 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Arnaldo Maldonado Júnior.

Bibliografia: f. 104-114

1. Aspidoderidae. 2. Sistemática filogenética. 3. Filogeografia. 4. Morfologia. 5. MT-CO1. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: KARINA VARELLA ARPON

**Diversidade fenotípica e molecular de *Aspidodera railletii* Travassos, 1913
(Nematoda: Heterakoidea), parasito de marsupiais Didelphini Gray, 1821, da
Mata Atlântica.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

Aprovada em: 12/03/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dra. Cláudia Portes Santos Silva (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dr. Reinaldo José da Silva (Universidade Estadual Paulista/SP)

Prof. Dra. Alena Mayo Iñiguez (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva (Universidade do Estado do Rio de Janeiro/RJ)

Rio de Janeiro, 12 de Março de 2020

Dedico aos meus pais, Euclides e Marília, e avós, Aristóteles e Léa, por todo suporte que me permitiu concluir esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho recebi apoio, ensinamentos e compreensão de muitas pessoas, sem as quais não seria possível concluir esta dissertação. A todas elas, minha eterna gratidão.

Primeiramente, agradeço a Deus por ser a luz e força que me permitiram concluir esta etapa.

Aos meus pais, Euclides e Marília, ao meu irmão, Victor, e minha avó Léa, por serem a base que me permitiu realizar todos os meus objetivos e sonhos. Agradeço também por torcerem, me apoiarem sempre e por aturarem meu estresse durante os momentos difíceis.

Ao meu namorado, Victor Machado, por todo amor, amizade, companheirismo, incentivo, e compreensão em todos os momentos, inclusive os mais conturbados.

Ao meu orientador, Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, por todos os ensinamentos compartilhados, questionamentos e discussões propostas que me permitiram enxergar este trabalho por diferentes vertentes, pela dedicação e paciência.

Ao meu orientador, Dr. Roberto do Val Vilela, pela paciência em compartilhar seus conhecimentos sobre filogenética e filogeografia, o que tornou este trabalho possível.

Ao Dr. Sócrates Neto, por estar sempre pronto para me auxiliar com bibliografia e material para estudo. Sem isto não seria possível realizar este trabalho.

Ao Dr. Thiago Cardoso, pela colaboração fundamental para realização das análises morfométricas e por sempre ser solícito e paciente em tirar todas as dúvidas.

A Msc. Michele Maria dos Santos, pela oportunidade e cuidado que teve comigo desde que cheguei ao Laboratório.

Ao Msc. Fernando Oliveira, pela disponibilidade em me ajudar a gerar os mapas utilizados neste trabalho.

Ao Ricardo Baptista, pela realização das pranchas de MEV utilizadas neste estudo.

Às minhas queridas amigas, Renata Pereira, Natália Cristina e Beatriz Elise, por toda amizade, conversas, conselhos, angústias compartilhadas e por tornarem mais leve e divertida essa caminhada.

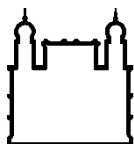
A Brunna Braga, por estar comigo desde a seleção do mestrado, compartilhando todos os momentos, felizes e outros nem tanto, mas sempre nos apoiando, nos fortalecendo e crescendo juntas.

A querida equipe do LABPMR, em especial: Ana Paula Nascimento, Juci Souza, Tatiana Pádua, Raquel Gonzalez, Rute Albuquerque, Natália Costa, Bernardo Teixeira, Camila Lúcio, Raquel Simões, Márcio Sales e Jeiel Gabrir. Todos que de alguma forma contribuíram positivamente para a conclusão deste mestrado, me dando conselhos e me ouvindo em momentos conturbados.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições para versão final deste trabalho.

Ao Programa de pós-graduação em Biologia Parasitária, pelo suporte e contribuição ao desenvolvimento acadêmico de seus alunos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

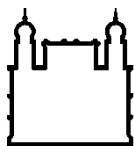
Diversidade fenotípica e molecular de *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913 (Nematoda: Heterakoidea), parasito de marsupiais Didelphini Gray, 1821, da Mata Atlântica.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Karina Varella Arpon

Aspidodera raillieti é um nematódeo da família Aspidoderidae, parasito de marsupiais, e apresenta ciclo monoxênico. No Brasil, *A. raillieti* foi registrado nos estados do Amapá, Pará, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul parasitando diversas espécies de marsupiais da família Didelphidae. O presente trabalho teve por objetivo conhecer os padrões de estrutura populacional de *A. raillieti* ao longo da Mata Atlântica, baseado na diversidade genética e fenotípica. Os padrões de estrutura populacional foram determinados com base no gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (MT-CO1), através de inferências filogenéticas, análises de estrutura populacional a partir de análise de variância molecular, índice de fixação e testes de neutralidade. A morfologia e morfometria foram analisadas por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Cento e noventa e três espécimes de *A. raillieti*, parasitos de *Didelphis aurita*, *Didelphis albiventris* e *Philander quica*, resultaram em 118 haplótipos que se agruparam em quatro clados nas análises filogenéticas e redes de haplótipos. Clado I foi formado por espécimes parasitos de *D. albiventris* de Porto Alegre, RS e de *Didelphis pernigra* da Bolívia; clado II: espécimes parasitos de *D. albiventris* de Santa Rita e Mamanguape, PB, e de Porto Alegre, RS; clado III: espécimes parasitos de *D. aurita* do Rio de Janeiro e Paraty, RJ, de Cariacica, ES, e Curitiba, PR, parasitos de *D. albiventris* de Santa Rita e Mamanguape, PB e clado IV: espécimes parasitos de *D. aurita* do Rio de Janeiro, Paraty e Petrópolis, RJ e Curitiba, PR, por parasitos de *D. albiventris* de São Gonçalo do Sapucaí, MG, Curitiba, PR, e Porto Alegre, RS, e parasitos de *P. quica* de Santo Amaro da Imperatriz, SC. Estes clados mostraram elevada diferenciação genética, o que indica ausência ou baixo fluxo gênico. Não foi observada estruturação associada às localidades, o que foi corroborado pelo teste de Mantel, que indicou baixa correlação entre distância geográfica e distância genética. Também não foi observada estruturação associada às espécies hospedeiras. Os clados III e IV ocorrem em simpatria nas localidades de Paraty e Rio de Janeiro, RJ e possuem assinatura de expansão populacional sugerindo serem decorrentes de eventos demográficos ou seleção purificadora. Análises morfológicas dos espécimes sequenciados permitiram identificar variações intra e interpopulacionais em estruturas presentes na coifa cefálica dos nematódeos, particularmente nas projeções interlabiais e no poro presente no ápice dessas projeções, que não estão correlacionadas com os clados recuperados nas análises moleculares ou com as espécies hospedeiras. Também não foi observada diferenciação morfométrica entre espécimes de *A. raillieti* de diferentes espécies hospedeiras. Porém, foi observada diferenciação morfométrica entre algumas localidades, formando dois grupos principais. Estes achados permitiram concluir que há estruturação genética, de forma análoga aos agrupamentos identificados através da morfometria, que sugerem correlação com eventos pretéritos. Além disso, os clados I, III e IV são congruentes com os biomas florestais, enquanto clado II parece ser congruente com biomas de formações abertas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Phenotypic and Molecular Diversity of *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913 (Nematoda: Heterakoidea), parasitic of marsupials Didelphini Gray, 1821, from the Atlantic Forest

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Karina Varella Arpon

Aspidodera raillieti is a nematode of the family Aspidoderidae, a parasite of marsupials, with a monoxenic life cycle. In Brazil, *A. raillieti* was reported in the states of Amapá, Pará, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo and Rio Grande do Sul, parasitizing several species of marsupials of the family Didelphidae. The present work aim to know the population structure of *A. raillieti* along the Atlantic Forest, based on the genetic and phenotypic diversity. The population structure patterns were determined based on the cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene (MT-CO1), through phylogenetic inferences, analysis of population structure using molecular variance analysis, fixation index and neutrality tests. The morphology and morphometry were analyzed by light microscopy and scanning electron microscopy. One hundred and ninety-three specimens of *A. raillieti*, parasites of *Didelphis aurita*, *Didelphis albiventris* and *Philander quica*, resulted in 118 haplotypes that were grouped into four clades in phylogenetic analysis and haplotype networks. Clade I was formed by parasitic specimens of *D. albiventris* from Porto Alegre, RS and *Didelphis pernigra* from Bolivia; Clade II: specimens from *D. albiventris* from Santa Rita and Mamanguape, PB, and Porto Alegre, RS; Clade III: parasitic specimens of *D. aurita* from Rio de Janeiro and Paraty, RJ, from Cariacica, ES, and Curitiba, PR, parasites of *D. albiventris* from Santa Rita and Mamanguape, PB and Clade IV: parasitic specimens of *D. aurita* from Rio de Janeiro, Paraty and Petrópolis, RJ and Curitiba, PR, for parasites of *D. albiventris* from São Gonçalo do Sapucaí, MG, Curitiba, PR, and Porto Alegre, RS, and parasites of *P. quica* from Santo Amaro da Imperatriz, SC. These clades showed high genetic differentiation, which indicates absence or low gene flow. There was no structuring associated with the locations, which was corroborated by the Mantel test, which indicated a low correlation between geographic and genetic distances. Clades III and IV occur in sympatry in the locations of Paraty and Rio de Janeiro, RJ and have a population expansion signature suggesting demographic events or purifying selection. Morphological analysis of the sequenced specimens allowed the identification of intra and interpopulation variations in structures present in the nematode cephalic cap, particularly in the interlabial projections and in the pore present at the apex of these projections, which are not correlated with the Clades recovered in the molecular analysis or with the host species. There was also no morphometric differentiation between specimens of *A. raillieti* from different host species. However, morphometric differentiation was observed between some locations, forming two main groups. These findings allowed us to conclude that there is a genetic structure, similar to the clusters identified through morphometry, which suggest correlation with past events. In addition, clades I, III and IV are congruent with forest biomes, while clade II appears to be congruent with biomes of open formations.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	22
	Filo Nematoda: Características gerais dos nematódeos	22
1.1	Família Aspidoderidae Freitas, 1956	23
	<i>Sistemática da família Aspidoderidae</i>	23
1.2	Gênero <i>Aspidodera</i> Railliet & Henry, 1912	27
	<i>Aspidodera raillieti</i> Travassos, 1913.....	28
1.3	Marsupiais Didelphini Gray, 1821	31
1.3.1	<i>Gênero Didelphis (distribuição geográfica e fauna de helmintos)</i>	31
1.3.2	<i>Gênero Philander Brisson, 1762 (distribuição geográfica e fauna de helmintos)</i>	34
1.4	Mata Atlântica	36
1.5	Estudos filogeográficos envolvendo helmintos parasitos	38
1.6	Justificativa	39
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Coleta dos marsupiais Didelphini e do nematódeo <i>Aspidodera raillieti</i> 42	
3.2	Identificação taxonômica de <i>Aspidodera raillieti</i>	44
3.3	Comparação morfológica entre espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> provenientes de diferentes localidades geográficas e hospedeiros .	45
3.4	Comparação morfométrica entre espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> provenientes de diferentes localidades geográficas e hospedeiros .	46
3.5	Isolamento e amplificação de DNA	47
3.6	Reação de sequenciamento	48
3.7	Análise de sequências	49
	3.7.1 <i>Análise de saturação das substituições</i>	50
3.8	Análises moleculares	50
4	RESULTADOS	53

4.1	Análise de microscopia de luz	53
4.2	Amplificações e análise de sequências de DNA.....	54
4.3	Análise de saturação das substituições nucleotídicas.....	58
4.4	Análises moleculares.....	59
4.5	Análises morfológicas	75
4.6	Análises morfométricas.....	81
5	DISCUSSÃO	87
5.1	Análises filogenéticas e filogeográficas	87
5.1.1	<i>Estrutura populacional de Aspidodera raillieti associada aos clados e as localidades</i>	87
5.1.2	<i>Estrutura populacional de Aspidodera raillieti associada às espécies hospedeiras</i>	90
5.1.3	<i>História demográfica e biogeográfica de Aspidodera raillieti</i>	92
5.2	Comparação morfológica entre espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> provenientes de diferentes clados filogenéticos, localidades geográficas e hospedeiros	95
5.2.1	<i>Implicações para a Taxonomia</i>	97
5.3	Comparação morfométrica entre espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> provenientes de diferentes localidades geográficas e hospedeiros ..	99
6	CONCLUSÕES	102
	Conclusão geral.....	102
	<i>Conclusões específicas</i>	102
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
8	APÊNDICES E/OU ANEXOS	115
8.1	Apêndice 1 – Protocolo do Isolamento do DNA	115
8.2	Anexo 1 – Tabela de medidas de <i>Aspidodera raillieti</i>	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Características gerais de nematódeos (Schmidt <i>et al.</i> , 2009).	23
Figura 2: Características morfológicas que compõem a região cefálica de membros da família Aspidoderidae. A) Cordões cefálicos presentes em nematódeos da subfamília Aspidoderinae (representação de <i>Aspidodera binansata</i> Railliet & Henry, 1913). B) Placas cefálicas presentes em nematódeos da subfamília Lauroiinae (representação de <i>Lauroia trinidadensis</i> Cameron, 1937) (autor: Jiménez <i>et al.</i> , 2008).	25
Figura 3: Reconstruções filogenéticas para a família Aspidoderidae pelo método de máxima parcimônia baseadas em caracteres morfológicos (Jiménez <i>et al.</i> , 2008). Triângulos invertidos representam três caracteres utilizados para definir os cordões cefálicos. Mudanças não ambíguas para caracteres indicados são representadas como linhas em negrito. Espécies classificadas como Lauroiinae estão rotuladas pela letra “L”.	
Figura 4: Reconstruções filogenéticas para a família Aspidoderidae baseadas nas regiões espaçadoras transcritas internas (ITS). Valores de <i>bootstrap</i> (lado esquerdo), para máxima parcimônia e máxima verossimilhança, e probabilidades posteriores (lado direito) estão representados nos nós dos ramos (Adaptado de Jiménez <i>et al.</i> , 2012).	
Figura 5: Locais de ocorrência de <i>Aspidodera raillieti</i> no Brasil e seus respectivos hospedeiros. Cores dos símbolos representam as localidades. Símbolos representam as espécies hospedeiras.	30
Figura 6: <i>Didelphis albiventris</i> (Gambá-de-orelha-branca).	32
Figura 7: <i>Didelphis aurita</i> (Gambá-de-orelha-preta).	32
Figura 8: Distribuição de <i>Didelphis aurita</i> no Brasil (Adaptado de Cáceres, 2012). .	33
Figura 9: Distribuição de <i>Didelphis albiventris</i> no Brasil (Adaptado de Cáceres, 2012).	33
Figura 10: <i>Philander quica</i> (cuíca-de-quatro-olhos).	35

Figura 11: Distribuição das espécies <i>Philander canus</i> , <i>P. pebas</i> e <i>P. quica</i> Fonte: Voss <i>et al.</i> , 2018.....	36
Figura 12: Cobertura vegetal da Mata Atlântica brasileira (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2019).....	37
Figura 13: Distribuição atual da Mata Atlântica brasileira, mostrando os fragmentos florestais remanescentes (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2019).....	38
Figura 14: Localidades das coletas dos marsupiais. O tamanho dos símbolos referente às espécies hospedeiras é proporcional ao número de hospedeiros por localidade.	44
Figura 15: (a) topologia simétrica; (b) topologia assimétrica (Xia <i>et al.</i> , 2003).....	50
Figura 16: Desenho em câmara clara de espécime macho adulto de <i>A. raillieti</i> . A) Vista lateral da região anterior mostrando expansão cuticular cefálica, anel nervoso, poro excretor e esôfago terminando em um bulbo esofágico. B) Detalhe da extremidade cefálica mostrando detalhe dos cordões cefálicos e um dos lábios látero-ventrais com duas papilas e um anfídeo. C) Detalhe da extremidade cefálica mostrando o lábio dorsal. D) Vista ventral da região posterior do macho mostrando um par de espículos, ventosa, cloaca, papilas e projeção digitiforme. E) Vista lateral da região posterior do macho mostrando espículos, gubernáculo, ventosa e projeção digitiforme.....	54
Figura 17: Reconstrução filogenética por MV baseadas em sequências parciais do gene MT-CO1 (504 pb) de 193 espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> , parasitos de <i>D. aurita</i> , <i>D. albiventris</i> e <i>P. quica</i> , provenientes do bioma Mata Atlântica, e 10 sequências de espécies pertencentes à família Aspidoderidae. Valores de aLRT e <i>bootstrap</i> (BP) dos ramos estão sobre ou sob os ramos (aLRT-MV / BP-MV). Os clados recuperados de <i>Aspidodera raillieti</i> estão colapsados e identificados de clado I a clado IV.	61
Figura 18: Reconstrução filogenética por IB baseadas em sequências parciais do gene MT-CO1 (504) de 193 espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> , parasitos de <i>D. aurita</i> , <i>D. albiventris</i> e <i>P. quica</i> , provenientes do bioma Mata Atlântica, e 10 sequências de espécies pertencentes à família Aspidoderidae. Valores das probabilidades posteriores bayesianas (BPP) dos ramos estão representados sobre os ramos. Os	

clados recuperados de *Aspidodera raillieti* estão colapsados e identificados de clado I a clado IV.61

Figura 19: Distribuição geográfica dos clados propostos neste estudo e número de espécimes para cada grupo por localidades estudadas.....62

Figura 20: Rede de Haplótipos de junção-mediana (*median joining*) baseada em sequência parcial do gene MT-CO1 (489 pb) de *Aspidodera raillieti*, parasitos do ceco e intestino grosso de marsupiais Didelphini, provenientes de diferentes estados do Brasil inseridos no bioma Mata Atlântica, e parasitos de *Didelphis pernigra* da Bolívia. O tamanho dos círculos representa a frequência dos haplótipos. O número sobre a linha, conectando os haplótipos, representa a quantidade de mutações, exceto quando havia apenas uma mutação, que não foi representado. As cores dos círculos representam os municípios de ocorrência de cada haplótipo.65

Figura 21: Rede de Haplótipos de junção-mediana (*median joining*) baseada em sequência parcial do gene MT-CO1 (489 pb) de *Aspidodera raillieti*, parasitos do ceco e intestino grosso de marsupiais Didelphini, provenientes de diferentes estados do Brasil inseridos no bioma Mata Atlântica, e parasitos de *Didelphis pernigra* da Bolívia. O tamanho dos círculos representa a frequência dos haplótipos. O número sobre a linha, conectando os haplótipos, representa a quantidade de mutações, exceto quando havia apenas uma mutação, que não foi representado. As cores dos círculos representam as regiões de ocorrência de cada haplótipo no Brasil e os haplótipos da Bolívia.66

Figura 22: Rede de Haplótipos de junção-mediana (*median joining*) baseada em sequência parcial do gene MT-CO1 (489 pb) de *Aspidodera raillieti*, parasitos do ceco e intestino grosso de marsupiais Didelphini, provenientes de diferentes estados do Brasil inseridos no bioma Mata Atlântica, e parasitos de *Didelphis pernigra* da Bolívia. O tamanho dos círculos representa a frequência dos haplótipos. O número sobre a linha, conectando os haplótipos, representa a quantidade de mutações, exceto quando havia apenas uma mutação, que não foi representado. As cores dos círculos representam os hospedeiros de ocorrência de cada haplótipo.....68

Figura 23: Resultado do teste de Mantel mostrando correlação entre distâncias genética e geográfica ($r=0,3046$; $p=0,001$).74

Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura da região anterior de adultos de *Aspidodera raillieti* pertencentes ao clado I, mostrando a extremidade cefálica com dilatação cuticular; lábios dorsal (LD) e látero-ventrais (LV) com projeções delgadas (p); projeções arredondadas (a) no lábio dorsal (LD); cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas (seta fina) e um anfídeo (cabeça de seta cheia); lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme (cabeça de seta vazada); projeção interlabial (i); estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (seta larga cheia). A) Extremidade cefálica do haplótipo 38 (LBCE 20601), espécime parasito de *D. albiventris* de POA/RS. B) Extremidade cefálica do haplótipo 39 (LBCE 20588), espécime parasito de *D. albiventris* de POA/RS.77

Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura da região anterior de adultos de *Aspidodera raillieti* pertencentes ao clado II, mostrando a extremidade cefálica com dilatação cuticular; lábios dorsal (LD) e látero-ventrais (LV) com projeções delgadas (p); projeções arredondadas (a) no lábio dorsal (LD); cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas (seta fina) e um anfídeo (cabeça de seta cheia); lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme (cabeça de seta vazada – visto somente nas imagens A, C e D); projeção interlabial (i); estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (seta larga cheia). A) Extremidade cefálica do haplótipo 42 (LBCE 20602), espécime parasito de *D. albiventris* de POA/RS. B) Extremidade cefálica do haplótipo 40 (LBCE 20732), espécime parasito de *D. albiventris* de SR/PB. C) Extremidade cefálica do haplótipo 44 (LBCE 20752), espécime parasito de *D. albiventris* de SRT/PB. D) Extremidade cefálica do haplótipo 45 (LBCE 20756), espécime parasito de *D. albiventris* de SRT/PB.....78

Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura da região anterior de adultos de *Aspidodera raillieti* pertencentes ao clado III, mostrando a extremidade cefálica com dilatação cuticular; lábios dorsal (LD) e látero-ventrais (LV) com projeções delgadas (p); projeções arredondadas (a) no lábio dorsal (LD); cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas (seta fina) e um anfídeo (cabeça de seta cheia); lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme (cabeça de seta vazada – visto somente nas imagens A, C e D); projeção interlabial (i); estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (seta larga cheia). A) Extremidade cefálica do haplótipo 29 (LBCE 20752), espécime parasito de *D. albiventris* de SRT/PB. B) Extremidade cefálica do haplótipo 14 (LBCE 21230), espécime parasito de *D. aurita* de PTY/RJ. C) Extremidade cefálica do haplótipo 34 (LBCE 20726), espécime parasito de *D.*

albiventris de SRT/PB. D) Extremidade cefálica do haplótipo 9 (LBCE 20370), espécime parasito de *D. aurita* do RIO/RJ.79

Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura da região anterior de adultos de *Aspidodera raillieti* pertencentes ao clado IV, mostrando a extremidade cefálica com dilatação cuticular; lábios dorsal (LD) e látero-ventrais (LV) com projeções delgadas (p); projeções arredondadas (a) no lábio dorsal (LD); cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas (seta fina) e um anfídeo (cabeça de seta cheia); lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme (cabeça de seta vazada – visto somente nas imagens B e C); projeção interlabial (i); estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (seta larga cheia). A) Extremidade cefálica do haplótipo 54 (LBCE 21134), espécime parasito de *D. albiventris* de CUR/PR. B) Extremidade cefálica do haplótipo 71 (LBCE 19304), espécime parasito de *P. quica* de SAI/SC. C) Extremidade cefálica do haplótipo 104 (LBCE 19467), espécime parasito de *D. aurita* de PET/RJ. D) Extremidade cefálica do haplótipo 97 (LBCE 20370), espécime parasito de *D. aurita* do RIO/RJ.80

Figura 28: Análise discriminante baseada nas espécies hospedeiras, considerando a morfometria de espécimes fêmeas (A) e machos (B) de *Aspidodera raillieti*, recuperados dos marsupiais coletados em localidades na Mata Atlântica brasileira. Os vetores representam as variáveis que mais explicaram a variação entre grupos.82

Figura 29: Análise discriminante baseada nas localidades, considerando a morfometria de espécimes fêmeas (A) e machos (B) de *Aspidodera raillieti*, recuperados dos marsupiais coletados em localidades na Mata Atlântica brasileira. Os vetores representam as variáveis que mais explicaram a variação entre grupos.84

Figura 30: Análise discriminante baseada na região Sudeste, considerando a morfometria de espécimes fêmeas (A) e machos (B) de *Aspidodera raillieti*, recuperados dos marsupiais coletados em localidades na Mata Atlântica brasileira. Os vetores representam as variáveis que mais explicaram a variação entre grupos.85

Figura 31: Análise discriminante baseada na região Sul, considerando a morfometria de espécimes fêmeas (A) e machos (B) de *Aspidodera raillieti*,

recuperados dos marsupiais coletados em localidades na Mata Atlântica brasileira. Os vetores representam as variáveis que mais explicaram a variação entre grupos.86

Figura 32: Áreas de refúgio florestal para Mata Atlântica em diferentes cenários climáticos (Carnaval *et al.*, 2008).94

Figura 33: Localização de áreas de refúgio na Mata Atlântica para 14 espécies de animais endêmicas em diferentes cenários climáticos (Porto *et al.*, 2012).94

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Localidades geográficas e espécies de marsupiais hospedeiras de *Aspidodera raillieti* utilizadas no presente estudo, com suas respectivas coordenadas geográficas.....43
- Tabela 2:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase descritos por Prosser *et al.* (2013).....48
- Tabela 3:** Espécies representantes da família Aspidoderidae, números de acesso, localidade geográfica da origem do espécime e hospedeiros: GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Jiménez *et al.*, 2013).....49
- Tabela 4:** Hospedeiros, por localidade, utilizados neste estudo e suas respectivas espécies e sexo. Está representado o número de espécimes de *A. raillieti* (N) e haplótipos do parasito (H) encontrados em cada um dos espécimes hospedeiros estudados. LBCE (Laboratório de Biologia e Controle de Esquistossomose) - Número de identificação de cada hospedeiro.56
- Tabela 5:** Número de unidades operacionais taxonômicas (N_{OTU}); valores de I_{SS} , $I_{SS.c}$ para topologia simétrica ($I_{SS.c}Sim.$) e $I_{SS:c}$ para topologia assimétrica ($I_{SS.c}Assim.$) de toda a matriz; e respectivos valores de p58
- Tabela 6:** Número de unidades operacionais taxonômicas (N_{OTU}); valores de I_{SS} , $I_{SS.c}$ para topologia simétrica ($I_{SS.c}Sim.$) e $I_{SS:c}$ para topologia assimétrica ($I_{SS.c}Assim.$) das primeiras posições dos códons; e respectivos valores de p58
- Tabela 7:** Número de unidades operacionais taxonômicas (N_{OTU}); valores de I_{SS} , $I_{SS.c}$ para topologia simétrica ($I_{SS.c}Sim.$) e $I_{SS:c}$ para topologia assimétrica ($I_{SS.c}Assim.$) das segundas posições dos códons; e respectivos valores de p58
- Tabela 8:** Número de unidades operacionais taxonômicas (N_{OTU}); valores de I_{SS} , $I_{SS.c}$ para topologia simétrica ($I_{SS.c}Sim.$) e $I_{SS:c}$ para topologia assimétrica ($I_{SS.c}Assim.$) das terceiras posições dos códons; e respectivos valores de p59
- Tabela 9:** Distâncias genéticas par-a-par (K2P) interespecífica e intraespecífica. Porcentagens mínimas e máximas dentro do gênero *Aspidodera* e *Nematomyestes*.62

Tabela 10: Diversidade genética do gene MT-CO1 dos espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> baseada nos clados recuperados nas reconstruções filogenéticas. Número de indivíduos (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).....	63
Tabela 11: Diversidade genética do gene MT-CO1 dos espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> baseada nos grupos das espécies hospedeiras. Número de indivíduos (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).....	63
Tabela 12: Diversidade genética do gene MT-CO1 dos espécimes de <i>Aspidodera raillieti</i> baseada nos grupos das localidades. Número de indivíduos (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).....	64
Tabela 13: Estimativa da variabilidade genética através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para sequências de <i>Aspidodera raillieti</i> baseado nos clados recuperados nas reconstruções filogenéticas.	69
Tabela 14: Estimativa da variabilidade genética através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de <i>Aspidodera raillieti</i> dentro e entre as espécies hospedeiras.....	69
Tabela 15: Estimativa da variabilidade genética através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de <i>Aspidodera raillieti</i> dentro e entre as localidades estudadas.....	70
Tabela 16: Estimativa do Fst para sequências de <i>Aspidodera raillieti</i> baseado nos clados recuperados nas filogenias. Valores em vermelho e negrito representam os valores significativos ($p < 0,01$).	70
Tabela 17: Estimativa do Fst para sequências de <i>Aspidodera raillieti</i> baseado nos grupos das espécies hospedeiras. Valores em vermelho e negrito representam os valores significativos ($p < 0,01$).	70
Tabela 18: Estimativa do Fst para populações de <i>Aspidodera raillieti</i> entre localidades (municípios). Valores em vermelho e negrito representam os valores significativos ($p < 0,01$).....	71

Tabela 19: Testes D de Tajima e Fs de Fu, e seus respectivos valores de significância, para sequências do gene MT-CO1 de <i>Aspidodera raillieti</i> baseado nos clados recuperados nas filogenias. Valores em negrito representam os valores significativos ($p < 0,05$).....	72
Tabela 20: Testes D de Tajima e Fs de Fu, e seus respectivos valores de significância, para sequências do gene MT-CO1 de <i>Aspidodera raillieti</i> baseado nos grupos de espécies hospedeiras. Valores em negrito representam os valores significativos ($p < 0,05$).....	72
Tabela 21: Testes D de Tajima e Fs de Fu, e seus respectivos valores de significância, para sequências do gene MT-CO1 de <i>Aspidodera raillieti</i> baseado nos grupos de localidades. Valores em negrito representam os valores significativos ($p < 0,05$).....	73
Tabela 22: Matriz de distância geográfica em quilômetros.....	73
Tabela 23: Valores de lambda de Wilks e seus respectivos graus de liberdade (GL) e valores de p para espécimes de <i>A. raillieti</i> machos e fêmeas agrupados por espécie hospedeira; localidades; Regiões.	81
Tabela 24: Comparação morfométrica dos espécimes machos de <i>Aspidodera raillieti</i> provenientes de cada localidade estudada e os descritos na literatura.	117
Tabela 25: Comparação morfométrica dos espécimes fêmeas de <i>Aspidodera raillieti</i> provenientes de cada localidade estudada e os descritos na literatura.	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5.8S RNAr	Gene nuclear da subunidade 5.8S do RNA ribossomal
AICc	Critério de informação de Akaike corrigido
AMOVA	Análise de Variância Molecular
ANOVA	Análise de Variância
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOL	Bolívia
BP	<i>Bootstrap</i>
BPP	Probabilidades posteriores bayesianas
CAR/ES	Cariacica, estado do Espírito Santo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz
CUR/PR	Curitiba, estado do Paraná
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos
ESS	Tamanho efetivo das amostras (<i>effective sample size</i>)
Fst	Índice de Fixação
GL	Graus de Liberdade
H	Número de haplótipos
Hd	Diversidade haplotípica
IB	Inferencia Bayesiana
IBAMA/SISBIO	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IOC/FIOCRUZ	Instituto Oswaldo Cruz/ Fundação Oswaldo Cruz
I_{ss}	Índice de saturação nas substituições
$I_{ss.c}$	I_{ss} crítico
$I_{ss.c}$ Assim.	I_{ss} assimétrico
$I_{ss.c}$ Sim.	I_{ss} simétrico
ITS 1 e 2	Regiões espaçadoras transcritas internas 1 e 2
ITS	Regiões espaçadoras transcritas internas
K2P	2-parâmetros de Kimura
Kg	Quilograma
Km	Quilômetro

LABPMR	Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios
LBCE	Laboratório de Biologia e Controle de Esquistossomose
LD	Lábio dorsal
LV	Lábio látero-ventral
MAM/PB	Mamanguape, estado da Paraíba
MANOVA	Análise multivariada da variância
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MT-CO1	Gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1
MV	Máxima Verossimilhança
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
OTU	Unidade Operacional Taxonômica
pb	Pares de bases de nucleotídeos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET/RJ	Petrópolis, estado do Rio de Janeiro
POA/RS	Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul
PPBIO	Programa de Pesquisa em Biodiversidade
PTY/RJ	Paraty, estado do Rio de Janeiro
RIO/RJ	Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro
S	Número de sítios polimórficos
SAI/SC	Santo Amaro da Imperatriz, estado de Santa Catarina
SGS/MG	São Gonçalo do Sapucaí, estado de Minas Gerais
SR/LABPMR	Serviço de Referência do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios
SRT/PB	Santa Rita, estado da Paraíba
π	Diversidade nucleotídica

1 INTRODUÇÃO

Filo Nematoda: Características gerais dos nematódeos

O filo Nematoda compreende cerca de 25 mil espécies de helmintos conhecidas, estando entre os animais mais abundantes, e em sua maioria constituem organismos de vida livre, enquanto alguns táxons adaptaram-se ao parasitismo (Hodda, 2011; Zhang, 2013). Os nematódeos de vida livre podem ser encontrados em diversos ambientes, tais como água doce, marinho e no solo, enquanto os nematódeos parasitos habitam plantas e animais na maior parte de seus ciclos biológicos. Nos vertebrados, são encontrados parasitando frequentemente o trato gastrointestinal, fígado, pulmões e cavidades do corpo ou sítios peculiares como olhos, boca, língua, rins, derme e músculos, alimentando-se de sangue, células e fluidos de tecido, conteúdo intestinal ou uma combinação destes (Smyth, 1994; Schmidt & Roberts, 2009).

O ciclo de vida dos nematódeos pode ser monoxênico, com a presença de apenas um hospedeiro, ou heteroxênico, necessitando de dois ou mais hospedeiros. Nematódeos são tipicamente dióicos, ovíparos e apresentam dimorfismo sexual, em que as fêmeas geralmente são maiores, e os machos apresentam cauda com curvatura dorsoventral (Smyth, 1994; Rey, 2010; Schmidt & Roberts, 2009).

Os nematódeos possuem corpo fusiforme, cilíndrico, alongado, não segmentado, pseudocelomado e com simetria bilateral. O corpo é coberto por uma cutícula transparente, que é secretada pela hipoderme, uma camada subjacente à derme, e por uma camada de fibras musculares dispostas longitudinalmente. O sistema digestório é completo, sendo composto por um tubo simples que se estende da extremidade anterior à posterior, onde encontram-se os lábios, boca, cavidade bucal, esôfago, intestino, reto, ânus (nas fêmeas) ou cloaca (nos machos) e glândulas digestivas. O sistema nervoso é constituído por: anel nervoso, papilas cefálicas, papilas cervicais, papilas caudais, anfídeos e fasmídeos (Smyth, 1994; Rey, 2010; Schmidt & Roberts, 2009). O sistema secretor-excretor consiste em canais laterais, glândulas ventrais ou ambos, que se abrem perto da extremidade anterior através de um poro excretor ventral (Smyth, 1994; Rey, 2010; Schmidt & Roberts, 2009). O sistema reprodutor nas fêmeas é composto por ovários, ovidutos, um ou mais úteros (monodelfo, didelfo ou polidelfo), ovijetores, vagina e se abre através de uma vulva ventral. O sistema reprodutor dos machos é constituído por

testículos, vaso deferente, espículos, vesícula seminal, ducto ejaculador, algumas espécies de nematódeos possuem gubernáculo e bolsa copulatória, e se abre em uma cloaca, juntamente ao sistema digestório (Figura 1) (Smyth, 1994; Rey, 2010; Schmidt & Roberts, 2009).

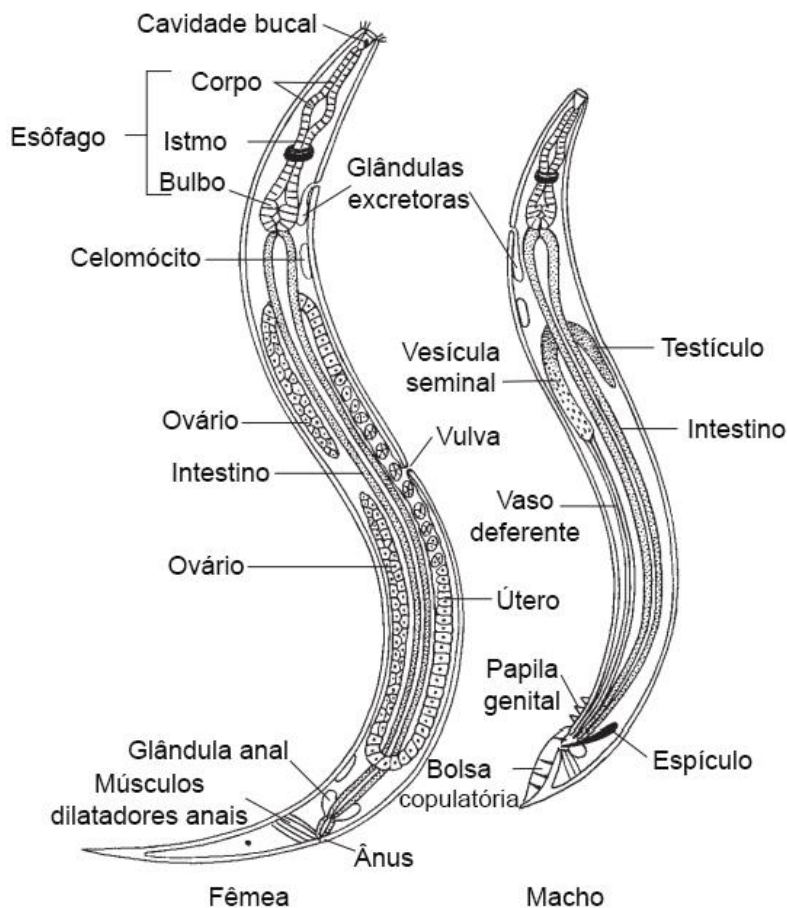


Figura 1: Características gerais de nematódeos (Schmidt & Roberts, 2009).

1.1 Família Aspidoderidae Freitas, 1956

Sistemática da família Aspidoderidae

A família Aspidoderidae Freitas, 1956 é representada por parasitos nematódeos pertencentes à superfamília Heterakoidea Raillieti & Henry, 1912, dentro da ordem Ascaridida Skrjabin & Schulz, 1940 (Vicente *et al.*, 1997). Esta família foi proposta inicialmente por Freitas (1956), para acomodar as subfamílias Aspidoderinae Skrjabin & Shikhobalova, 1947, com os gêneros *Aspidodera* Railliet e Henry, 1912, *Ansirutodera* Skrjabin e Schikhobalova, 1947, e *Sexansodera* Skrjabin e Schikhobalova, 1947, e Spinicaudinae Travassos 1920, com os gêneros *Spinicauda* Travassos, 1920, *Paraspidodera* Travassos, 1914, e *Africana* Travassos,

1920 (Freitas, 1956). O critério utilizado para separar estas duas subfamílias foram presença ou ausência de asas caudais, a ornamentação da extremidade anterior, hospedeiros e distribuição geográfica. No entanto, de forma independente, Inglis (1957a) propôs outra organização para Aspidoderidae, dividindo-a nas subfamílias Aspidoderinae, com os mesmos gêneros propostos por Freitas (1956), e Paraspidoderinae Skrjabin & Schikhobalova, 1947, somente com o gênero *Paraspidodera*, baseando-se na presença ou ausência de cordões cefálicos, respectivamente. *Paraspidodera* foi mantida em Aspidoderidae, pois em diversos aspectos (estrutura da coifa, espículos dos machos) estão relacionados aos aspidoderídeos.

Em uma revisão da superfamília Heterakoidea, Inglis (1957b) reconsiderou sua proposta anterior e subdividiu Aspidoderidae (*sensu* Inglis) nas subfamílias Aspidoderinae, com os gêneros *Aspidodera*, *Ansiruptodera* e *Sexansodera*, e Lauroiinae Skrjabin & Schikhobalova, 1951, com os gêneros *Lauroia* Proença, 1938 e *Paraspidodera*. A inclusão de *Lauroia* à família Aspidoderidae foi devido à presença de placas cefálicas, similar à *Paraspidodera*. Porém, Inglis (1967) considerou *Sexansodera* um sinônimo de *Aspidodera*. Sutton, Durette-Desset e Chabaud (1980) incluíram o gênero *Nematomystes* Sutton, Durette-Desset & Chabaud, 1980 à subfamília Lauroiinae, devido à presença de placas cefálicas na espécie *Nematomystes rodentophilus* Sutton, Chabaud, and Durette-Desset, 1980, parasito do roedor *Oxymycterus misionalis* Sandborn, 1931. Posteriormente, Santos *et al.* (1990) transferiram o gênero *Ansiruptodera* Skrjabin & Schikhobalova, 1947 para *Aspidodera*, argumentando que os cordões cefálicos não anastomosados (interrompidos) como único caráter para distinguir os dois gêneros não é suficiente.

Jiménez-Ruiz e Gardner (2003) restabeleceram o gênero *Proencaia* Gomes & Pereira, 1970, que havia sido considerado sinônimo júnior de *Lauroia* por Chabaud (1978), afirmando que os dois gêneros são bastante similares. Mas os espécimes machos de *Lauroia* possuem uma ventosa pré-cloacal reduzida, enquanto o de *Proencaia* possui ventosa com borda cuticular espessa. No entanto, Chabaud (1978) não considerou esse caráter suficiente para separar os gêneros. Porém, presentemente é consenso que a presença ou ausência de uma borda na ventosa desses nematódeos é um caráter diagnóstico para Heterakoidea, portanto *Proencaia* é considerado um gênero válido (Jiménez-Ruiz & Gardner, 2003).

Atualmente, Aspidoderidae é dividida nas subfamília Aspidoderinae, composta pelo gênero *Aspidodera*, e Lauroiinae Skrjabin and Schikhobalova, 1951, composta

pelos gêneros *Lauroia*, *Nematomystes*, *Paraspidodera* e *Proençaia* (Inglis, 1967; Sutton *et al.*, 1980; Jiménez-Ruiz & Gardner, 2003; Jiménez *et al.*, 2008). Os caracteres morfológicos diagnósticos que separam essas subfamílias são: presença de cordões cefálicos anastomosados, em Aspidoderinae, e presença de placas cefálicas, em Lauroiinae (Figura 2) (Inglis, 1957b). No entanto, hipóteses filogenéticas baseadas em dados morfológicos e sequências nucleotídicas de genes mitocondriais e nucleares têm sido propostas para a família Aspidoderidae e vêm questionando a classificação dessas subfamílias como grupos naturais (Jiménez *et al.*, 2008; 2012; 2013).

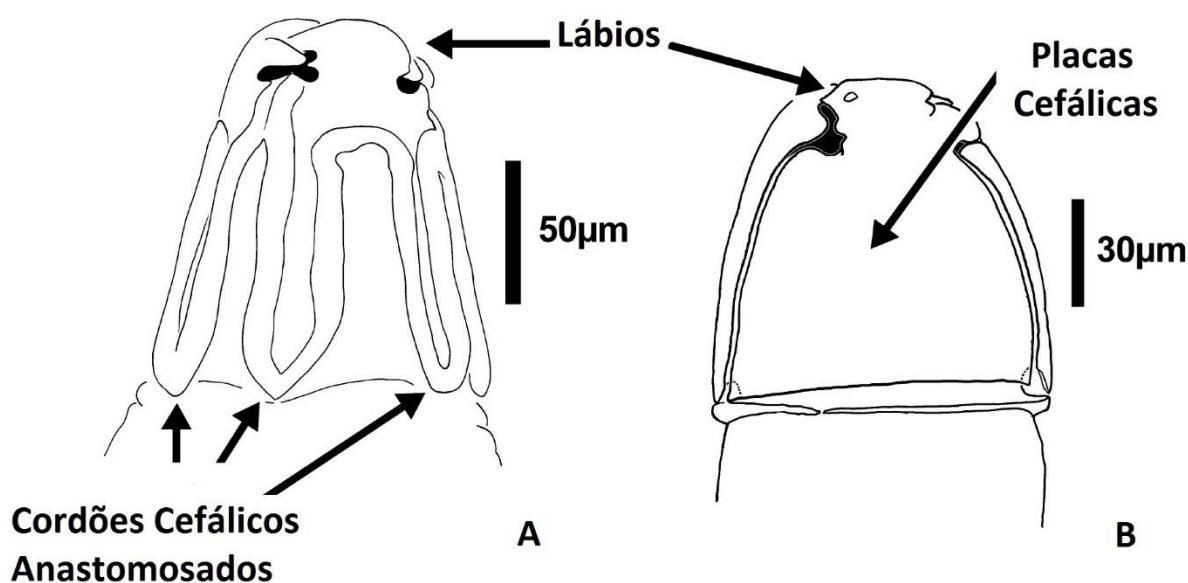


Figura 2: Características morfológicas que compõem a região cefálica de membros da família Aspidoderidae. A) Cordões cefálicos presentes em nematódeos da subfamília Aspidoderinae (representação de *Aspidodera binansata* Railliet & Henry, 1913). B) Placas cefálicas presentes em nematódeos da subfamília Lauroiinae (representação de *Lauroia trinidadensis* Cameron, 1937) (autor: Jiménez *et al.*, 2008).

As reconstruções filogenéticas com base em dados morfológicos (Figura 3) sugerem que o gênero *Nematomystes* compartilha um ancestral comum exclusivo com a espécie *A. raillieti*, sugerindo que os caracteres que dividem as subfamílias são homoplásticos, portanto, inconsistentes para definir relações filogenéticas (Jiménez *et al.*, 2008). Assim, os autores propuseram a inclusão de *A. raillieti* ao gênero *Nematomystes*, sugerindo a combinação *Nematomystes raillieti*. Esta inclusão foi suportada pela presença de papilas nos lábios latero-ventrais, agrupadas em direção à margem dorsal do lábio, e devido à presença de papilas nas pontas de cada interlábio. Porém, Chagas-Moutinho *et al.* (2014) consideram

estes caracteres insuficientes para suportar esta mudança, defendendo a manutenção de *A. raillieti*.

Filogenias baseadas em sequências de nucleotídeos do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal codificado pela mitocôndria (MT-RNR2), do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (MT-CO1), das regiões ribossomais espaçadoras internas transcritas (ITS1 e ITS2) e gene nuclear da subunidade 5.8S do RNA ribossomal (5.8S rRNA), também corroboram *A. raillieti* e *Nematomystes* (*N. scapteromi* (Ganzorig, Oku, Okamoto, Malgor & Kamiya, 1999) e *N. rodentophilus*) como um grupo monofilético (Figura 4).

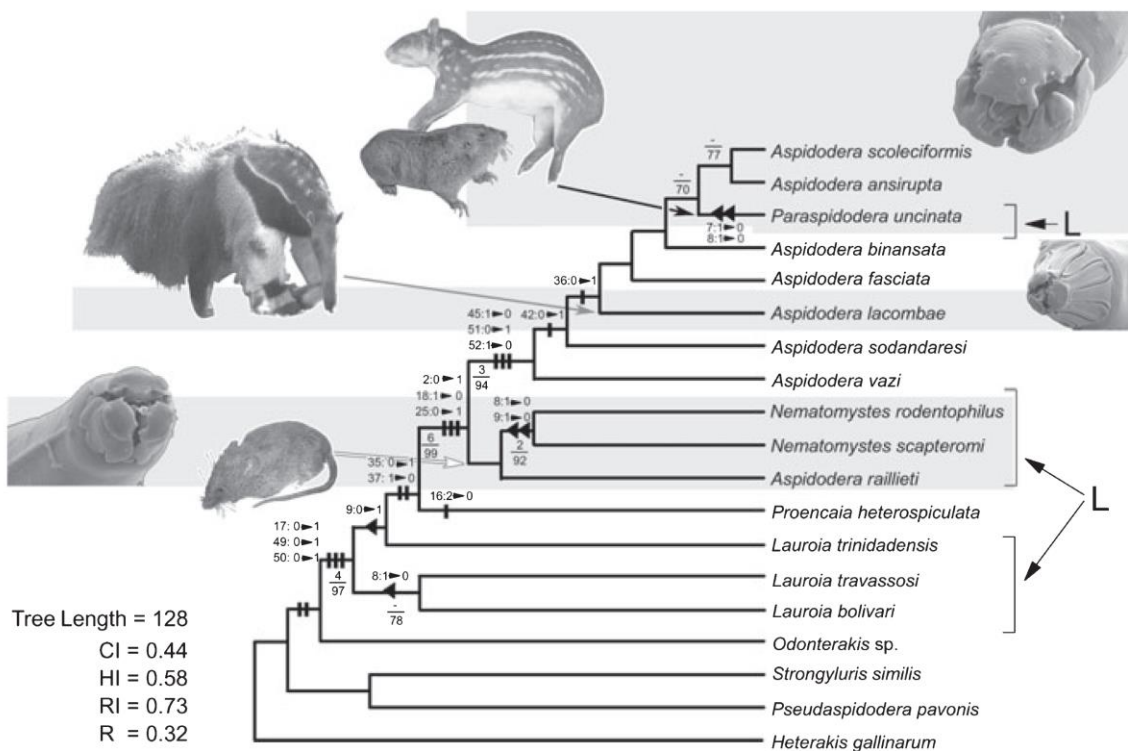


Figura 3: Reconstruções filogenéticas para a família Aspidoderidae pelo método de máxima parcimônia baseadas em caracteres morfológicos (Jiménez *et al.*, 2008). Triângulos invertidos representam três caracteres utilizados para definir os cordões cefálicos. Mudanças não ambíguas para os caracteres indicados são representadas como linhas em negrito. Espécies classificadas como Lauroiinae estão rotuladas pela letra “L”.

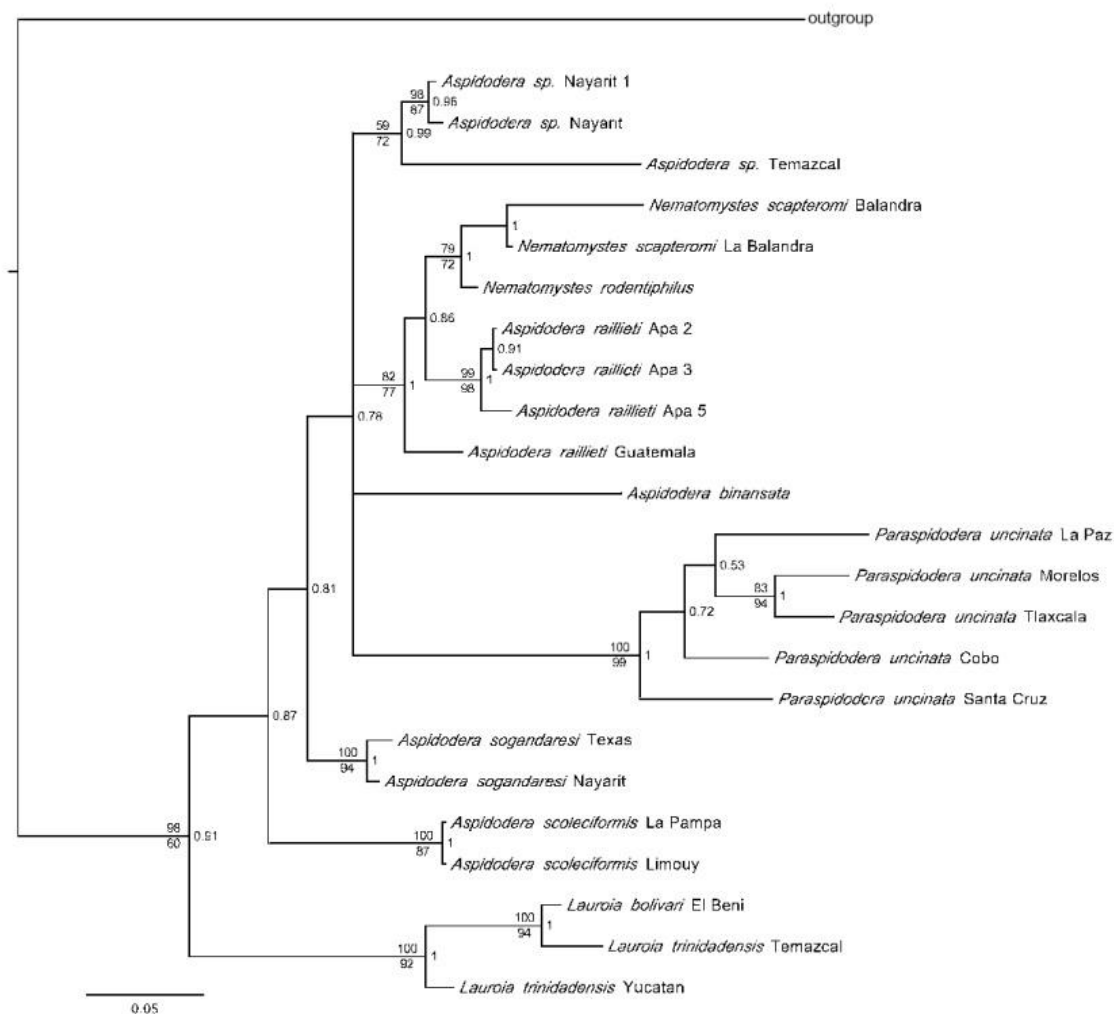


Figura 4: Reconstruções filogenéticas para a família Aspidoderidae baseadas nas regiões espaçadoras transcritas internas (ITS). Valores de *bootstrap* (lado esquerdo), para máxima parcimônia e máxima verossimilhança, e probabilidades posteriores (lado direito) estão representados nos nós dos ramos (Adaptado de Jiménez *et al.*, 2012).

1.2 Gênero *Aspidodera* Railliet & Henry, 1912

O gênero *Aspidodera* foi descrito por Diesing (1981) como *Aspidocephalus*, sendo a espécie tipo *Aspidocephalus scoleciformis* Diesing, 1851. No entanto, *Aspidocephalus* foi substituído por *Aspidodera* por Railliet & Henry (1912), pois o primeiro já era utilizado para classificar um gênero de coleópteros. *Aspidodera* foi revisto algumas vezes (Railliet & Henry, 1913; Travassos, 1913; Proença, 1937; Skrzabin and Schikhobalova, 1947; Vicente, 1966) e a última revisão foi realizada por Santos *et al* (1990).

O gênero *Aspidodera* Railliet & Henry, 1912, atualmente é composto por onze espécies válidas: *Aspidodera ansirupta* Proença, 1937, *Aspidodera binansata* Railliet & Henry, 1913, *Aspidodera fasciata* Schneider, 1866, *Aspidodera lacombae* Vicente,

1964, *Aspidodera lanfredi* Chagas-Moutinho, Sant'Anna, Oliveira-Menezes & De Souza, 2014, *Aspidodera kinsellai* Jiménez, Carreno & Gardner, 2013, *Aspidodera raillieti* Travassos, 1913, *Aspidodera scoleciformis* Diesing, 1851, *Aspidodera sogandaresi* Jiménez-Ruiz, Gardner & Varela-Stokes, 2006, *Aspidodera subulata* Molin, 1860 e *Aspidodera vazi* Proença, 1937 (Vicente *et al.*, 1997; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2006; 2013; Chagas-Moutinho *et al.*, 2014).

Todas as espécies são caracterizadas morfológicamente por apresentarem corpo alongado com cutícula estriada transversalmente, extremidade anterior com dilatação em forma de coifa adornada por cordões cefálicos com seis alças, abertura oral trilabiada, esôfago com bulbo posterior, anel nervoso e poro excretor presentes ao nível médio do esôfago. Os machos apresentam ventosa pré-cloacal, um par de espículos de tamanho e forma similares, gubernáculo e cauda terminando em projeção pontiaguda e com numerosas papilas; e as fêmeas apresentam vulva em forma de fenda na porção média do corpo (Vicente, 1966; Santos *et al.*, 1990).

Os aspidoderídeos são monoxênicos (possuem um único hospedeiro) e a transmissão ocorre de forma direta, através da ingestão dos ovos contendo as larvas infectantes (Jiménez *et al.*, 2011). *Aspidodera* distribui-se amplamente na região Neotropical, ocupando também parte da região Neártica (Jiménez-Ruiz *et al.*, 2008). Estes nematódeos habitam o ceco e intestino grosso de mamíferos das ordens Didelphimorphia Gill, 1872, Cingulata Illiger, 1811, Pilosa Flower, 1883 e Rodentia Bowdich, 1821 (Santos *et al.*, 1990).

***Aspidodera raillieti* Travassos, 1913**

Aspidodera raillieti foi descrita por Travassos (1913), como parasito do ceco do marsupial *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826, coletado no bairro de Manguinhos do estado do Rio de Janeiro. Esta espécie é caracterizada morfológicamente por apresentar na região cefálica uma dilatação cuticular adornada de cordões com seis alças longitudinais e abertura oral com três lábios, sendo um dorsal e dois lateroventrais, que juntos formam o vestíbulo bucal. Cada lábio emite duas projeções delgadas para região posterior, que com as projeções interlabiais formam um sulco profundo que circundam estas estruturas. Os lábios látero-ventrais apresentam um par de papilas dispostas paralelamente a um anfídeo. O lábio dorsal possui duas projeções arredondadas laterais. O lábio látero-ventral esquerdo apresenta uma projeção digitiforme lateral e, do outro lado de sua face

interna, apresenta um sulco para encaixe das projeções arredondadas do lábio dorsal. O lábio látero-ventral direito apresenta, de um lado, um recorte arredondado onde, aparentemente, a projeção digitiforme lateral do lábio lateroventral esquerdo se encaixa e do outro lado deste lábio, há um sulco para encaixe das projeções laterais arredondadas do lábio dorsal (Santos *et al.*, 1990; Chagas-Moutinho *et al.*, 2007).

As fêmeas desta espécie apresentam a abertura da vulva situada ventralmente no terço final do corpo e o ânus na extremidade posterior, formando uma fissura transversal. A cauda afila-se gradualmente formando uma projeção digitiforme. Os machos possuem a região posterior com curvatura dorsoventral, com uma ventosa pré-cloacal de borda espessa e com uma papila flanqueada por duas pequenas papilas em cada lado na margem posterior da ventosa. Apresentam um par de espículos semelhantes na forma e de tamanhos subiguais. A região caudal do macho apresenta numerosas papilas, estando a maior parte delas situadas ventrolateralmente. As papilas são distribuídas nas regiões pré-cloacal, ad-cloacal e pós-cloacal (Santos *et al.*, 1990; Chagas-Moutinho *et al.*, 2007).

Aspidodera raillieti é amplamente distribuída nas Américas, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, Guiana Francesa, México, Panamá, Paraguai, Suriname e Trinidad e Tobago (Santos *et al.*, 1990; Chagas-Moutinho *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2012). No Brasil, *A. raillieti* foi encontrada nas regiões sudeste, nordeste e norte, em áreas de Mata Atlântica, Caatinga e Amazônia, parasitando diversas espécies de marsupiais (Figura 5), tais como: *Didelphis aurita*, *Didelphis albiventris* Lund, 1840, *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758, *Caluromys lanatus* (Olfers, 1818), *Chironectes minimus* (Zimmermann, 1780), *Marmosops incanus* (Lund, 1840), *Metachirus nudicaudatus* (É. Geoffroy, 1803), *Philander quica* (Temminck, 1824) e *Philander opossum* (Linnaeus, 1758) e acidentalmente o roedor *Nectomys squamipes* (Brants, 1827) (Santos *et al.*, 1990; Vicente, *et al.*, 1997, Jiménez *et al.*, 2011, Cirino, 2019).

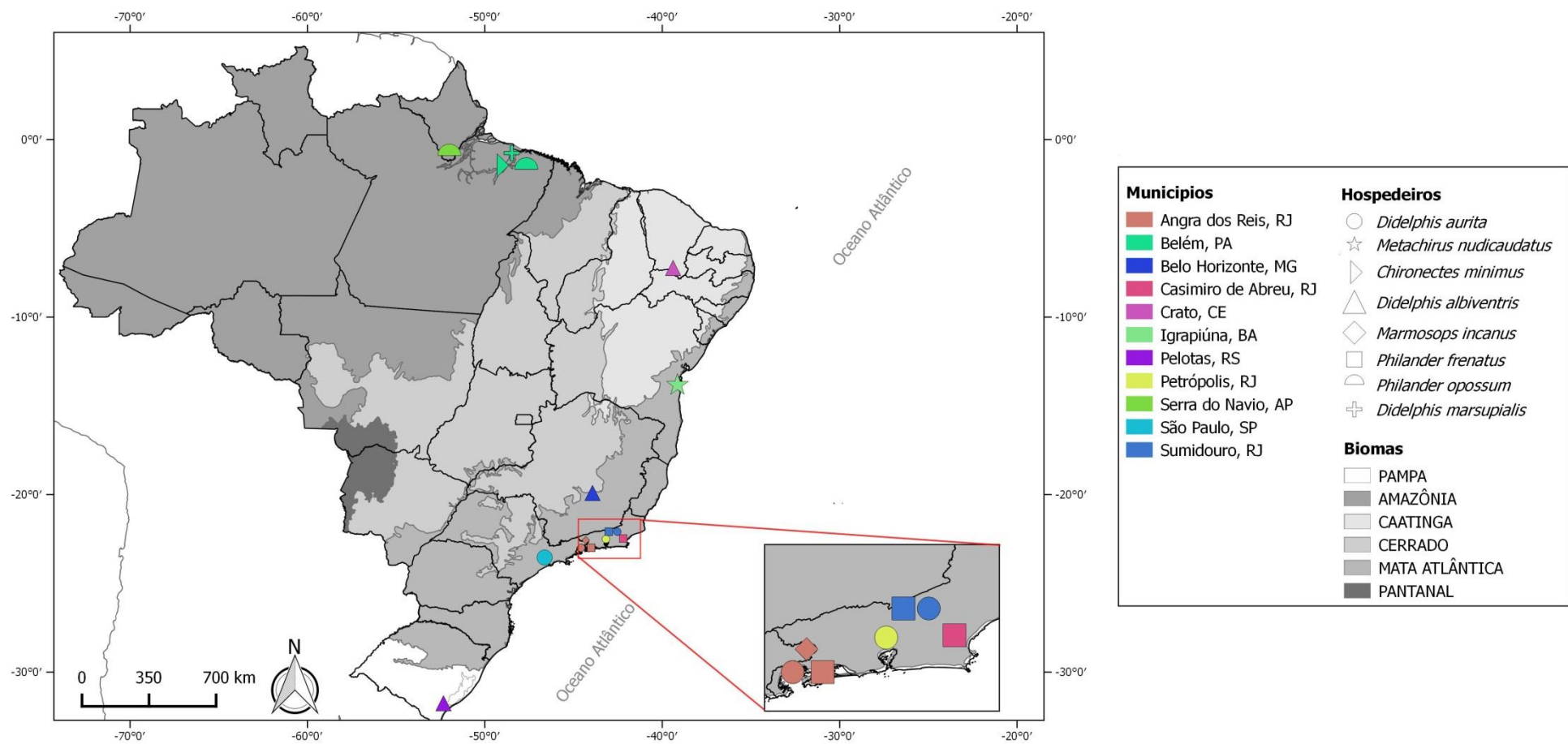


Figura 5: Locais de ocorrência de *Aspidodera raillieti* no Brasil e seus respectivos hospedeiros. Cores dos símbolos representam as localidades. Símbolos representam as espécies hospedeiras.

1.3 Marsupiais Didelphini Gray, 1821

A família Didelphidae Gray, 1821 (Didelphimorphia Gill, 1872) é dividida nas subfamílias Didelphinae Gray, 1821 e Caluromyinae Kirsch, 1977. Didelphinae compreende 3 tribos: Didelphini Gray, 1821, Metachirini Reig, Kirsch, & Marshall, 1985, e Monodelphini Hershkovitz, 1992. A tribo Didelphini é composta por 4 gêneros: *Chironectes* Illiger, 1811; *Didelphis* Linnaeus, 1758; *Lutreolina* (Thomas, 1910) e *Philander* Brisson, 1762. Dentre estes gêneros, espécies de *Didelphis* e *Philander* são encontradas frequentemente parasitadas por *A. raillieti*, apresentando elevadas taxas de prevalência e abundância. Em duas espécies do gênero *Philander*, *A. raillieti* é encontrada com prevalência acima de 40%, enquanto em duas espécies do gênero *Didelphis*, este nematódeo é encontrado com prevalência acima de 50% até 100% (Gomes *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2011; Costa-Neto *et al.*, 2018).

1.3.1 Gênero *Didelphis* (distribuição geográfica e fauna de helmintos)

O gênero *Didelphis* pertence à tribo Didelphini (Didelphimorphia, Didelphidae). Este gênero compreende os gambás-de-orelha-preta, *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 e *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758, e os gambás-de-orelha-branca, *Didelphis albiventris*, *Didelphis pernigra* J. A. Allen, 1900 e *Didelphis imperfecta* Mondolfi & Pérez-Hernández, 1984 (Gardner, 2008).

No Brasil, segundo Gardner (2008), há quatro espécies do gênero *Didelphis*: *Didelphis albiventris* (Figura 6), *Didelphis aurita* (Figura 7), *Didelphis marsupialis* e *Didelphis imperfecta*. *D. aurita* ocorre no leste do Brasil, da Bahia ao Rio Grande do Sul (Figura 8), distribuindo-se até o sudeste do Paraguai e nordeste da Argentina. *Didelphis aurita* habita preferencialmente áreas florestadas, sendo encontrada no bioma Mata Atlântica (Cerqueira, 1985; Gardner, 2008; Cáceres, 2012). *Didelphis albiventris* ocorre no nordeste e centro do Brasil (Figura 9) até o centro sul do Paraguai, leste do Rio Grande do Sul (Brasil) e Sul do Uruguai e Argentina. Esta espécie ocorre preferencialmente em áreas de formações abertas e também em áreas florestadas, sendo encontrada nos biomas Caatinga, Cerrado, Pampa e Mata Atlântica (Gardner, 2008). *Didelphis albiventris* pode viver em condições simpátricas com *D. aurita*, no bioma Mata Atlântica, e com *D. marsupialis* nas zonas de transição entre os biomas Amazônia e Caatinga.



Figura 6: *Didelphis albiventris* (Gambá-de-orelha-branca).
Fonte: Tatiana Freitas (LABPMR)



Figura 7: *Didelphis aurita* (Gambá-de-orelha-preta).
Fonte: Rosana Gentile (LABPMR)

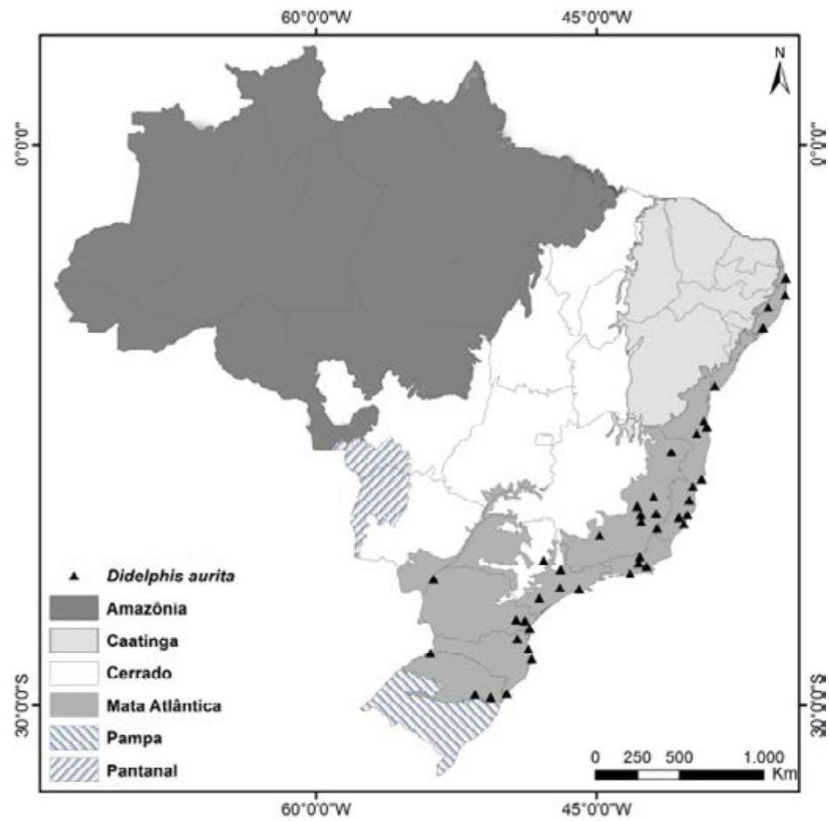


Figura 8: Distribuição de *Didelphis aurita* no Brasil (Adaptado de Cáceres, 2012).

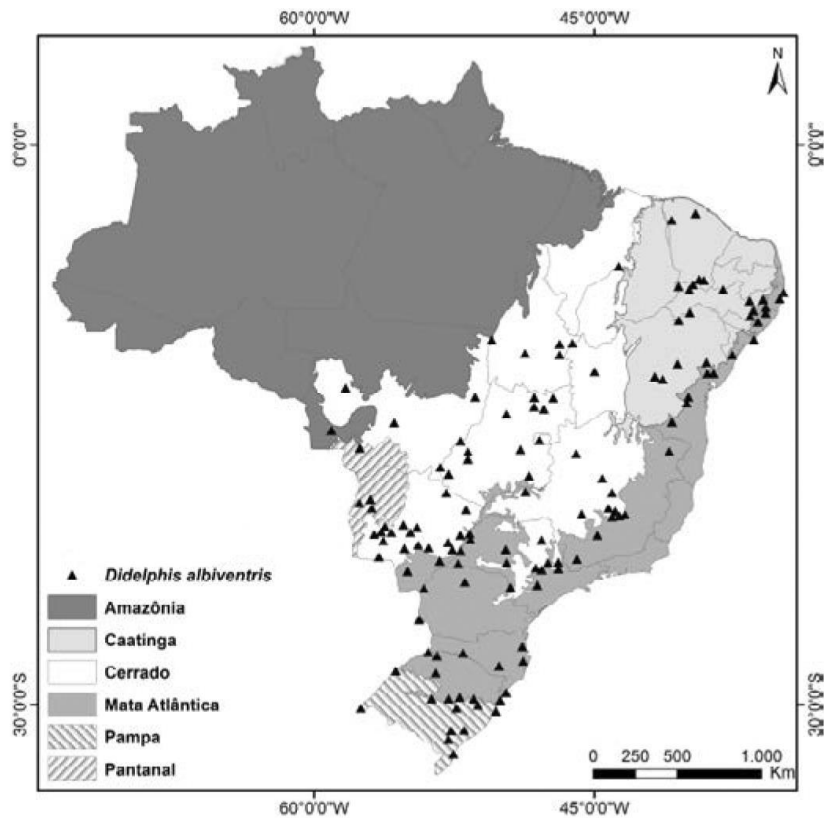


Figura 9: Distribuição de *Didelphis albiventris* no Brasil (Adaptado de Cáceres, 2012).

Os gambás possuem hábitos terrestres e ocasionalmente arborícolas (escansorial), são solitários e noturnos (Emmons & Feer, 1997; Cunha & Vieira, 2002), ocorrendo tanto em ambientes silvestres quanto em áreas rurais e urbanas, sendo frequentemente abundantes em comunidades de pequenos mamíferos de áreas perturbadas (Gentile *et al.*, 2000, Gentile *et al.*, 2004).

Os gambás são considerados insetívoro-onívoros, sendo encontrados em sua dieta frutos, pequenos vertebrados e invertebrados (Stallings, 1989; Leite, *et al.*, 1996; Cáceres, 2001; Cáceres 2002; Ceotto *et al.*, 2009). A procura por lixo doméstico também está presente em sua dieta, o que caracteriza o hábito de forragear fora do ambiente silvestre (caráter sinantrópico). Esta diversidade na alimentação pode justificar sua adaptabilidade a diversos ambientes, tais como áreas rurais e urbanas tornando-os potenciais disseminadores de parasitos causadores de zoonoses (Noireau *et al.*, 2009; Cáceres, 2012; Carreira *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012).

Tem sido observado que os gambás estão parasitados por diversas espécies de nematódeos, incluindo: *Capillaria eberthi* Freitas & Lent, 1935, *Viannaia hamata* Travassos, 1914, *Travassostrongylus orloffii* Travassos, 1935, *Travassostrongylus paraquintus* Durette-Desset, 1974 e *Globocephalus marsupialis* Freitas & Lent, 1936, parasitando intestino delgado; *Aspidodera subulata* (Molin, 1860), *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819), *Trichuris reesali* Wolfgang, 1951, *Trichuris minuta* Rudolphi, 1819 e *Trichuris didelphis* Barero, 1959, parasitando intestino grosso; *Heterostrongylus heterostrongylus* (Travassos, 1925), parasitando sistema pulmonar e *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819), parasitando estômago (Gomes *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2011; Costa-Neto *et al.*, 2018).

1.3.2 Gênero *Philander* Brisson, 1762 (distribuição geográfica e fauna de helmintos)

O gênero *Philander*, pertencente à tribo Didelphini, foi revisado recentemente por Voss *et al.* (2018), e atualmente compreende oito espécies, também conhecidas como cuícas-de-quatro-olhos: *Philander andersoni* (Osgood, 1913), *Philander canus* (Osgood, 1913), *Philander mcilhennyi* Gardner e Patton, 1972; *Philander pebas* Voss, Díaz-Nieto e Jansa, 2018, *Philander opossum* (Linnaeus, 1758), *Philander quica* (Temminck, 1824), *P. melanurus* (Thomas, 1899) e *P. pallidus* (Allen, 1901) (Figura 10). Dentre estas espécies, *P. quica* era conhecido anteriormente como *P.*

frenatus. Entretanto, *P. frenatus* foi identificado por características craniodentais como sinônimo de *P. quica* (Voss *et al.*, 2018).



Figura 10: *Philander quica* (cuica-de-quatro-olhos).
Fonte: <https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/mamiferos/ordem-didelphimorphia/familia-didelphidae/cuica-de-quatro-olhos-philander-frenatus/>

Dentre as espécies do gênero *Philander*, seis delas ocorrem no Brasil: *P. andersoni*, *P. canus*, *P. mcilhennyi*, *P. opossum*, *P. pebas* e *P. quica*. *Philander quica* ocorre no leste do Brasil, desde o estado da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul, se estendendo em direção oeste até o Paraguai e nordeste da Argentina (Figura 11) (Gardner, 2008; Cáceres, 2012; Voss *et al.*, 2018). Algumas espécies do gênero *Philander* ocorrem em simpatria com espécies do gênero *Didelphis*. Um exemplo disto são as espécies *Didelphis aurita* e *Philander quica*, que são simpátricas na Mata Atlântica (Freitas *et al.*, 1997; Cáceres, 2004; Gardner, 2008; Gentile *et al.*, 2000; Gentile *et al.*, 2004) e possuem dietas similares (Ceotto *et al.*, 2009; Santori *et al.*, 2015).

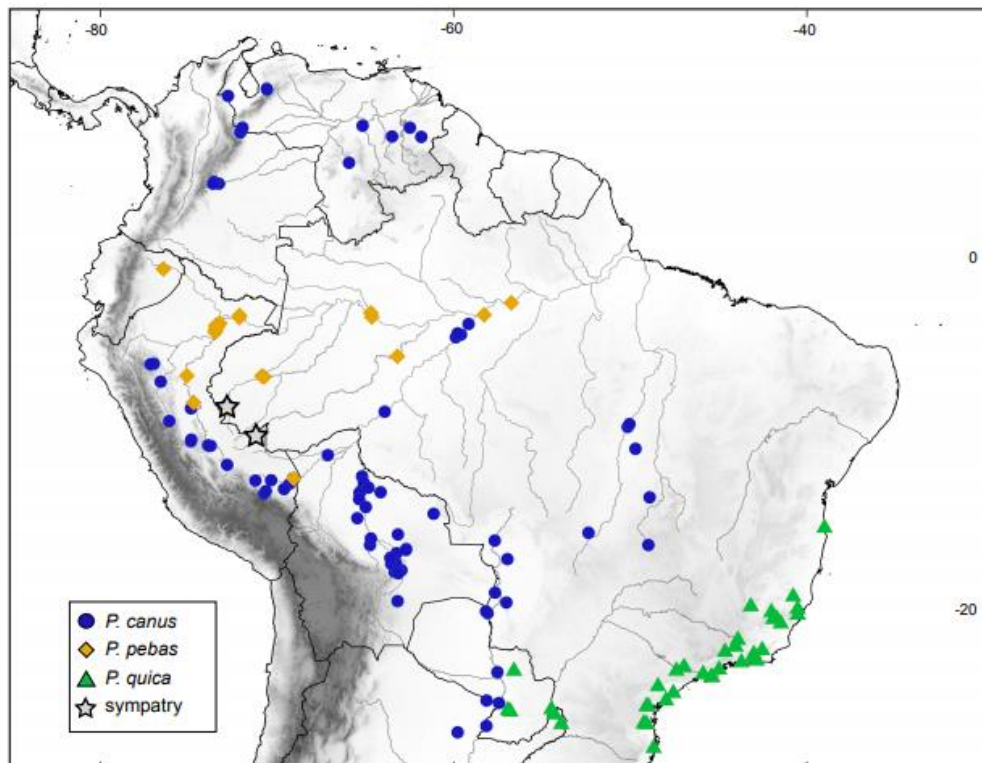


Figura 11: Distribuição das espécies *Philander canus*, *P. pebas* e *P. quica*
 Fonte: Voss *et al.*, 2018.

As cuícas-de-quatro-olhos são consideradas insetívoro-onívoras com dieta composta principalmente por invertebrados e pequenos vertebrados, mas também são encontrados frutos (Santori *et al.*, 1997; 2015; Ceotto *et al.*, 2009). Estes marsupiais possuem hábitos terrestres, mas podem atingir o sub-bosque, são solitários e habitam áreas florestadas (Cunha & Vieira, 2002; Cáceres, 2012).

Estudos prévios identificaram diversas espécies de helmintos nematódeos parasitando espécies de *Philander*, incluindo: *C. eberthi*, *Echinocoleus auritae* (Travassos, 1914), *Globocephalus marsupialis* Freitas & Lent, 1936, *Macielia perachii* Grisi & Castro, 1973, *Viannaia viannaia* Travassos, 1914, *Travassostrongylus paraquintus*, parasitando intestino delgado; *A. subulata*, *Cruzia tentaculata*, *Trichuris reesali*, parasitando intestino grosso; *Spirura guianensis* (Ortlepp, 1924), parasitando esôfago; *C. longicauda* Freitas & Lent, 1935 parasitando bexiga (Gomes *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2013).

1.4 Mata Atlântica

A Mata Atlântica foi uma das maiores florestas tropicais das Américas, cobrindo originalmente cerca de 150 milhões de hectares (Ribeiro *et al.*, 2009). Sua

distribuição compreende desde o estado do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, ao longo da costa brasileira (Mittermeier *et al.*, 2004; Tabarelli *et al.*, 2005). É um bioma bastante heterogêneo, que se estende dentre as latitudes 4° ao Norte e 32° ao Sul, cobrindo áreas tropicais e subtropicais com uma diversa cobertura vegetal e ampla variação climática. Portanto, se caracteriza por diferentes formações florestais, que são: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista (Mata de Araucárias); Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; e Floresta Estacional Decidual. São encontradas áreas de savana, savana-estépica, estepe, áreas de formações pioneiras, tais como manguezais, vegetações de restingas e campos salinos, áreas de refúgio vegetal e áreas de tensão ecológica (Figura 12) (Tabarelli *et al.*, 2005; MMA, 2019).

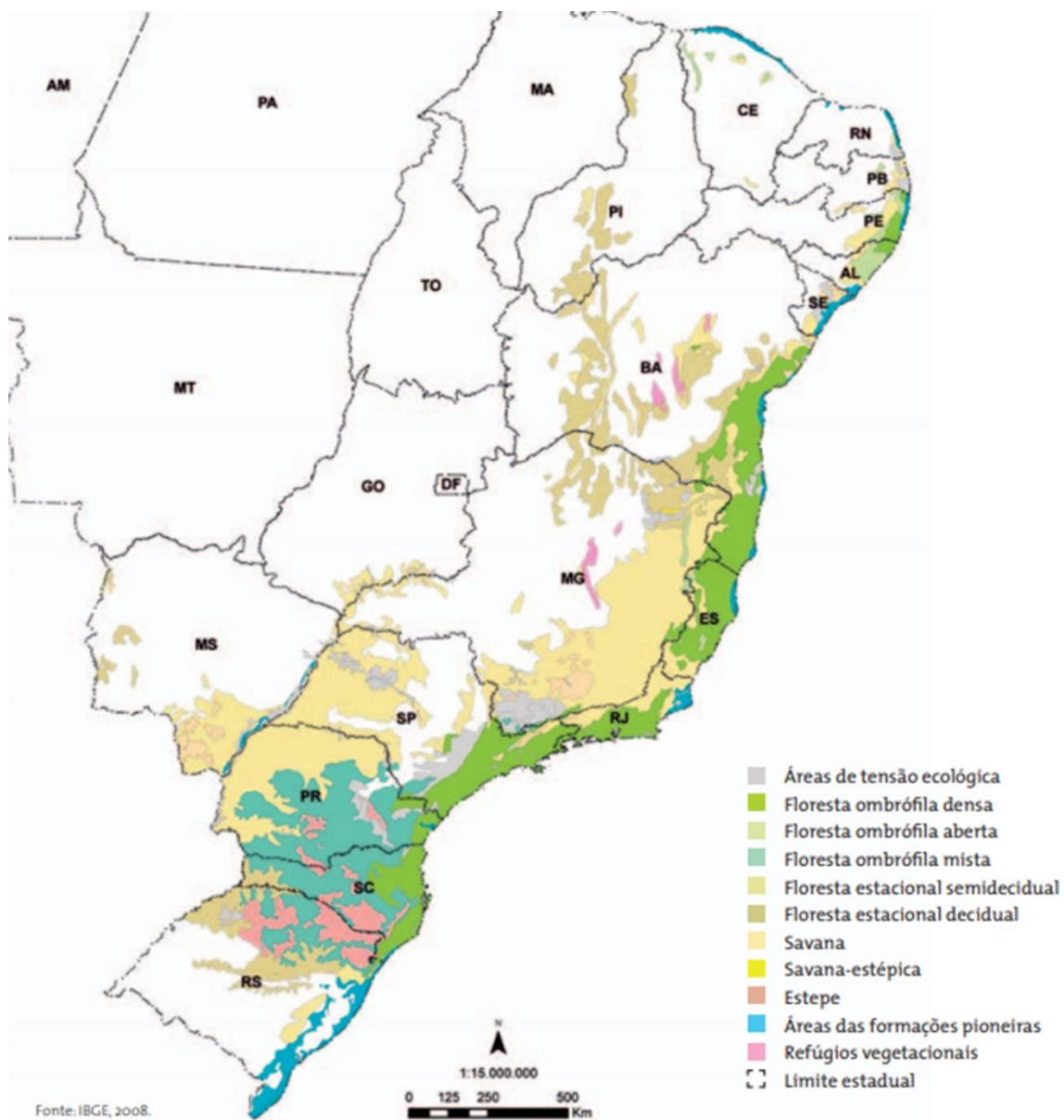


Figura 12: Cobertura vegetal da Mata Atlântica brasileira (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2019).

A Mata Atlântica é considerada um dos 36 *hotspots* mundiais de biodiversidade, uma vez que possui alta diversidade e alto grau de endemismo de espécies de animais e plantas, algumas ameaçadas de extinção (Myers *et al.*, 2000; Mittermeier *et al.*, 2004; 2011; Noss *et al.*, 2015; Conservation International, 2019). É um dos biomas brasileiros mais impactados pela expansão urbana e atividade econômica, restando apenas 12,4% de sua cobertura original (Myers *et al.*, 2000; Mittermeier *et al.*, 2004; Colombo & Joly, 2010; Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2019) a qual é composta, em sua maioria, por fragmentos menores de 50 hectares (Figura 13) (Ribeiro *et al.*, 2009). Esta perda de *habitat* é consequência da exploração de recursos florestais e uso da terra para atividades, tais como agricultura e pecuária, o que pode acelerar o processo de extinção de espécies e redução da biodiversidade (Tabarelli *et al.*, 2005; Gentile *et al.* 2018).

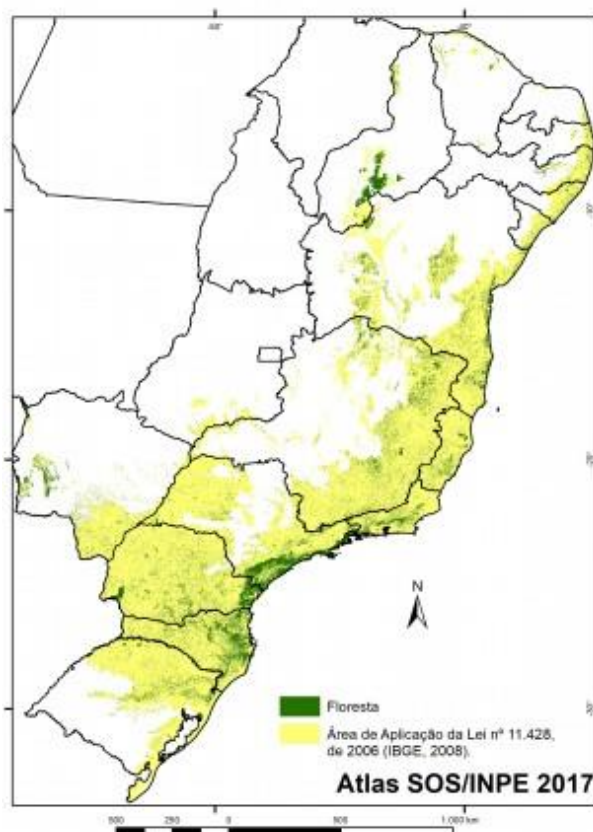


Figura 13: Distribuição atual da Mata Atlântica brasileira, mostrando os fragmentos florestais remanescentes (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2019).

1.5 Estudos filogeográficos envolvendo helmintos parasitos

Estudos de biodiversidade de helmintos parasitos são tradicionalmente realizados com base na morfologia e morfometria (Anderson, 2009). Contudo,

análises moleculares baseadas em sequências de nucleotídeos também são utilizadas a fim de complementar e permitir uma correta delimitação de espécies (Dayrat *et al.*, 2005). A filogeografia é uma disciplina que visa conhecer e compreender os padrões e processos que determinam a distribuição geográfica atual de linhagens genealógicas dentro e entre espécies proximamente relacionadas. Estes estudos correlacionam eventos históricos e componentes filogenéticos, permitindo compreender a evolução das diferentes linhagens (Avise, 2000; 2004). Normalmente, os estudos filogeográficos são realizados a partir de reconstruções filogenéticas de uma espécie, quando se procura determinar a existência de congruência entre linhagens genéticas e sua distribuição espacial (Miyaki, 2009).

O DNAm tem sido de grande importância para o desenvolvimento da filogeografia, uma vez que possui características que são pré-requisitos para estes estudos. O principal pré-requisito do DNAm é o fato de, na maioria das espécies animais, acumular altas taxas de substituição na sequência de nucleotídeos, que é muitas vezes mais rápida que no DNA nuclear. Além disto, possui origem maternal, não sofre recombinação e raramente são encontradas regiões espaçadoras, íntrons, pseudogenes e sequências repetitivas (Avise, 2009).

Estudos filogeográficos envolvendo helmintos parasitos têm sido realizados com objetivo de avaliar a variabilidade e estrutura genética das populações, o que permite compreender os padrões de distribuição geográfica e de dispersão das mesmas, bem como possíveis localidades de introdução de diferentes espécies destes organismos (Haag *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019). Além disso, a estrutura genética de parasitos também pode ser utilizada para compreender a estrutura populacional de seus hospedeiros (Nieberding *et al.*, 2004; Criscione *et al.*, 2005).

1.6 Justificativa

Estudos filogenéticos e de estrutura genética de populações envolvendo nematódeos parasitos de animais silvestres têm relevância para a compreensão da dinâmica de infecção de um parasito, de sua especificidade quanto ao hospedeiro, bem como permite identificar complexos de espécies crípticas e compreender a estrutura genética de populações de seus hospedeiros. No entanto, são escassos os estudos de genética de populações voltados para parasitos de animais silvestres, os

quais estabelecem suas populações naturalmente, sem manejo humano (Nieberding *et al.*, 2004; Criscione *et al.*, 2005; Nadler & De León, 2011; Cole & Viney, 2018).

Uma vez que *A. raillieti* é um parasito de diferentes espécies de animais silvestres em uma ampla distribuição geográfica, utilizamos este nematódeo para realizar estudos de diversidade fenotípica e molecular. Assim, estas análises possibilitaram identificar padrões de distribuição das populações de *A. raillieti* em diferentes espécies hospedeiras de diversas localidades inseridas no bioma Mata Atlântica do Brasil. Isto permitiu examinar os efeitos da geografia e das espécies hospedeiras na distribuição deste nematódeo. Além disso, este estudo possibilitou verificar as relações entre as populações de *A. raillieti* da Mata Atlântica, caracterizando haplogrupos e identificar se havia correlação entre os padrões de estruturação genética e a diversidade fenotípica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Conhecer os padrões de estruturação populacional de *A. raillieti*, parasitos de marsupiais da tribo Didelphini ao longo da Mata Atlântica, baseado na diversidade genética e fenotípica.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a diversidade haplotípica baseada no gene MT-CO1.
- Inferir as relações evolutivas entre as populações de *A. raillieti*.
- Identificar possíveis haplogrupos e a existência de estruturação genética de populações nas localidades ou hospedeiros estudados.
- Verificar a existência de correlação entre os padrões de estruturação genética e diversidade fenotípica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos marsupiais *Didelphini* e do nematódeo *Aspidodera raillieti*

As espécies de marsupiais *Didelphini* hospedeiras de *A. raillieti* estudadas foram *Didelphis aurita*, *D. albiventris* e *Philander quica*, provenientes de diferentes localidades do bioma Mata Atlântica: municípios de Mamanguape e Santa Rita, Estado da Paraíba (MAM/PB e SRT/PB); município de Cariacica, Estado do Espírito Santo (CAR/ES); municípios de Paraty, Petrópolis e Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro (PTY/RJ, PET/RJ e RIO/RJ); município de São Gonçalo do Sapucaí, Estado de Minas Gerais (SGS/MG); município de Curitiba, Estado do Paraná (CUR/PR); município de Santo Amaro da Imperatriz, Estado de Santa Catarina (SAI/SC) e município de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul (POA/RS) (Figura 14, Tabela 1). Os marsupiais foram obtidos a partir de coletas realizadas durante atividade do Serviço de Referência do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (SR/LABPMR) do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) e pelo projeto intitulado “Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilas e parasitos na Mata Atlântica”, realizado pelo Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBIO) do MCTI no período do ano de 2013 a 2016, Processo CNPq: 457524/2012-0. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes de captura, manejo e cuidado da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC, licença LW-39/14, protocolo P-70/13-2). As licenças para captura dos animais foram concedidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/SISBIO, licença 13373-1) e pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA, licença 020/2011), de acordo com as regulamentações brasileiras.

Espécimes de marsupiais foram capturados vivos, em 5 a 10 transectos por localidade, com 15 ou 20 pontos por transecto. Em cada ponto, foram colocadas duas armadilhas dos modelos Tomahawk (modelo 201, Tomahawk Live Trap, Hazelhurst, Wisconsin; 16X5X5 polegadas [40.6X12.7X12.7 cm]) e Sherman (modelo XLK, H.B. Sherman Traps, Tallahassee, Florida; 3X3.75X12 polegadas [7.6X9.5X30.5 cm]) no chão e alguns pontos com armadilha no sub-bosque. Os procedimentos de captura duraram cinco ou dez noites consecutivas. Os espécimes capturados foram anestesiados com 100 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina à 10%

associado a 20 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina à 2%, na proporção de 2:1, e eutanasiados, após constatada a ausência de consciência, por exsanguinação ou induzido pela administração de Tiopental Sódico 5% (Dosagem = 120 mg/Kg) por via intracardíaca (dose = 0,24 mL/100 g peso corpóreo) ou intraperitoneal. Posteriormente, os helmintos foram coletados, assim como as amostras relacionadas ao SR/LABPMR. Em seguida, suas peles foram taxidermizadas, suas carcaças fixadas em etanol 70% e, posteriormente, peles e esqueletos foram depositados na coleção científica do LABPMR.

Tabela 1: Localidades geográficas e espécies de marsupiais hospedeiras de *Aspidodera raillieti* utilizadas no presente estudo, com suas respectivas coordenadas geográficas.

Localidades Geográficas	Abreviação	Espécies Hospedeiras	N	Coordenadas Geográficas
Mamanguape, PB	MAM/PB	<i>D. albiventris</i>	5	6° 43' 17" S, 35° 10' 49" O
Santa Rita, PB	SRT/PB	<i>D. albiventris</i>	4	7° 0'56.41" S, 34°57'0.29" O
Cariacica, ES	CAR/ES	<i>Didelphis aurita</i>	1	20° 16' 28.69" S, 40° 30' 25.62" O
Petrópolis, RJ	PET/RJ	<i>D. aurita</i>	3	22° 29' 09.6" S, 43° 07' 11.3" O
Rio de Janeiro, RJ	RIO/RJ	<i>D. aurita</i>	4	22° 56' 57" S, 43° 25' 32" O
Paraty, RJ	PTY/RJ	<i>D. aurita</i>	7	23° 07' 15.9" S, 44° 43' 52.3" O
São Gonçalo do Sapucaí, MG	SGS/MG	<i>D. albiventris</i>	2	21° 59' 40.99" S, 45° 36' 26.61 O
Curitiba, PR	CUR/PR	<i>D. aurita</i> ; <i>D. albiventris</i>	2; 3	25° 33' 19" S, 49° 14' 06" O
Santo Amaro da Imperatriz, SC	SAI/SC	<i>Philander quica</i>	4	27° 52' 27" S, 48° 49' 26" O
Porto Alegre, RS	POA/RS	<i>D. albiventris</i>	4	30° 4' 17.6952" S, 51° 7' 28.326" O

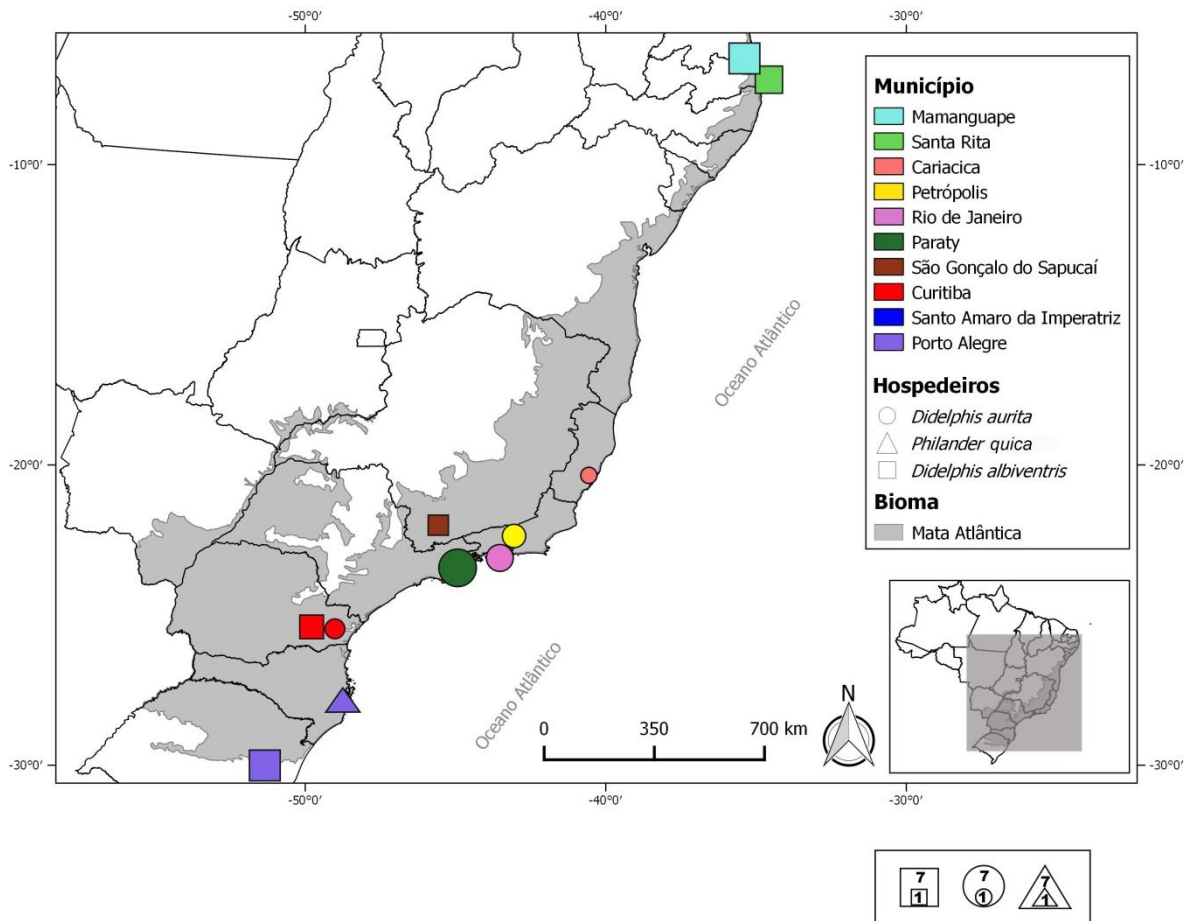


Figura 14: Localidades das coletas dos marsupiais. O tamanho dos símbolos referente às espécies hospedeiras é proporcional ao número de hospedeiros por localidade.

A coleta dos espécimes de *A. raillieti* foi realizada através de pesquisa no ceco e intestino grosso de seus hospedeiros. Esses órgãos foram colocados separadamente em placas de Petri e lavados em solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e dissecados com auxílio de microscópio estereoscópico. Os nematódeos foram lavados em solução fisiológica, contados e conservados em etanol a 70% para posterior estudo morfológico, morfométrico e caracterização molecular. Todos os espécimes foram acondicionados em frascos de vidro identificados por seu respectivo número do hospedeiro e sítio em que foram encontrados no hospedeiro.

3.2 Identificação taxonômica de *Aspidodera raillieti*

Os espécimes de *A. raillieti* foram diafanizados com álcool glicerinado 25%, colocados entre lâmina e lamínula, analisados e identificados com auxílio de microscópio de luz (Zeiss Standard 20) acoplado a uma câmara clara. A identificação da espécie foi baseada em caracteres morfológicos e morfométricos de

acordo com Santos *et al.* (1990), Vicente *et al.* (1997) e Anderson (2009). Os caracteres morfológicos foram: forma dos cordões cefálicos, forma do interlábio, presença ou ausência de papilas e anfídeos nos lábios dorsal e látero-ventrais, cordões ultrapassando ou não o nível do vestíbulo, cordões tocando ou não a base da coifa cefálica, projeções dos lábios látero-ventrais. Os caracteres morfométricos estão descritos na sessão de análises morfométricas.

3.3 Comparação morfológica entre espécimes de *Aspidodera raillieti* provenientes de diferentes localidades geográficas e hospedeiros

Espécimes de *A. raillieti* conservados em etanol 70% foram colocados individualmente em placas de Petri. Com auxílio de bisturi, os exemplares foram seccionados, sendo retiradas as extremidades anterior e posterior dos machos e somente a extremidade anterior das fêmeas. Estas regiões do corpo do nematódeo contêm caracteres para identificação taxonômica da espécie, portanto foram guardadas para posterior estudo da morfologia através de MEV, a fim de identificar diferenças que estivessem correlacionadas com as análises moleculares. A parte do meio do corpo de cada indivíduo foi lavada em água destilada autoclavada e guardado a -20°C para posteriormente proceder ao isolamento de DNA.

Para análises por MEV, os nematódeos foram mantidos por uma hora, a temperatura ambiente, em solução 2,5% de glutaraldeído e, então, lavados em 0,1 M de solução tampão de cacodilato de sódio em 3,5% de sacarose, pH 7,2. Em seguida, foram pós-fixados por 2 horas, à temperatura ambiente, em solução de 2% de tetróxido de ósmio em 0,2 M de tampão cacodilato de sódio com 7% de sacarose. Os nematódeos foram então lavados três vezes em tampão 0,1 M de cacodilato com 3,5% de sacarose. Após a lavagem, os espécimes foram desidratados em série etanólica crescente, por 1 hora, cada etapa e secos pelo método de ponto crítico com CO₂. Os espécimes foram aderidos a um suporte de alumínio cilíndrico revestido com fita de carbono com revestimento duplo e metalizados com uma camada de ouro de aproximadamente 20 nm. Posteriormente, foram analisados em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

3.4 Comparação morfométrica entre espécimes de *Aspidodera raillieti* provenientes de diferentes localidades geográficas e hospedeiros

Para análise morfométrica, foram mensuradas estruturas de importância taxonômica de cinco espécimes machos e de cinco espécimes fêmeas de *A. raillieti* provenientes de cada espécime hospedeiro estudado. Porém, não havia disponibilidade desta quantidade de espécimes de *A. raillieti* para todos os hospedeiros. Os espécimes utilizados nas análises morfométricas não correspondem aos utilizados nas análises moleculares e morfológicas por MEV, portanto não foi possível correlacioná-las. Para machos e fêmeas foram mensurados: comprimento e largura do corpo, comprimento do esôfago, comprimento e largura do bulbo, distância do anel nervoso e poro excretor com relação à extremidade anterior, comprimento e largura da coifa e comprimento do cordão cefálico. Somente para os machos, foram mensurados: comprimento dos espículos, do gubernáculo, do espinho caudal, comprimento e largura da ventosa pré-cloacal e distância da cloaca à extremidade posterior. Para as fêmeas, foram mensuradas: distância da vulva e do ânus à extremidade posterior. As medidas foram agrupadas e comparadas considerando-se grupos: espécies hospedeiras e localidades de coleta. Uma vez que nas análises morfométricas não foram utilizados os espécimes correspondentes àqueles das análises moleculares e morfológicas, foram separados grupos por regiões de estudo, a fim de verificar se há diferenciação morfométrica evidente dos espécimes de localidades mais próximas. Portanto, foram definidos os grupos baseando-se nas regiões nordeste, sudeste e sul, separadamente.

A comparação da morfometria de *A. raillieti* entre os grupos previamente definidos foi realizada utilizando a Análise Discriminante Múltipla. Esta análise considera a variação entre grupos e pode ser usada para relacionar preditores quantitativos (neste caso, as medidas morfométricas) com variáveis qualitativas (neste caso, os grupos de espécies de hospedeiros, localidades separadamente e regiões) (Legendre & Legendre, 2012). Foi testado se a variação dentro de cada grupo foi homogênea (i.e., apresentou pouca variação dentro de cada grupo estudado) do que entre grupos. Para isto, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e testes de permutação. Atendendo-se aos pressupostos da ANOVA e da análise discriminante, foi investigada a normalidade dos dados e aqueles que seguiram uma distribuição normal (não paramétricos) foram transformados (e.g.,

transformação logarítmica). Adicionalmente, o teste de Wilks foi utilizado para verificar a existência de diferença das médias entre grupos, considerando-se as variáveis morfométricas utilizadas. O valor de Lambda de Wilks pode variar entre 0 e 1, onde valores mais próximos de 0 indicam maior discriminação entre os grupos e próximos a 1 indicam menor discriminação.

Todas as análises morfométricas foram realizadas no software R versão 3.4.2 (R Core Team, 2018), considerando-se o nível de significância de 5%. Para a Análise Discriminante foi utilizado o pacote MASS (Venables & Ripley, 2002) e para a ANOVA e testes de permutação foi utilizado o pacote vegan (Oksanen *et al.*, 2018).

3.5 Isolamento e amplificação de DNA

O DNA total de espécimes de *A. railletii* parasito das espécies *D. aurita*, *D. albiventris* e *P. quica*, foi isolado utilizando o kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante com adaptações (Apêndice 1). O DNA isolado foi armazenado a -20°C até o momento do uso. A dosagem do DNA foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop2000, da Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ, subunidade Sequenciador de Nova Geração – HiSeq2500. A partir do DNA total isolado, fragmentos do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 (MT-CO1) foram amplificados por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o coquetel de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) descrito por Prosser *et al.* (2013) (Tabela 2).

As amplificações foram realizadas a um volume final de 25 µL para cada amostra, utilizando 12,5 µL de PCR Master Mix (*Taq* DNA polimerase 50 unidades/ml, dATP 400 µM, dGTP 400 µM, dCTP 400 µM, dTTP 400 µM, MgCl₂ 3 mM) (Promega), 10,5 µL de água para biologia molecular ultrapura, 0,5 µL (10 µM) do coquetel de oligonucleotídeos iniciadores senso (*primers* Nem_F1, Nem_F2 e Nem_F3) e anti-senso (*primers* Nem_R1, Nem_R2 e Nem_R3), e 1,0 µL de DNA total (~1 - 4 ng/µL). A amplificação foi realizada no termociclador Veriti *Thermal Cycler* (Life Technologies) sob a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto; 5 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, hibridização a 45 °C por 40 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, hibridização a 51 °C por 40 segundos,

extensão a 72 °C por 1 minuto e 1 extensão final a 72 °C por 5 minutos (Prosser *et al.*, 2013).

A detecção do produto da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1,5%) e revelado com GelRed™ sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit* de purificação *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase descritos por Prosser *et al.* (2013).

<i>Primers</i>	<i>Sequência 5'→3'</i>
Nem_F1	TGTA AACGACGGCCAGTCRACWGTWAATCAYAARAATATTGG
Nem_F2	TGTA AACGACGGCCAGTARAGATCTAATCATAAAGATATYGG
Nem_F3	TGTA AACGACGGCCAGTARAGTTCTAATCATAARGATATTGG
Nem_R1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCWGGRTGACCAAAAAATCA
Nem_R2	CAGGAAACAGCTATGACTAWACYTCWGGRTGMCCAAAAAYCA
Nem_R3	CAGGAAACAGCTATGACTAAACCTCWGGATGACCAAAAAATCA

3.6 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando o *Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas no termociclador Veriti Thermal Cycle (*Life Technologies*) sob a seguinte ciclagem: desnaturação a 94 °C por 10 segundos, hibridização a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos; seguindo-se 40 repetições deste ciclo. Após término das reações, os processos de precipitação e leitura das mesmas foram realizados na Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ, subunidade RPT01A – Sequenciamento de DNA.

3.7 Análise de sequências

Os cromatogramas das sequências obtidas foram analisados e as sequências editadas, utilizando o pacote de programas Geneious R9 (Kearse *et al.*, 2012), formando um consenso (*contig*) a partir de seis sequências do gene MT-CO1 para cada indivíduo de *A. raillieti*. Em seguida, foi realizada uma pesquisa comparativa de similaridade no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), a fim de identificar se o fragmento sequenciado correspondia ao gene MT-CO1 e ao organismo-alvo.

Após verificação, as sequências foram reunidas a sequências de espécies dos gêneros *Aspidodera* e *Nematomystes*, e *Lauroia*, como grupo externo, provenientes do GenBank (Tabela 3). O conjunto de dados resultante foi alinhado através de alinhamento múltiplo usando os algoritmos do programa Muscle (Edgar, 2004), executados no pacote Geneious. No pacote de programas Mesquite versão 3.03 (Maddison & Maddison, 2011), as extremidades da matriz com diferenças no comprimento das sequências foram removidas.

Tabela 3: Espécies representantes da família Aspidoderidae, números de acesso, localidade geográfica da origem do espécime e hospedeiros: GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Jiménez *et al.*, 2013)

Espécies	Números de Acesso	Localidades	Hospedeiros
<i>A. raillieti</i>	KC470125	Bolívia	<i>Didelphis pernigra</i>
<i>A. raillieti</i>	KC470126	Bolívia	<i>D. pernigra</i>
<i>A. sogandaresi</i>	KC470131	México	<i>Dasypus novemcinctus</i> Linnaeus, 1758
<i>A. kinsellai</i>	KC470134	México	<i>D. novemcinctus</i>
<i>A. kinsellai</i>	KC470133	México	<i>D. novemcinctus</i>
<i>A. kinsellai</i>	KC470132	Costa Rica	<i>D. novemcinctus</i>
<i>Lauroia trinidadensis</i>	KC470135	México	<i>D. novemcinctus</i>
<i>Nematomystes rodentophilus</i>	KC470130	Argentina	<i>Oxymycterus paramensis</i> Thomas, 1902
<i>N. scapteromi</i>	KC470129	Argentina	<i>Scapteromys aquaticus</i> Thomas, 1920

3.7.1 Análise de saturação das substituições

O teste de Xia foi realizado no programa DAMBE (Xia & Xie, 2001), no qual 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 e para cada posição dos códons, separadamente, na matriz. $I_{ss,c}$ representa o valor de I_{ss} no qual as sequências começam a não recuperar a árvore verdadeira. 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 $I_{ss,c}$, indica que as sequências experimentam saturação severa nas substituições. São considerados valores de $I_{ss,c}$ diferentes para topologias simétricas e assimétricas (Figura 15). Foram calculados valores diferentes de I_{ss} e $I_{ss,c}$ para diferentes números de OTUs (Unidades Operacionais Taxonômicas).

Os níveis de confiança foram calculados através do teste t bicaudal a fim de verificar se as diferenças entre os valores de I_{ss} e $I_{ss,c}$ foram significativas, tendo sido considerado o nível de significância de 5%.

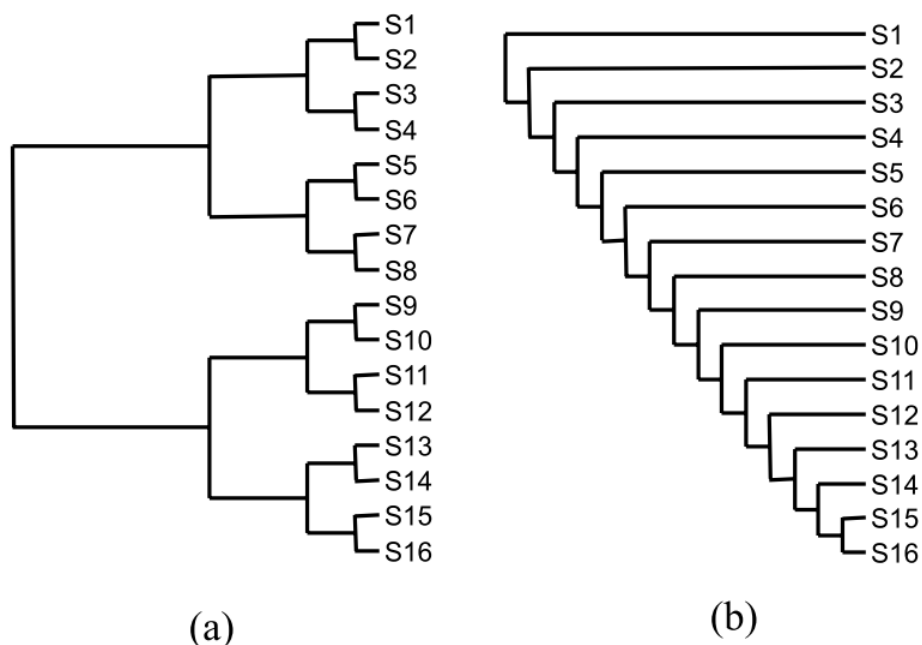


Figura 15: (a) topologia simétrica; (b) topologia assimétrica (Xia *et al.*, 2003).

3.8 Análises moleculares

As reconstruções filogenéticas por máxima verossimilhança (MV) foram realizadas no programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010). A seleção do modelo de

substituição de nucleotídeos foi executada com SMS (*Smart Model Selection*) (Lefort *et al.*, 2017) no PhyML, usando o critério de informação de Akaike (AIC). O apoio estatístico para avaliar a confiabilidade dos ramos foi obtido por *bootstrap* (BP), com 1000 pseudoréplicas, e *Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches* (aLRT). Valores de BP menores do que 50% não foram mostrados na árvore.

A inferência filogenética bayesiana (IB) foi realizada usando o programa MrBayes, versão 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) executado no XSEDE usando o CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010). Para modelar os diferentes processos evolutivos em cada uma das três posições do códon, as análises de IB foram realizadas usando modelos GTR+I+G independentes para cada posição do códon, com frequências de base e parâmetros também independentes. As amostragens de cadeias de Markov foram realizadas ao longo de 10.000.000 de gerações a cada 100 gerações, com quatro cadeias simultâneas em duas execuções. A robustez dos nós foi avaliada pelas probabilidades posteriores bayesianas (BPP), calculadas após a remoção de uma fração de *burn-in* de 25%. Para avaliar a adequação de nossa amostragem, usamos o programa Tracer, versão 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014), para calcular os tamanhos efetivos das amostras (ESS, *effective sample size*) dos parâmetros. Valores acima de 100 amostras efetivamente independentes foram considerados suficientes.

Para cálculo de índices de diversidade genética e análises filogeográficas, foi gerada uma matriz de dados contendo somente as sequências geradas no estudo, e duas sequências de *A. raillieti* da Bolívia provenientes do GenBank.

No programa DNAsp, versão 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009), as sequências de *A. raillieti* foram organizadas em grupos de acordo com: os clados recuperados nas inferências filogenéticas, por espécie hospedeira e por localidades amostradas. Desta forma, também no DNAsp, foi calculada a diversidade genética através dos números de haplótipos (H), sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π) para cada um dos grupos.

Para testar desvio de neutralidade, foram executados no programa Arlequin, versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e Fs de Fu (Fu, 1997) para cada um dos grupos previamente determinados. Valores significativamente negativos destes testes indicam expansão populacional ou seleção purificadora.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) e o Índice de Fixação (Fst) (Wright, 1978) foram calculados através do programa Arlequin

utilizando o modelo de substituição nucleotídica selecionado no programa PAUP, versão 4.0a166 (Swofford, 2003), utilizando o critério de informação de Akaike corrigido (AICc). AMOVA foi utilizada para analisar a variabilidade genética entre e dentro dos grupos previamente definidos. O F_{st} foi utilizado para medir a diferenciação genética entre os grupos. O valor de F_{st} varia de 0 a 1, onde valores próximos de um (1) indicam diferenciação genética entre populações.

O Teste de Mantel (Mantel, 1967), calculado utilizando o pacote *vegan* (Oksanen *et al.*, 2018) do software R versão 3.4.2 (R Core Team, 2018), foi utilizado para verificar a correlação entre as distâncias genéticas de todos os espécimes de *A. raillieti* e as distâncias geográficas, considerando todas as localidades geográficas estudadas. A matriz de distância genética foi calculada utilizando o modelo de substituição de nucleotídeo selecionado no programa PAUP, utilizando AICc. A matriz de distância geográfica foi construída a partir das coordenadas geográficas das localidades estudadas. Todas as análises foram realizadas considerando-se o nível de significância de 5%.

Redes de haplótipos para os espécimes de *A. raillieti* sequenciados foram calculadas, por *median joining*, no programa Network, versão 5.0.1.1 (Bandelt *et al.*, 1999). A matriz de dados foi convertida para formato utilizado pelo programa Network no DNAsp.

4 RESULTADOS

4.1 Análise de microscopia de luz

No presente estudo, todos os espécimes do gênero *Aspidodera* obtidos de ceco e intestino grosso dos marsupiais *D. aurita*, *D. albiventris* e *P. quica* apresentam caracteres na extremidade anterior e posterior, bem como a morfometria (Anexo 1), que confirmam a classificação como *A. raillieti* (Figura 16).

Os espécimes machos e fêmeas apresentam região cefálica com uma expansão cuticular adornada de cordões cefálicos anastomosados com seis alças longitudinais (figura 16A, 16B e 16C). Apresentam abertura oral trilabiada, sendo dois lábios látero-ventrais e um lábio dorsal, esôfago com bulbo posterior, anel nervoso e poro excretor presentes no nível médio do esôfago (Figura 16A). Os lábios látero-ventrais apresentam duas papilas dispostas paralelamente a um anffídeo (Figura 16B) e o lábio dorsal apresenta duas projeções arredondadas laterais (Figura 16C). Os machos apresentam ventosa pré-cloacal, um par de espículos de tamanhos sub-iguais, gubernáculo e cauda terminando em projeção pontiaguda e com numerosas papilas (Figuras 16D e 16E); e as fêmeas apresentam vulva em forma de fenda na porção média do corpo.

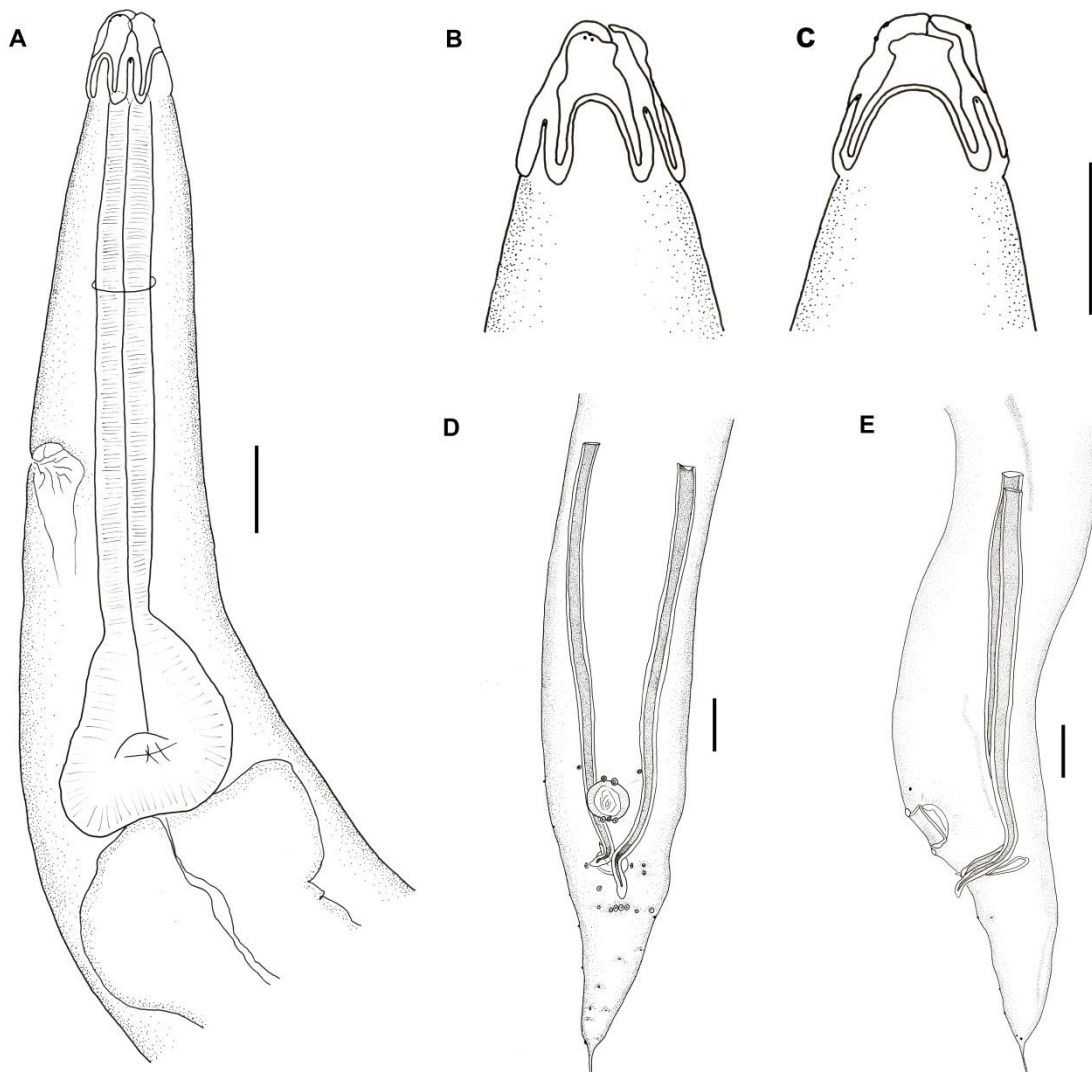


Figura 16: Desenho em câmara clara de espécime macho adulto de *A. raillieti*. **A)** Vista lateral da região anterior mostrando expansão cuticular cefálica, anel nervoso, poro excretor e esôfago terminando em um bulbo esofágico. **B)** Detalhe da extremidade cefálica mostrando detalhe dos cordões cefálicos e um dos lábios látero-ventrais com duas papilas e um anfidéu. **C)** Detalhe da extremidade cefálica mostrando o lábio dorsal. **D)** Vista ventral da região posterior do macho mostrando um par de espículos, ventosa, cloaca, papilas e projeção digitiforme. **E)** Vista lateral da região posterior do macho mostrando espículos, gubernáculo, ventosa e projeção digitiforme. Escala: 0,1 mm.

4.2 Amplificações e análise de seqüências de DNA

No presente estudo, um total de 193 espécimes de *A. raillieti* parasitos de 17 espécimes de *D. aurita*, coletados nas localidades CAR/ES, PET/RJ, RIO/RJ, PTY/RJ e CUR/PR, de 18 espécimes de *D. albiventris*, coletados nas localidades SRT/PB, MAM/PB, SGS/MG, CUR/PR, POA/RS; e de 4 espécimes de *P. quica*,

coletados na localidade SAI/SC (Tabela 4), tiveram fragmentos do gene MT-CO1 amplificados e sequenciados.

Obtivemos duas matrizes neste estudo. A primeira, utilizada para inferências filogenéticas, resultou do alinhamento das sequências de *A. raillieti* obtidas no presente estudo juntamente com as da família Aspidoderidae provenientes do GenBank, que totalizou 203 sequências com 504 pares de base (pb) cada. A segunda matriz, utilizada para análises filogeográficas, resultou do alinhamento apenas das sequências de *A. raillieti* obtidas no presente estudo com 2 sequências da Bolívia, provenientes do GenBank, que totalizou 195 sequências com 489 pb.

Tabela 4: Hospedeiros, por localidade, utilizados neste estudo e suas respectivas espécies e sexo. Está representado o número de espécimes de *A. raillieti* (N) e haplótipos do parasito (H) encontrados em cada um dos espécimes hospedeiros estudados. LBCE (Laboratório de Biologia e Controle de Esquistossomose) - Número de identificação de cada hospedeiro.

ID - LBCE *	Espécie Hospedeira	Sexo do Hospedeiro	Localidade **	N	H
20726	<i>D. albiventris</i>	♀	SRT/PB	3	H_28, H_33, H_34
20732	<i>D. albiventris</i>	♀	SRT/PB	2	H_30, H_40
20752	<i>D. albiventris</i>	♂	SRT/PB	5	H_10, H_29, H_44, H_46, H_47
20756	<i>D. albiventris</i>	♂	SRT/PB	2	H_31, H_45
19239	<i>D. albiventris</i>	♂	MAM/PB	1	H_46
19240	<i>D. albiventris</i>	♂	MAM/PB	1	H_35
19241	<i>D. albiventris</i>	♂	MAM/PB	1	H_48
19244	<i>D. albiventris</i>	♂	MAM/PB	2	H_27, H_32
19246	<i>D. albiventris</i>	♂	MAM/PB	1	H_46
20642	<i>D. aurita</i>	♂	CAR/ES	3	H_1, H_26
20939	<i>D. albiventris</i>	♂	SGS/MG	15	H_91, H_94, H_95, H_98, H_102, H_106, H_109, H_110, H_111, H_113, H_115
20941	<i>D. albiventris</i>	♀	SGS/MG	7	H_95, H_98, H_102, H_108, H_109, H_116, H_117
19458	<i>D. aurita</i>	♀	PET/RJ	4	H_100, H_101, H_103, H_104
19467	<i>D. aurita</i>	♀	PET/RJ	13	H_92, H_96, H_99, H_104, H_105, H_107, H_109, H_114
19477	<i>D. aurita</i>	♂	PET/RJ	3	H_104, H_114
20367	<i>D. aurita</i>	♀	RIO/RJ	4	H_4, H_14, H_16
20368	<i>D. aurita</i>	♂	RIO/RJ	1	H_9
20370	<i>D. aurita</i>	♂	RIO/RJ	16	H_9, H_22, H_23, H_84, H_86, H_87, H_88, H_89, H_90, H_93, H_97
20372	<i>D. aurita</i>	♀	RIO/RJ	14	H_2, H_3, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9, H_11, H_12, H_24, H_25
18343	<i>D. aurita</i>	♀	PTY/RJ	3	H_9, H_15, H_97
18344	<i>D. aurita</i>	♀	PTY/RJ	1	H_9
18345	<i>D. aurita</i>	♀	PTY/RJ	2	H_9, H_19
21227	<i>D. aurita</i>	♀	PTY/RJ	3	H_9, H_85
21230	<i>D. aurita</i>	♀	PTY/RJ	8	H_9, H_13, H_14, H_17, H_18, H_20

Continuação da tabela 4

21231	<i>D. aurita</i>	♂	PTY/RJ	4	H_9, H_22
21237	<i>D. aurita</i>	♀	PTY/RJ	6	H_9, H_15, H_21
21130	<i>D. aurita</i>	♀	CUR/PR	6	H_17, H_51, H_52, H_56, H_63, H_82
21133	<i>D. aurita</i>	♀	CUR/PR	8	H_53, H_57, H_61, H_63, H_64, H_65
21134	<i>D. albiventris</i>	♀	CUR/PR	4	H_54, H_58, H_59, H_62
21160	<i>D. albiventris</i>	♀	CUR/PR	3	H_50, H_60, H_65
21212	<i>D. albiventris</i>	♂	CUR/PR	2	H_54, H_80
19040	<i>P. quica</i>	♂	SAI/SC	1	H_66
19303	<i>P. quica</i>	♂	SAI/SC	6	H_70, H_71, H_73, H_82
19304	<i>P. quica</i>	♂	SAI/SC	5	H_67, H_68, H_71, H_78, H_83
19323	<i>P. quica</i>	♀	SAI/SC	5	H_55, H_71, H_78, H_79
19401	<i>P. quica</i>	♂	SAI/SC	6	H_69, H_71, H_74, H_76, H_81
20588	<i>D. albiventris</i>	♀	POA/RS	2	H_39, H_77
20594	<i>D. albiventris</i>	♀	POA/RS	7	H_38, H_42, H_71
20601	<i>D. albiventris</i>	♀	POA/RS	8	H_38, H_41, H_42, H_71, H_77
20602	<i>D. albiventris</i>	♂	POA/RS	5	H_42, H_43, H_71, H_77

* LBCE: atual Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR).

** SRT/PB: Santa Rita, PB; MAM/PB: Mamanguape, PB; CAR/ES: Cariacica, ES; SGS/MG: São Gonçalo do Sapucaí; PET/RJ: Petrópolis, RJ; RIO/RJ: Rio de Janeiro, RJ; PTY/RJ: Paraty, RJ; CUR/PR: Curitiba, PR; SAI/SC: Santo Amaro da Imperatriz, SC; POA/RS: Porto Alegre, RS.

4.3 Análise de saturação das substituições nucleotídicas

Considerando que nossas topologias não são totalmente simétricas e nem totalmente assimétricas, os valores de I_{SS} para toda a matriz foram significativamente menores do que os valores $I_{SS.cSim.}$ e $I_{SS.cAssim.}$, constatando que há pouca saturação nas substituições (Tabela 5). As primeiras, segundas e terceiras posições dos códons também apresentaram pouca saturação (Tabela 6, 7 e 8), com valores de I_{SS} significativamente menores do que os valores de $I_{SS.cSim.}$ e $I_{SS.cAssim.}$.

Tabela 5: Número de unidades operacionais taxonômicas (N_{OTU}); 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 respectivos valores de p .

N_{OTU}	I_{SS}	$I_{SS.cSim.}$	p	$I_{SS.cAssim.}$	p
4	0,080	0,796	0,0000	0,762	0,0000
8	0,082	0,752	0,0000	0,640	0,0000
16	0,082	0,721	0,0000	0,512	0,0000
32	0,080	0,703	0,0000	0,378	0,0000

Tabela 6: Número de unidades operacionais taxonômicas (N_{OTU}); valores de I_{SS} , $I_{SS.c}$ para topologia simétrica ($I_{SS.cSim.}$) e $I_{SS.c}$ para topologia assimétrica ($I_{SS.cAssim.}$) das primeiras posições dos códons; e respectivos valores de p .

N_{OTU}	I_{SS}	$I_{SS.cSim.}$	p	$I_{SS.cAssim.}$	p
4	0,026	0,778	0,0000	0,779	0,0000
8	0,024	0,741	0,0000	0,652	0,0000
16	0,025	0,628	0,0000	0,453	0,0000
32	0,025	0,705	0,0000	0,404	0,0000

Tabela 7: Número de unidades operacionais taxonômicas (N_{OTU}); valores de I_{SS} , $I_{SS.c}$ para topologia simétrica ($I_{SS.cSim.}$) e $I_{SS.c}$ para topologia assimétrica ($I_{SS.cAssim.}$) das segundas posições dos códons; e respectivos valores de p .

N_{OTU}	I_{SS}	$I_{SS.cSim.}$	p	$I_{SS.cAssim.}$	p
4	0,005	0,778	0,0000	0,779	0,0000
8	0,006	0,741	0,0000	0,652	0,0000
16	0,006	0,628	0,0000	0,453	0,0000
32	0,007	0,705	0,0000	0,404	0,0000

Tabela 8: Número de unidades operacionais taxonômicas (N_{OTU}); valores de I_{SS} , $I_{SS.c}$ para topologia simétrica ($I_{SS.cSim.}$) e $I_{SS:c}$ para topologia assimétrica ($I_{SS.cAssim.}$) das terceiras posições dos códons; e respectivos valores de p .

N_{OTU}	I_{SS}	$I_{SS.cSim.}$	p	$I_{SS.cAssim.}$	p
4	0,084	0,796	0,0000	0,762	0,0000
8	0,081	0,752	0,0000	0,640	0,0000
16	0,079	0,721	0,0000	0,512	0,0000
32	0,081	0,703	0,0000	0,378	0,0000

4.4 Análises moleculares

O modelo de substituição de nucleotídeos selecionado pelo AIC no PhyML-SMS foi TN93+G+I, com proporção de sítios invariáveis estimada de 0,594, parâmetro gama estimado de 0,532 e variação de taxas com quatro categorias. A árvore mais verossímil apresentou $\ln L = -3537,236501$. As frequências estimadas de bases foram: A = 0,21402, C = 0,08049, G = 0,24127, T = 0,464224. Para IB, a probabilidade marginal média estimada foi de -3502,9905 e a mediana foi de -3502,751. Os ESSs para todos os parâmetros estavam acima de 100 amostras efetivamente independentes, indicando a robustez de nossa amostragem.

As filogenias de MV e IB resultaram em topologias similares, com poucas variações nos nós (Figuras 17 e 18). Os espécimes de *A. raillieti* formaram um grupo monofilético em ambas as filogenias (BP-MV=0,42; aLRT=0,90; BPP=0,99). Dentro do grupo de *A. raillieti*, foram recuperados quatro clados principais, os quais foram identificados como clados I, II, III e IV. Clado I foi recuperado como grupo irmão dos outros três clados (BP-MV=0,77; aLRT=0,90; BPP=0,94). Clado II e III formaram um grupo monofilético (BP-MV \leq 0,5; aLRT=0,90; BPP=0,99) irmão do clado IV (BP-MV \leq 0,5; aLRT \leq 0,5; BPP=0,84).

Clado I (BP-MV=0,61; aLRT=0,91; BPP=0,99): espécimes de *A. raillieti*, parasitos de *D. albiventris* do estado do Rio Grande do Sul e parasitos de *D. pernigra* da Bolívia. Clado II (BP-MV=0,85; aLRT=0,88; BPP=1): espécimes de *A. raillieti*, parasitos de *D. albiventris* dos estados da Paraíba (Santa Rita e Mamanguape) e do Rio Grande do Sul. Clado III (BP-MV=0,98; aLRT=0,98; BPP=1): espécimes de *A. raillieti*, parasitos de *D. aurita* dos estados do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro e Paraty), Espírito Santo e Paraná, parasitos de *D. albiventris* do estado da Paraíba (Santa Rita e Mamanguape). Clado IV (BP-MV=0,68; aLRT=0,92;

BPP=0,98): espécimes de *A. raillieti*, parasitos de *D. aurita* dos estados do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Paraty e Petrópolis) e Paraná, por parasitos de *D. albiventris* dos estados de Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, e parasitos de *Philander quica* do estado de Santa Catarina (Figura 19).

A espécie *Nematomystes rodentophilus* agrupada, situada como grupo irmão de *A. raillieti* (BP-MV \leq 0,5; aLRT=0,84; BPP=0,93), e a espécie *N. scapteromi* foi recuperada como grupo irmão do clado composto por *N. rodentophilus* e *A. raillieti* (BP-MV \leq 0,5; aLRT=0,89; BPP=0,94). Somente para IB, as espécies *A. kinsellai* e *A. sogandaresi* formaram um grupo monofilético (BPP = 0,51) irmão do grupo composto por *A. raillieti* e as duas espécies do gênero *Nematomystes*. Na filogenia de MV, *A. kinsellai* formou um grupo irmão do clado composto por *A. raillieti* e o gênero *Nematomystes* (BP-MV \leq 0,5; aLRT=0,77), enquanto *A. sogandaresi* foi recuperada como grupo irmão de *A. kinsellai*, *A. raillieti* e do gênero *Nematomystes* (BP-MV=0,92; aLRT=0,99). A espécie *A. scapteromi* apareceu basal, formando um grupo irmão do clado composto pelas outras espécies do gênero *Aspidodera* e do gênero *Nematomystes*.

As distâncias genéticas calculadas utilizando o modelo de substituição 2-parâmetros de Kimura (K2P) a nível interespecífico e intraespecífico (gêneros *Aspidodera* e *Nematomystes*) e interclados e intraclados de *A. raillieti* estão representados na Tabela 9.

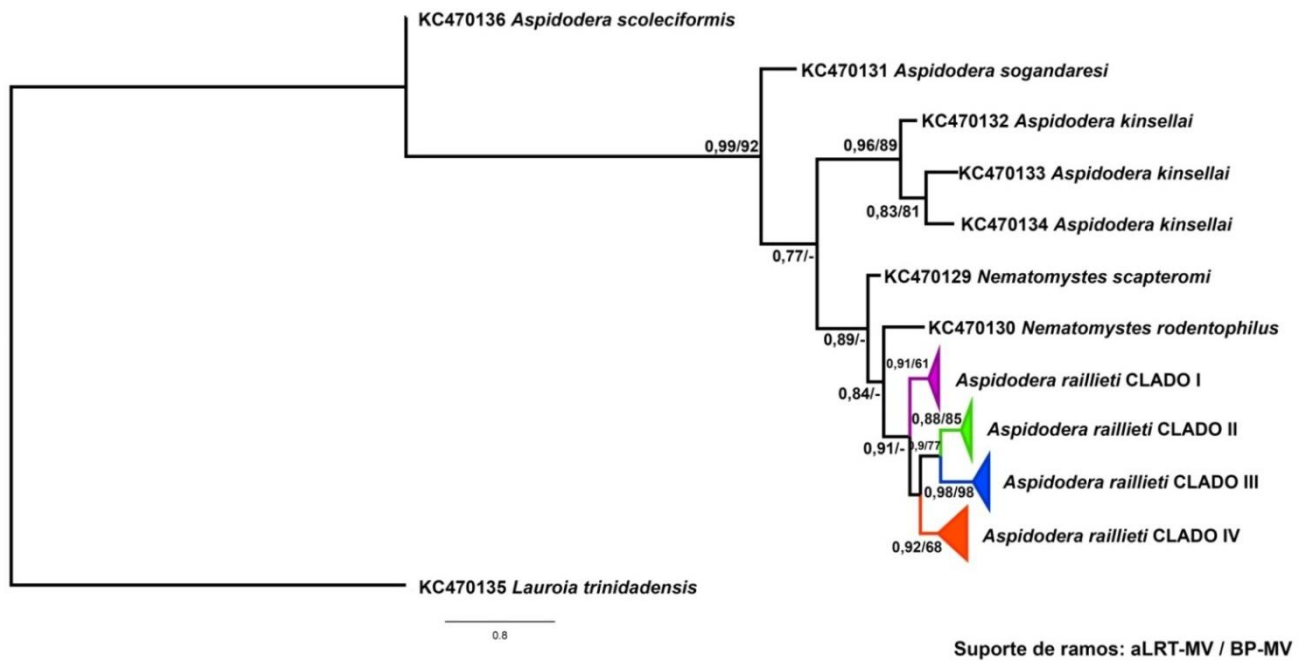


Figura 17: Reconstrução filogenética por MV baseadas em seqüências parciais do gene MT-CO1 (504 pb) de 193 espécimes de *Aspidodera raillieti*, parasitos de *D. aurita*, *D. albiventris* e *P. quica*, provenientes do bioma Mata Atlântica, e 10 seqüências de espécies pertencentes à família Aspidoderidae. Valores de aLRT e *bootstrap* (BP) dos ramos estão sobre ou sob os ramos (aLRT-MV / BP-MV). Os cladros recuperados de *Aspidodera raillieti* estão colapsados e identificados de clado I a clado IV.

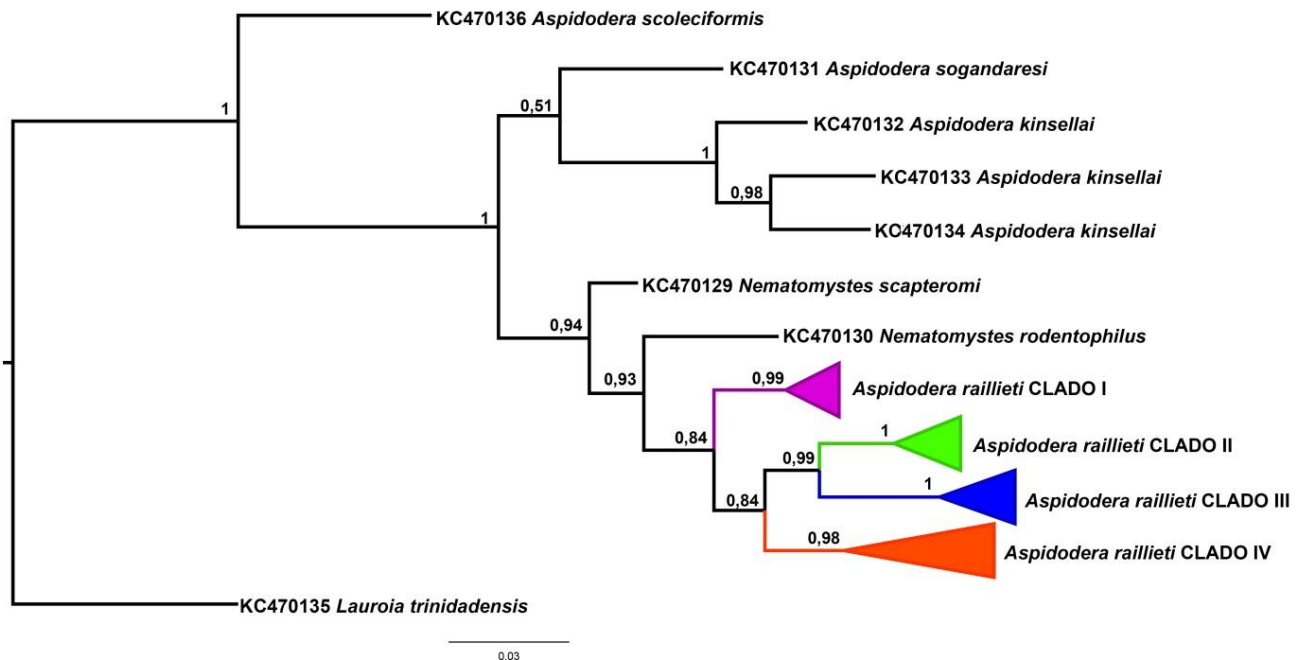


Figura 18: Reconstrução filogenética por IB baseadas em seqüências parciais do gene MT-CO1 (504) de 193 espécimes de *Aspidodera raillieti*, parasitos de *D. aurita*, *D. albiventris* e *P. quica*, provenientes do bioma Mata Atlântica, e 10 seqüências de espécies pertencentes à família Aspidoderidae. Valores das probabilidades posteriores bayesianas (BPP) dos ramos estão representados sobre os ramos. Os cladros recuperados de *Aspidodera raillieti* estão colapsados e identificados de clado I a clado IV.

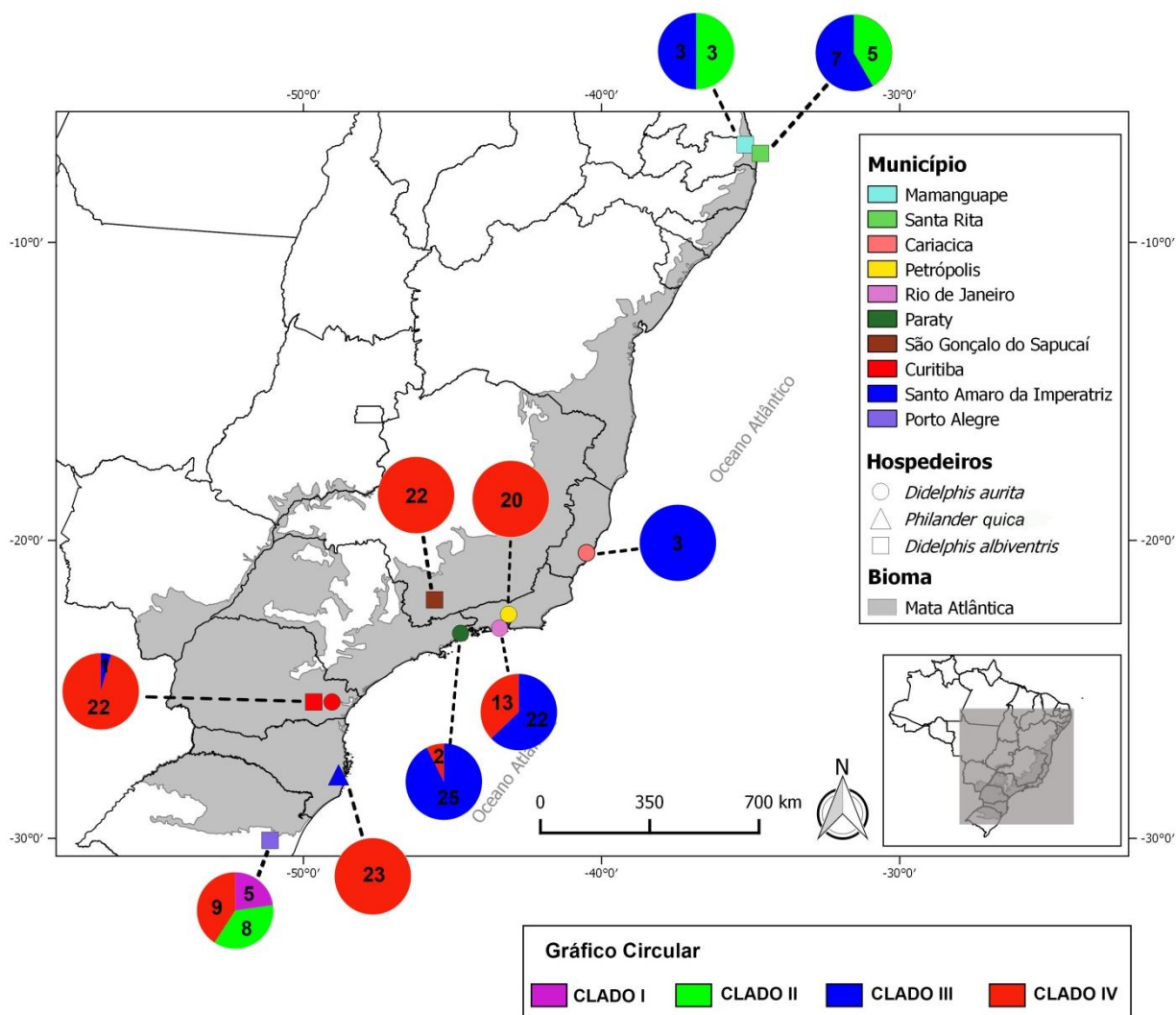


Figura 19: Distribuição geográfica dos clados propostos neste estudo e número de espécimes para cada grupo por localidades estudadas.

Tabela 9: Distâncias genéticas par-a-par (K2P) interespecífica e intraespecífica. Porcentagens mínimas e máximas dentro do gênero *Aspidodera* e *Nematomystes*.

	Interespecífico	Intraespecífico
<i>Aspidodera scoleciformis</i>	*	*
<i>Aspidodera kinsellai</i>	*	6,4 - 7,1
<i>Aspidodera sogandaresi</i>	*	*
<i>Aspidodera raillieti</i> clado I	*	0,2 - 2,2
<i>Aspidodera raillieti</i> clado II	*	0,2 - 2,6
<i>Aspidodera raillieti</i> clado III	*	0,2 - 3,7
<i>Aspidodera raillieti</i> clado IV	*	0,2 - 4,8
<i>Aspidodera raillieti</i> (Interclados)	*	5,2 - 10,4
<i>Aspidodera</i>	10,2 - 19,5	*
<i>Nematomystes</i>	7,2	*

* Não aplicável.

Dentre as 195 sequências parciais do gene MT-CO1 (489 pb) de *A. raillieti* estudadas, foram encontrados 117 haplótipos com 118 sítios polimórficos.

A composição do grupo dos clados recuperados nas filogenias está representada na Tabela 9. Os índices de diversidade molecular dos grupos separados por clados recuperados nas filogenias, espécies hospedeiras e localidades estão representados nas Tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10: Diversidade genética do gene MT-CO1 dos espécimes de *Aspidodera raillieti* baseada nos clados recuperados nas reconstruções filogenéticas. Número de indivíduos (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).

Clados	N	H	S	Hd	π
Clado I	7	4	11	0,81	0,0113
Clado II	16	9	16	0,85	0,00925
Clado III	61	35	52	0,88	0,01077
Clado IV	111	69	70	0,98	0,02121

Tabela 11: Diversidade genética do gene MT-CO1 dos espécimes de *Aspidodera raillieti* baseada nos grupos das espécies hospedeiras. Número de indivíduos (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).

Hospedeiros	N	H	S	Hd	π
<i>D. aurita</i>	99	56	89	0,946	0,0468
<i>D. albiventris</i>	71	46	95	0,98	0,05112
<i>D. pernigra</i>	2	2	1	1.000	0,00204
<i>P. quica</i>	23	16	25	0,949	0,00815

Tabela 12: Diversidade genética do gene MT-CO1 dos espécimes de *Aspidodera raillieti* baseada nos grupos das localidades. Número de indivíduos (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).

Localidades	N	H	S	Hd	π
BOL	2	2	1	1,000	0,00204
CAR/ES	3	2	15	0,667	0,02045
CUR/PR	23	19	60	0,97233	0,01851
MAM/PB	6	5	38	0,93333	0,04363
PET/RJ	20	12	29	0,84737	0,00964
POA/RS	22	7	56	0,83983	0,04765
PTY/RJ	27	12	47	0,69801	0,01295
RIO/RJ	35	24	60	0,955	0,04252
SAI/SC	23	16	25	0,94862	0,00815
SGS/MG	22	15	17	0,96537	0,00839
SRT/PB	12	12	49	1,000	0,0414

Na rede de haplótipos, quatro haplogrupos foram observados, correspondentes aos clados recuperados nas filogenias, separados por uma distância genética de 19 a 23 passos mutacionais (Figuras 20, 21 e 22). Os haplótipos das localidades RIO/RJ e PTY/RJ dividiram-se nos haplogrupos correspondentes aos clados III e IV. Os haplótipos das localidades SRT/PB e MAM/PB se agruparam nos haplogrupos correspondentes aos clados II e III. Enquanto que os haplótipos de POA/RS agruparam-se em três grupos, que foram aqueles correspondentes aos clados I, II e IV. Somente um haplótipo de CUR/PR agrupou-se com o haplogrupo correspondente a clado III, enquanto todos os outros se agruparam com o clado IV. Todos os haplótipos de CAR/ES (clado III), PET/RJ (clado IV), SGS/MG (clado IV) e SAI/SC (clado IV) agruparam-se em um único haplogrupo.

Alguns haplótipos foram compartilhados entre localidades. Os haplótipos H 9, H_14, H_22 e H_97 foram compartilhados entre as localidades RIO/RJ e PTY/RJ. O haplótipo H_17 foi compartilhado entre as localidades PTY/RJ e CUR/PR. O haplótipo H_46 foi compartilhado entre as localidades SRT/PB e MAM/PB. H_71 foi compartilhado entre as localidades POA/RS e SAI/SC. H_82 foi compartilhado entre as localidades CUR/PR e SAI/SC. H_109 foi compartilhado entre as localidades PET/ RJ e SGS/MG (Figuras 20).

- Cariacica, ES
- Rio de Janeiro, RJ
- Santa Rita, PB
- Paraty, RJ
- São Gonçalo de Sapucaí, MG
- Mamanguape, PB
- Bolívia
- Porto Alegre, RS
- Petrópolis, RJ
- Curitiba, PR
- Santo Amaro da Imperatriz, SC

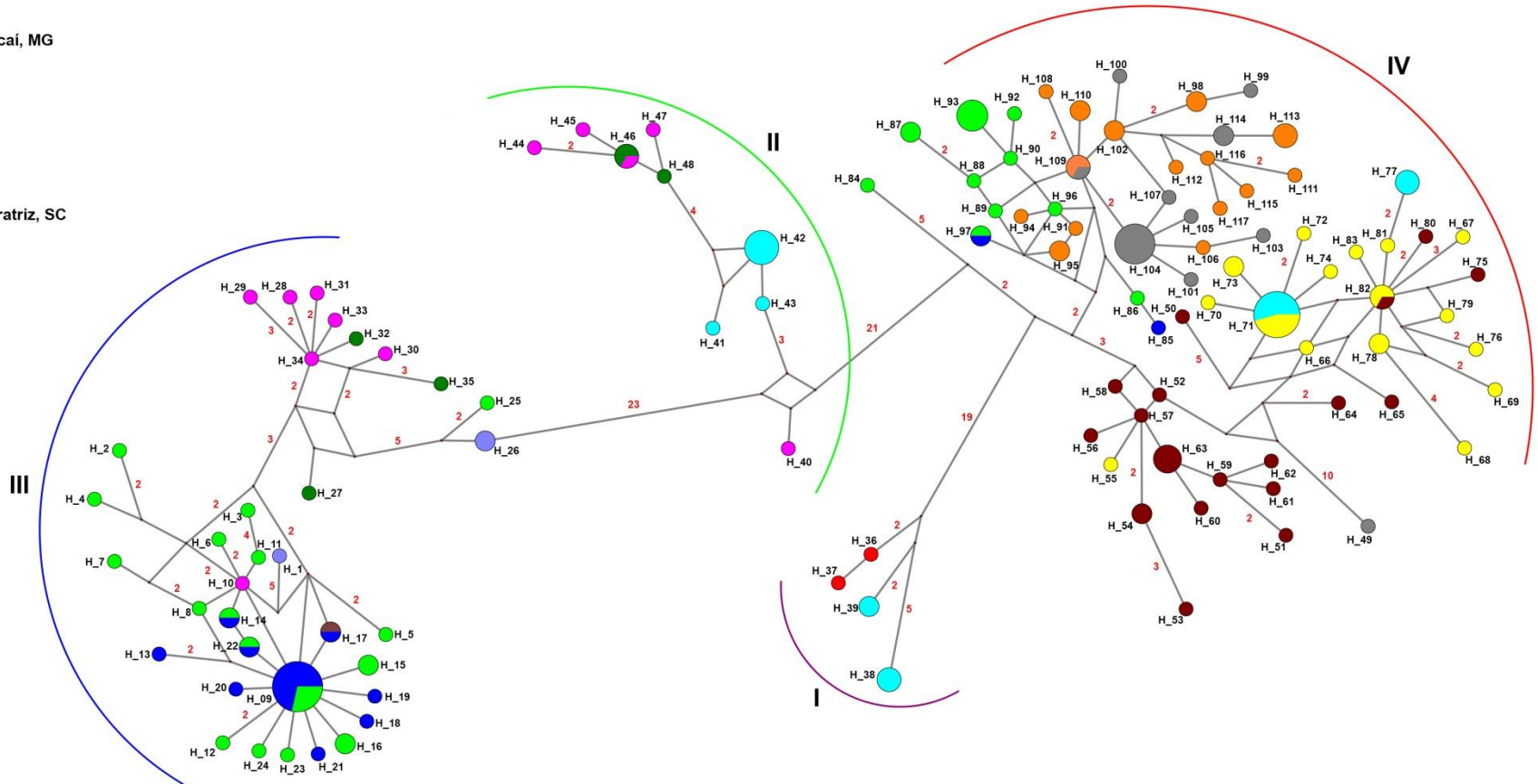


Figura 20: Rede de Haplótipos de junção-mediana (*median joining*) baseada em sequência parcial do gene MT-CO1 (489 pb) de *Aspidodera raillieti*, parasitos do ceco e intestino grosso de marsupiais Didelphini, provenientes deste estudo (Tabela 1) e referências (Tabelas 3). O tamanho dos círculos representa a frequência dos haplótipos. O número sobre a linha, conectando os haplótipos, representa a quantidade de mutações, exceto quando apenas uma mutação, que não é representado. As cores dos círculos representam as localidades de ocorrência de cada haplótipo.

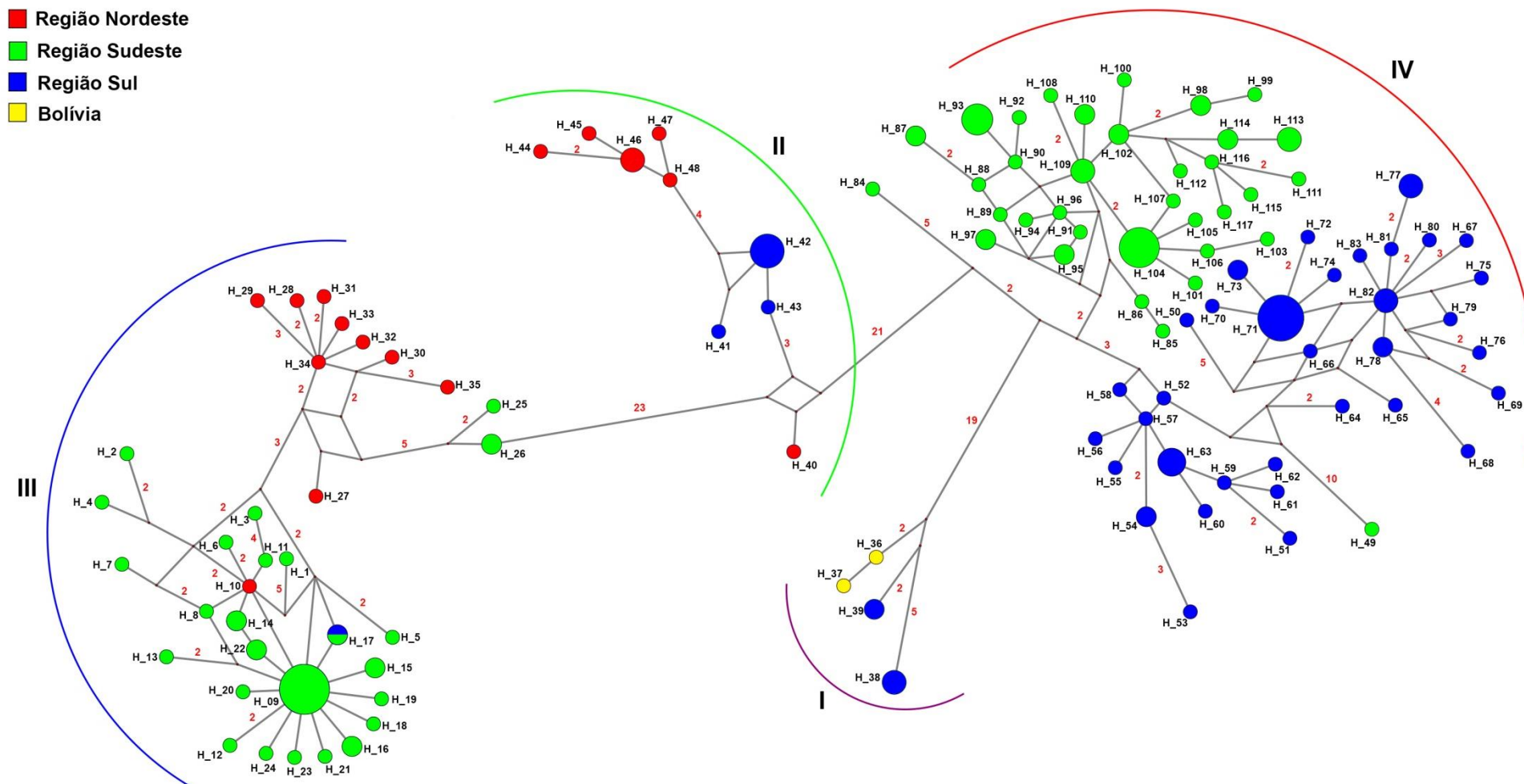


Figura 21: Rede de Haplótipos de junção-mediana (*median joining*) baseada em sequência parcial do gene MT-CO1 (489 pb) de *Aspidodera raillieti*, parasitos do ceco e intestino grosso de marsupiais Didelphini, provenientes deste estudo (Tabela 1) e referências (Tabelas 3). O tamanho dos círculos representa a frequência dos haplótipos. O número sobre a linha, conectando os haplótipos, representa a quantidade de mutações, exceto quando apenas uma mutação, que não é representado. As cores dos círculos representam as regiões de ocorrência de cada haplótipo no Brasil e os haplótipos da Bolívia.

Entre as espécies hospedeiras também foi observado compartilhamento de haplótipos. O haplótipo H_109 foi compartilhado entre as espécies *D. aurita* e *D. albiventris*; H_82 foi compartilhado entre as espécies *D. aurita* e *P. quica* (Figura 22).

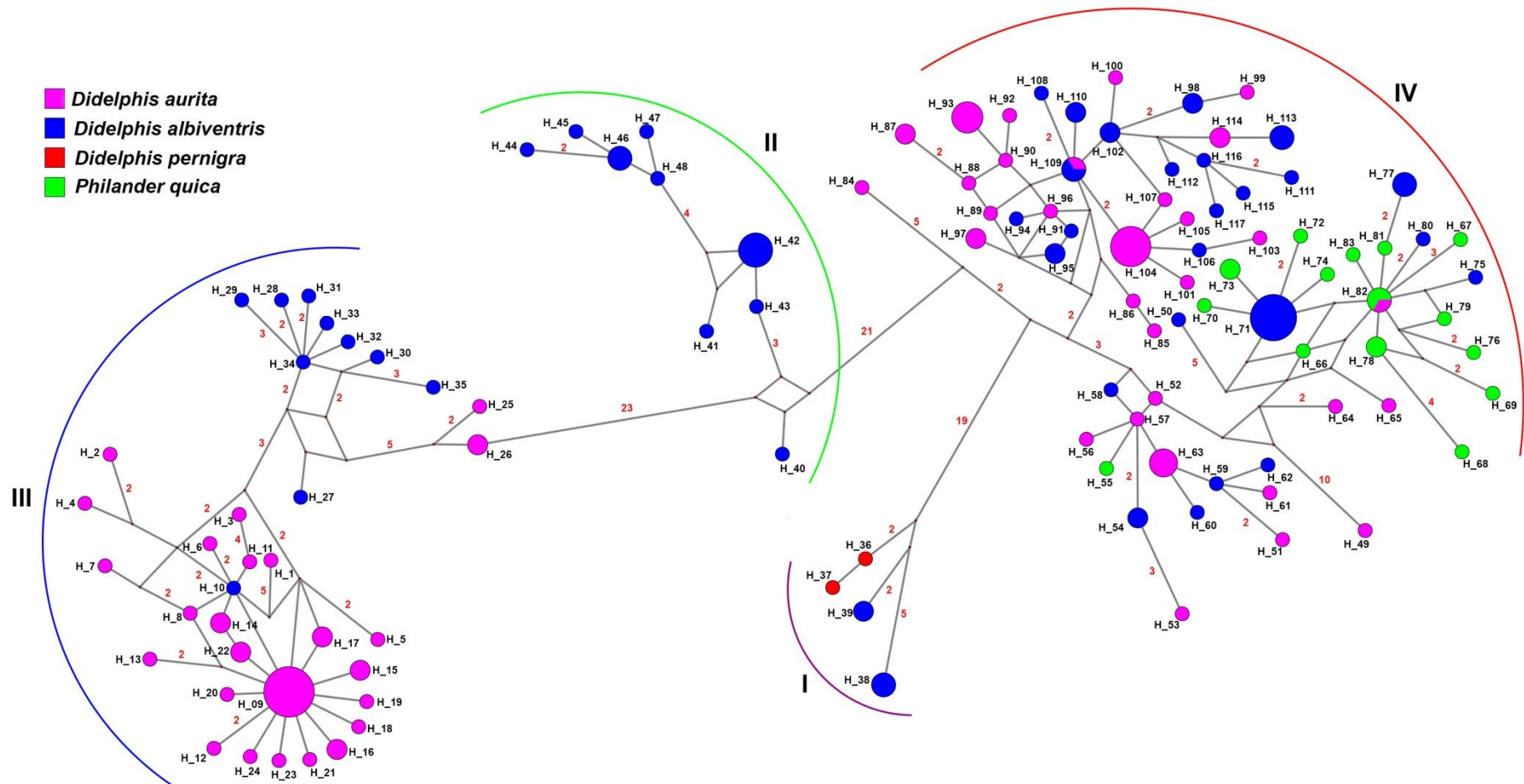


Figura 22: Rede de Haplótipos de junção-mediana (*median joining*) baseada em sequência parcial do gene MT-CO1 (489 pb) de *Aspidodera raillieti*, parasitos do ceco e intestino grosso de marsupiais Didelphini, provenientes deste estudo (Tabela 1) e referências (Tabelas 3). O tamanho dos círculos representa a frequência dos haplótipos. O número sobre a linha, conectando os haplótipos, representa a quantidade de mutações, exceto quando apenas uma mutação, que não é representado. As cores dos círculos representam os hospedeiros de ocorrência de cada haplótipo.

O modelo de substituição de nucleotídeos selecionado pelo AICc no PAUP foi 2-parâmetros de Kimura (K2P), com distribuição gama estimada de 0,169, e foi utilizado para cálculo da análise de variância molecular (AMOVA) e teste de Mantel.

As estimativas de variabilidade genética através da AMOVA estão representadas nas Tabelas 13, 14 e 15. A avaliação entre clados revelou maior variação interpopulacional, ou seja, entre clados, representando 84,88% da variação total, enquanto a variação intrapopulacional, dentro do mesmo clado, representou 15,12% (Tabela 13). Já a variação genética para o grupo das espécies hospedeiras, revelou maior variação dentro das espécies hospedeiras (intrapopulacional) (77,41%) do que entre as espécies hospedeiras (interpopulacional) (22,59%) (Tabela 14). Para o grupo das localidades, verificou-se maior variação entre as localidades (interpopulacional) (58,69%) do que dentro das localidades (intrapopulacional) (41,31%) (Tabela 15).

Tabela 13: Estimativa da variabilidade genética através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para sequências de *Aspidodera raillieti* baseado nos clados recuperados nas reconstruções filogenéticas.

Fonte de Variação	G.L.	Porcentagem da Variação
Entre clados	3	84,88
Dentro dos clados	191	15,12
Total	194	

G.L: graus de liberdade

Tabela 14: Estimativa da variabilidade genética através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de *Aspidodera raillieti* dentro e entre as espécies hospedeiras.

Fonte da Variação	G.L.	Porcentagem da Variação
Entre espécies hospedeiras	3	22,59
Dentro das espécies hospedeiras	191	77,41
Total	194	

G.L: graus de liberdade

Tabela 15: Estimativa da variabilidade genética através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de *Aspidodera raillieti* dentro e entre as localidades estudadas.

Fonte da Variação	G.L.	Porcentagem da Variação
Entre Localidades	10	58,69
Dentro das Localidades	184	41,31
Total	194	

G.L.: graus de liberdade

Os valores do índice de fixação (Fst), calculados entre pares de populações, e seus respectivos valores de significância, para cada um dos grupos, estão representados nas Tabelas 16, 17 e 18. Entre os clados, foram observados valores de Fst iguais ou maiores que 0,74499 todos significativos ($p < 0,05$) (Tabela 16). Para os grupos das espécies hospedeiras, todos os valores de Fst foram significativos, variando de 0,13682 a 0,87573 (Tabela 17). A maior diferenciação encontrada (Fst: 0,87573) foi entre os grupos de *Didelphis pernigra* e *Philander quica*. Para os grupos das localidades, os valores de Fst significativos variaram entre 0,14225 a 0,92297 (Tabela 18).

Tabela 16: Estimativa do Fst para sequências de *Aspidodera raillieti* baseado nos clados recuperados nas filogenias. Valores em vermelho e negrito representam os valores significativos ($p < 0,01$).

	Clado I	Clado II	Clado III	Clado IV
Clado I				
Clado II	0,91198			
Clado III	0,92394	0,89463		
Clado IV	0,74499	0,80510	0,84959	

Tabela 17: Estimativa do Fst para sequências de *Aspidodera raillieti* baseado nos grupos das espécies hospedeiras. Valores em vermelho e negrito representam os valores significativos ($p < 0,01$).

	<i>D. aurita</i>	<i>D. albiventris</i>	<i>D. pernigra</i>	<i>P. quica</i>
<i>D. aurita</i>				
<i>D. albiventris</i>	0,13682			
<i>D. pernigra</i>	0,44364	0,31491		
<i>P. quica</i>	0,38410	0,23789	0,87573	

Tabela 18: Estimativa do Fst para populações de *Aspidodera raillieti* entre localidades (municípios). Valores em vermelho e negrito representam os valores significativos ($p < 0,01$).

	CARI/ES	RIO/RJ	PTY/RJ	PET/RJ	SRT/PB	MA/PB	CUR/PR	BOL	POA/RS	SGS/MG	STAM/SC
CAR/ES											
RIO/RJ	0,11539										
PTY/RJ	0,33843	0,20014									
PET/RJ	0,90672	0,53040	0,88073								
SRT/PB	0,09161	0,18811	0,38203	0,76013							
MAM/PB	0,17105	0,21796	0,51359	0,80481	-0,10212						
CUR/PR	0,80595	0,48975	0,82191	0,53851	0,68015	0,70889					
BOL	0,88247	0,52641	0,86986	0,88578	0,58687	0,58356	0,75782				
POA/RS	0,48733	0,34890	0,63648	0,46445	0,33813	0,27894	0,32997	0,26854			
SGS/MG	0,91735	0,51942	0,88251	0,14225	0,76441	0,81226	0,55357	0,90390	0,45825		
SAI/SC	0,92297	0,54909	0,87529	0,75043	0,75886	0,81013	0,31908	0,90757	0,34441	0,76864	

Os testes de neutralidade, D de Tajima e Fs de Fu, calculados para cada um dos grupos definidos estão representados nas Tabelas 19, 20 e 21. Para os clados, valores de D (-1,77279) foram significativos apenas para o clado III, enquanto valores de Fs foram significativos tanto para o clado III (-22,89420) quanto para o clado IV (-24,39190) (Tabela 19).

Para os grupos formados pelas espécies hospedeiras, valores de D e Fs foram significativos somente para o grupo de *A. raillieti* parasitos de *P. quica* (-1,54535 e -8,33327, respectivamente) (Tabela 20).

Quando analisado para as localidades, valores de D foram significativos somente para as localidades PTY/RJ (-1,81918), PET/RJ (-1,65472), CUR/PR (-1,74623) e SAI/SC (-1,54535). Já os valores de Fs foram significativos para as localidades CUR/PR (-2,71024), SGS/MG (-6,93164) e SAI/SC (-8,33327) (Tabela 21).

Tabela 19: Testes D de Tajima e Fs de Fu, e seus respectivos valores de significância, para sequências do gene MT-CO1 de *Aspidodera raillieti* baseado nos clados recuperados nas filogenias. Valores em negrito representam os valores significativos ($p < 0,05$).

	D de Tajima	p	Fs de Fu	p
Clado I	1,24561	0,89000	1,95326	0,81500
Clado II	-0,24274	0,42300	-1,15483	0,27800
Clado III	-1,77279	0,02200	-22,89420	0,00000
Clado IV	-0,69760	0,27500	-24,39190	0,00000

Tabela 20: Testes D de Tajima e Fs de Fu, e seus respectivos valores de significância, para sequências do gene MT-CO1 de *Aspidodera raillieti* baseado nos grupos de espécies hospedeiras. Valores em negrito representam os valores significativos ($p < 0,05$).

Hospedeiros	D de Tajima	p	Fs de Fu	p
<i>D. aurita</i>	1,07790	0,90400	-9,21311	0,05900
<i>D. albiventris</i>	0,92540	0,88100	-6,46009	0,07600
<i>D. pernigra</i>	0,00000	1,00000	0,00000	0,22000
<i>P. quica</i>	-1,54535	0,04600	-8,33327	0,00100

Tabela 21: Testes D de Tajima e Fs de Fu, e seus respectivos valores de significância, para sequências do gene MT-CO1 de *Aspidodera raillieti* baseado nos grupos de localidades. Valores em negrito representam os valores significativos ($p < 0,05$).

Abreviação	D de Tajima	p	Fs de Fu	p
CAR/ES	0,00000	1,00000	4,17439	0,92300
RIO/RJ	1,56628	0,95400	-1,63427	0,30700
PTY/RJ	-1,81918	0,01300	-0,41781	0,46500
PET/RJ	-1,65472	0,02900	-2,92769	0,08100
SRT/PB	1,13538	0,91000	-2,71024	0,05800
MAM/PB	1,79625	0,98200	2,08698	0,75600
CUR/PR	-1,74623	0,02700	-6,94241	0,00500
BOL	0,00000	1,00000	0,00000	0,26500
POA/RS	2,04795	0,99200	1,219029	1,00000
SGS/MG	-0,43876	0,36800	-6,93164	0,00000
SAI/SC	-1,54535	0,03700	-8,33327	0,00000

O teste de Mantel indicou correlação significativa e positiva entre distância genética e geográfica (Coeficiente de correlação, $r=0,3046$; $p=0,001$) (Tabela 22; Figura 23).

Tabela 22: Matriz de distância geográfica em quilômetros.

	MAM/PB	SRT/PB	CAR/ES	RIO/RJ	PET/RJ	PTY/RJ	SGS/MG	CUR/PR	SAI/SC	POA/RS	BOL
MAM/PB											
SRT/PB	37										
CAR/ES	1328	1319									
RIO/RJ	1667	1662	393								
PET/RJ	1618	1613	343	50							
PTY/RJ	1751	1749	524	145	186						
SGS/MG	1733	1734	584	253	279	131					
CUR/PR	2188	2191	1056	678	721	535	483				
SAI/SC	2302	2304	1102	710	759	581	570	185			
POA/RS	2576	2579	1402	1010	1059	879	855	389	300		
BOL	3652	3674	3016	2710	2740	2567	2461	2093	2179	1973	

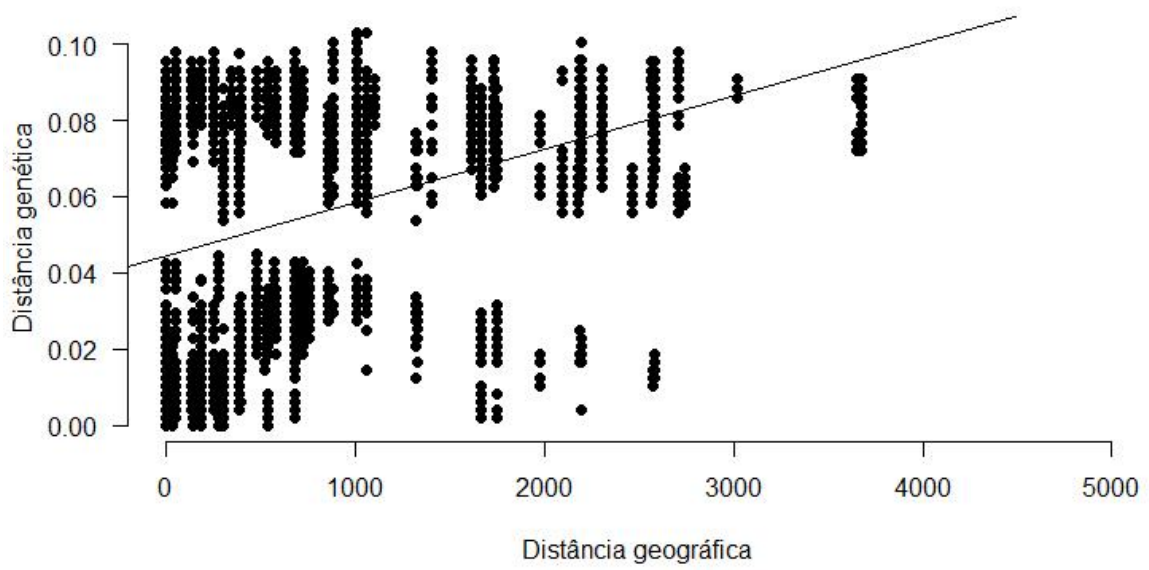


Figura 23: Resultado do teste de Mantel mostrando correlação entre distâncias genética e geográfica ($r=0,3046$; $p=0,001$).

4.5 Análises morfológicas

As análises por MEV foram realizadas de acordo com os clados recuperados nas análises filogenéticas, sendo estudada extremidade anterior de espécimes sequenciados referentes a cada um dos clados. Portanto, foi analisada por MEV a extremidade anterior de 2 a 4 espécimes de fêmeas *A. raillieti*, representantes de cada um dos quatro clados recuperados, totalizando 14 espécimes do parasito analisados.

Todos os caracteres observados na extremidade anterior dos espécimes confirmam a classificação como *A. raillieti*. Todos os espécimes apresentam região cefálica com dilatação cuticular, lábios dorsal e látero-ventrais com projeções delgadas, projeções arredondadas no lábio dorsal, cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas dispostas paralelamente a um anfídeo, lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme, projeção interlabial e estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (Figuras 24 a 27).

Todos os helmintos estudados apresentaram o mesmo padrão morfológico referente à disposição das papilas e anfídeos. Foram observadas diferenças discretas nas projeções interlabiais, que apresentaram morfologia variando de aspecto delgado a triangular, e na delimitação da estrutura em forma de poro no ápice das projeções interlabiais dentro dos clados e entre espécimes parasitos da mesma espécie hospedeira.

Para o clado I (Figura 24), foi analisada a extremidade anterior dos espécimes de *A. raillieti*: H38 (LBCE 20601) e H39 (LBCE 20588), parasitos de *D. albiventris* de POA/RS. Nesses espécimes as projeções interlabiais são delgadas, o poro no ápice do interlábio é discreto e a projeção cuticular do lábio látero-ventral esquerdo é digitiforme. Não foi observada diferença clara nestas estruturas entre os dois espécimes estudados dentro do mesmo Clado.

Para o clado II (Figura 25), foi analisada a extremidade anterior dos espécimes de *A. raillieti*: H42 (LBCE 20602), parasito de *D. albiventris* de POA/RS; H40 (LBCE 20732), H44 (LBCE 20752), H45 (LBCE 20756), parasitos de *D. albiventris* de SRT/PB. O H42 e H40 (Figuras 25A e 25B) das duas localidades apresentam em comum, projeções interlabiais delgadas, enquanto os H44 e H45 (Figuras 25C e 25D) apresentam projeções interlabiais em forma triangular. Os poros no ápice dos interlábios são discretos.

Para o clado III (Figura 26), foi analisada a extremidade anterior dos espécimes de *A. raillieti*: H29 (LBCE 20752), parasito de *D. albiventris* de SRT/PB; H14 (LBCE 21230), parasito de *D. aurita* de PTY/RJ; H34 (LBCE 20726), parasito de *D. albiventris* de SRT/PB; H9 (LBCE 20370), parasito de *D. aurita* do RIO/RJ. O H29 (Figura 26A) apresenta projeções interlabiais delgadas, e poro no ápice do interlábio bem evidente; o H14 (Figura 25B) possui projeções interlabiais em forma triangular e o poro no ápice do interlábio bem definido e alargado; O H34 (Figura 25C) apresenta projeções interlabiais delgadas e o poro no ápice de interlábio apresenta-se pouco definido; o H9 (Figura 26D) possui projeções interlabiais delgadas com discreta dilatação na região anterior, e o poro no ápice do interlábio de difícil visualização.

Para o clado IV (Figura 27), foi analisada a extremidade anterior dos espécimes de *A. raillieti*: H54 (LBCE 21134), parasito de *D. albiventris* de CUR/PR; H71 (LBCE 19304), parasito de *P. quica* de SAI/SC; H104 (LBCE 19467), parasito de *D. aurita* de PET/RJ; H97 (LBCE 20370), parasito de *D. aurita* do RIO/RJ. No clado IV, o H54, H71 e H104 (Figuras 27A a 27C) apresentam projeções interlabiais delgadas e o poro no ápice do interlábio é bem definido e alargado. O H97 possui projeções interlabiais delgadas com discreta dilatação na região anterior e o poro no ápice do interlábio de difícil visualização (Figura 27D).

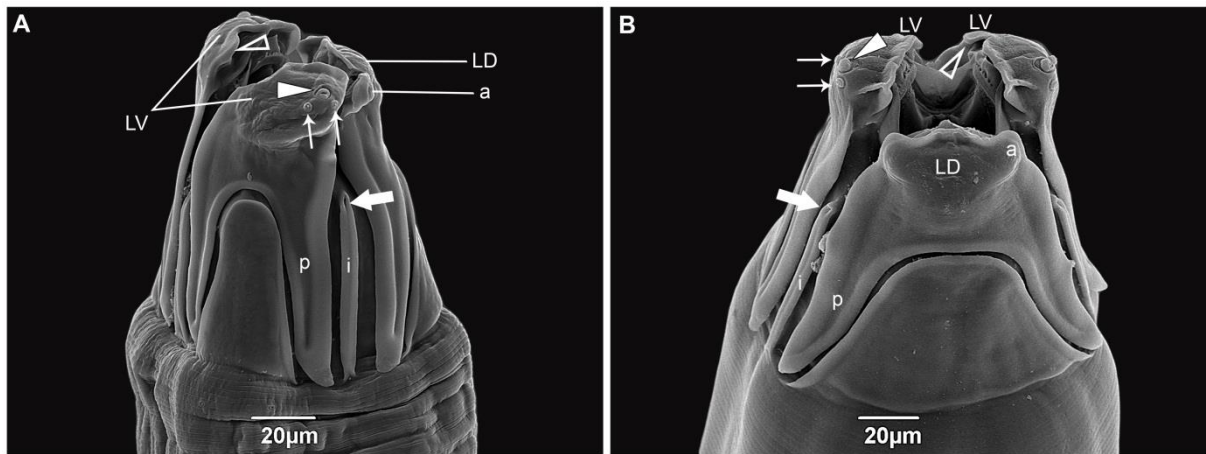


Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura da região anterior de adultos de *Aspidodera raillieti* pertencentes ao **clado I**, mostrando a extremidade cefálica com dilatação cuticular; lábios dorsal (LD) e látero-ventrais (LV) com projeções delgadas (p); projeções arredondadas (a) no lábio dorsal (LD); cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas (seta fina) e um anfídeo (cabeça de seta cheia); lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme (cabeça de seta vazada); projeção interlabial (i); estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (seta larga cheia). A) Extremidade cefálica do haplótipo 38 (LBCE 20601), espécime parasito de *D. albiventris* de POA/RS. B) Extremidade cefálica do haplótipo 39 (LBCE 20588), espécime parasito de *D. albiventris* de POA/RS.

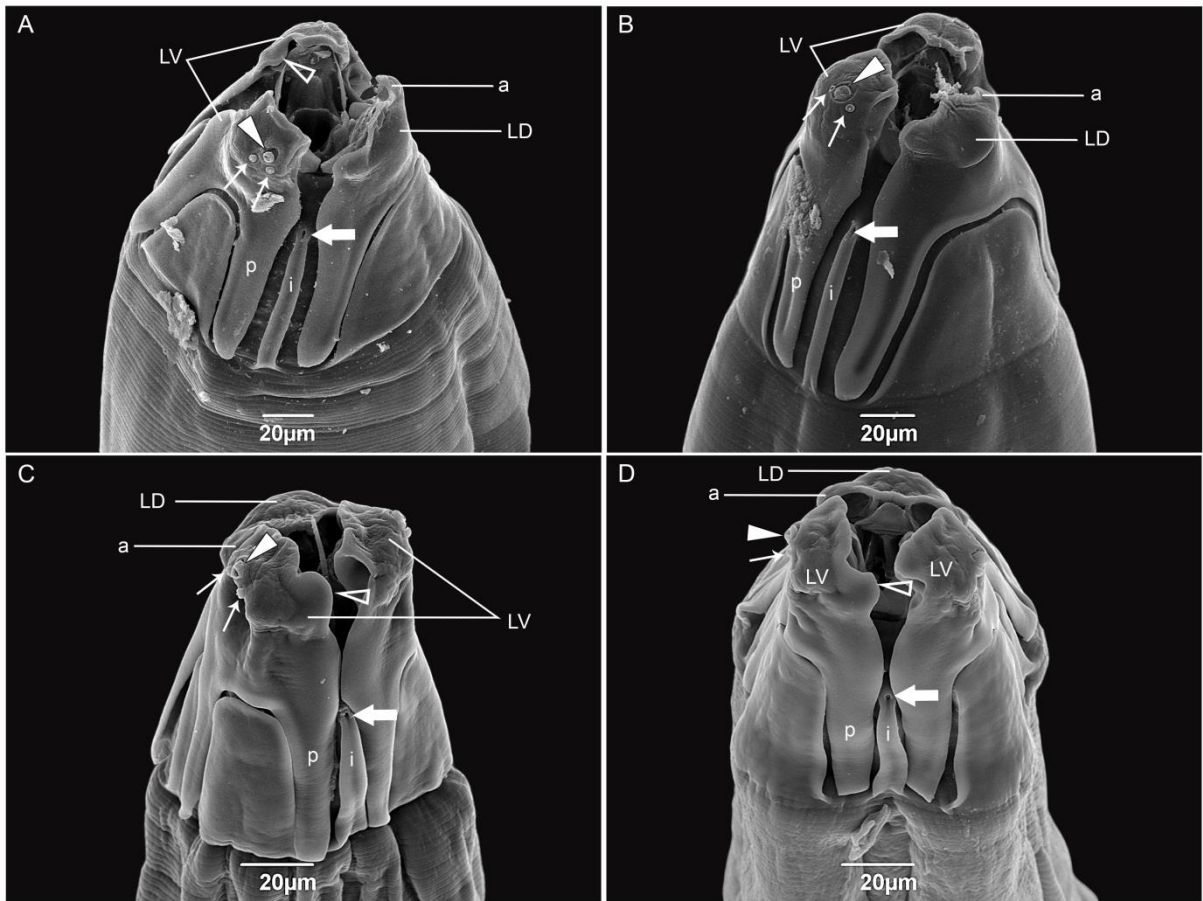


Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura da região anterior de adultos de *Aspidodera raillieti* pertencentes ao **clado II**, mostrando a extremidade cefálica com dilatação cuticular; lábios dorsal (LD) e látero-ventrais (LV) com projeções delgadas (p); projeções arredondadas (a) no lábio dorsal (LD); cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas (seta fina) e um anfídeo (cabeça de seta cheia); lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme (cabeça de seta vazada – visto somente nas imagens A, C e D); projeção interlabial (i); estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (seta larga cheia). A) Extremidade cefálica do haplótipo 42 (LBCE 20602), espécime parasito de *D. albiventris* de POA/RS. B) Extremidade cefálica do haplótipo 40 (LBCE 20732), espécime parasito de *D. albiventris* de SR/PB. C) Extremidade cefálica do haplótipo 44 (LBCE 20752), espécime parasito de *D. albiventris* de SRT/PB. D) Extremidade cefálica do haplótipo 45 (LBCE 20756), espécime parasito de *D. albiventris* de SRT/PB.

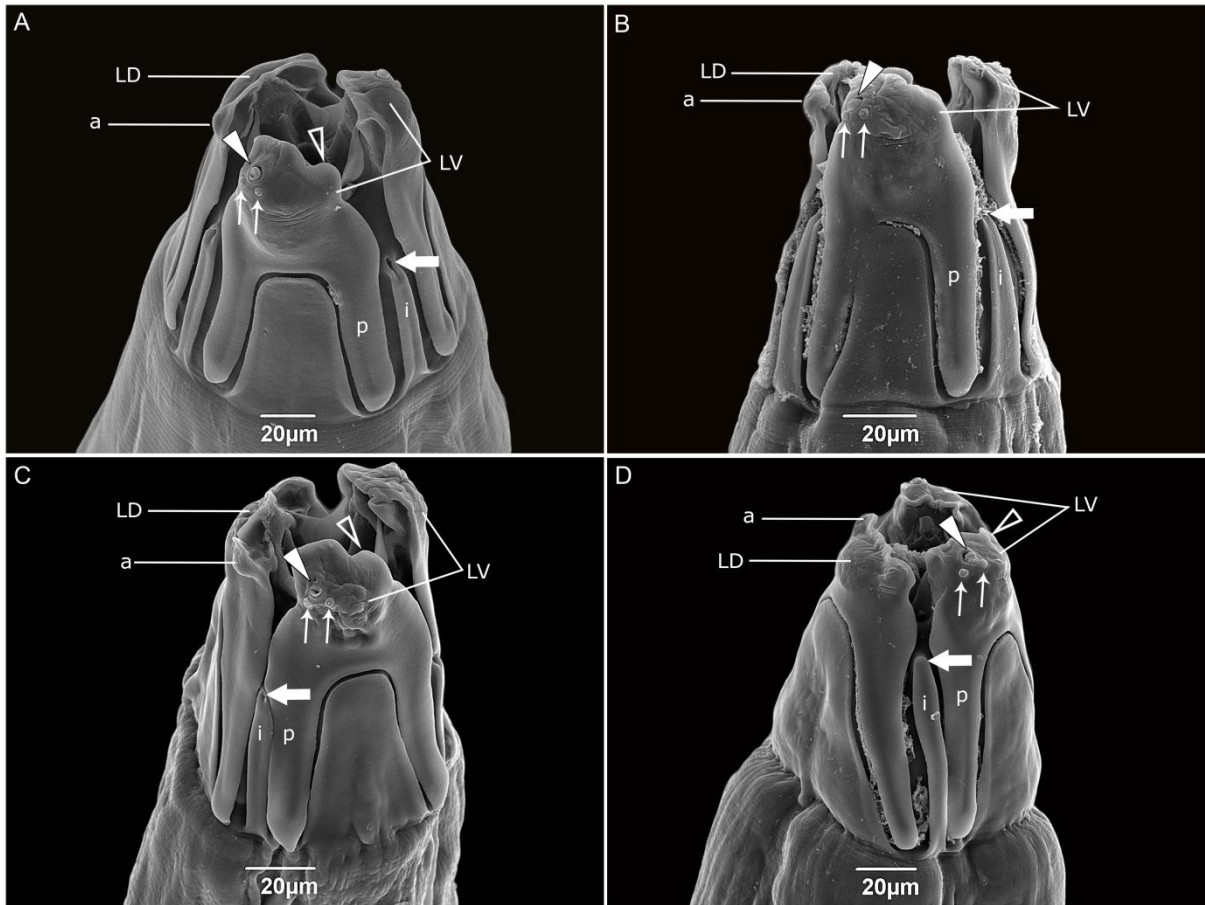


Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura da região anterior de adultos de *Aspidodera raillieti* pertencentes ao **clado III**, mostrando a extremidade cefálica com dilatação cuticular; lábios dorsal (LD) e látero-ventrais (LV) com projeções delgadas (p); projeções arredondadas (a) no lábio dorsal (LD); cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas (seta fina) e um anfídeo (cabeça de seta cheia); lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme (cabeça de seta vazada – visto somente nas imagens A, C e D); projeção interlabial (i); estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (seta larga cheia). A) Extremidade cefálica do haplótipo 29 (LBCE 20752), espécime parasito de *D. albiventris* de SRT/PB. B) Extremidade cefálica do haplótipo 14 (LBCE 21230), espécime parasito de *D. aurita* de PTY/RJ. C) Extremidade cefálica do haplótipo 34 (LBCE 20726), espécime parasito de *D. albiventris* de SRT/PB. D) Extremidade cefálica do haplótipo 9 (LBCE 20370), espécime parasito de *D. aurita* do RIO/RJ.

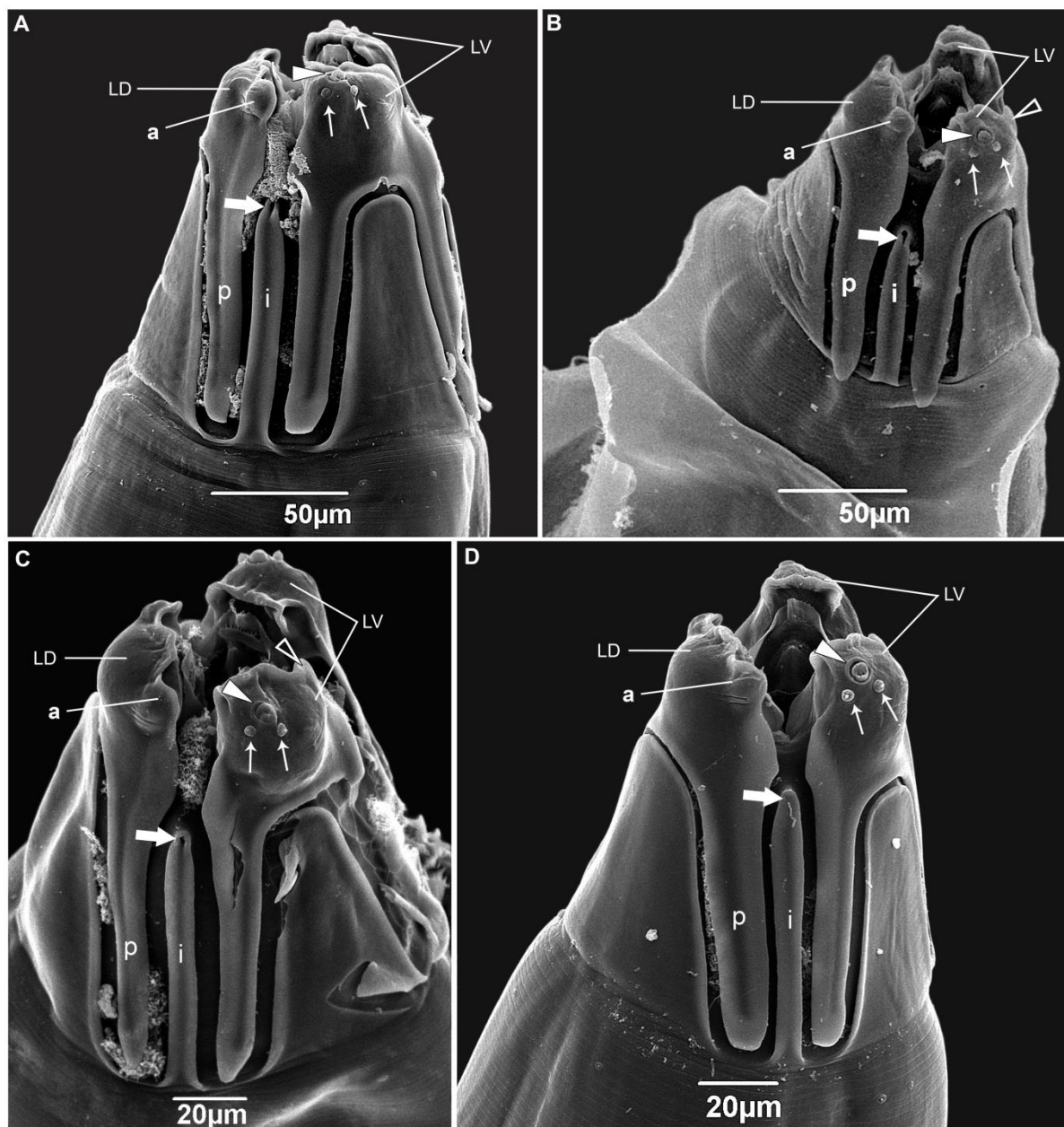


Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura da região anterior de adultos de *Aspidodera raillieti* pertencentes ao **clado IV**, mostrando a extremidade cefálica com dilatação cuticular; lábios dorsal (LD) e látero-ventrais (LV) com projeções delgadas (p); projeções arredondadas (a) no lábio dorsal (LD); cada um dos dois lábios látero-ventrais com um par de papilas (seta fina) e um anfídeo (cabeça de seta cheia); lábio látero-ventral esquerdo com projeção digitiforme (cabeça de seta vazada – visto somente nas imagens B e C); projeção interlabial (i); estrutura em forma de poro no ápice do interlábio (seta larga cheia). A) Extremidade cefálica do haplótipo 54 (LBCE 21134), espécime parasito de *D. albiventris* de CUR/PR. B) Extremidade cefálica do haplótipo 71 (LBCE 19304), espécime parasito de *P. quica* de SAI/SC. C) Extremidade cefálica do haplótipo 104 (LBCE 19467), espécime parasito de *D. aurita* de PET/RJ. D) Extremidade cefálica do haplótipo 97 (LBCE 20370), espécime parasito de *D. aurita* do RIO/RJ.

4.6 Análises morfométricas

A análise morfométrica indicou maior variabilidade dentro de cada grupo estudado quando considerados espécimes machos de *A. raillieti* em relação aos espécimes fêmeas (menores valores de Wilks lambda para machos em relação às fêmeas; (Tabela 23)). A porcentagem de explicação na variação dos dados morfométricos foi superior a 88% em todas as análises, considerando-se os dois primeiros eixos da análise discriminante (Figuras 28 a 31). As variáveis morfométricas que melhor discriminaram os grupos estudados e que foram comuns a todos, ou a maioria destes grupos, foram largura e comprimento da coifa cefálica (Figuras 28 a 31).

Considerando o grupo formado pelas espécies hospedeiras (*D. albiventris*, *D. aurita* e *P. quica*), não foi observada acentuada separação dessas populações em relação à morfometria de *A. raillieti*, seja analisando-se os espécimes fêmeas ou machos separadamente (Tabela 23; Figuras 28A e 28B).

Tabela 23: Valores de lambda de Wilks e seus respectivos graus de liberdade (GL) e valores de *p* para espécimes de *A. raillieti* machos e fêmeas agrupados por espécie hospedeira; localidades; Regiões.

.Grupos	Wilks lambda	GL	<i>p</i>
<i>Aspidodera raillieti</i> machos			
Hospedeiros	0,194	32	< 0,01
Localidades	0,006*	128	< 0,01
Nordeste	0,171	16	0,17
Sudeste	0,010*	48	< 0,01
Sul	0,03*	32	< 0,01
<i>Aspidodera raillieti</i> fêmeas			
Hospedeiros	0,395	24	< 0,01
Localidades	0,038*	84	< 0,01
Nordeste	0,357	12	0,03
Sudeste	0,051*	36	< 0,01
Sul	0,071*	24	< 0,01

* Grupos que apresentaram maior variabilidade morfométrica.

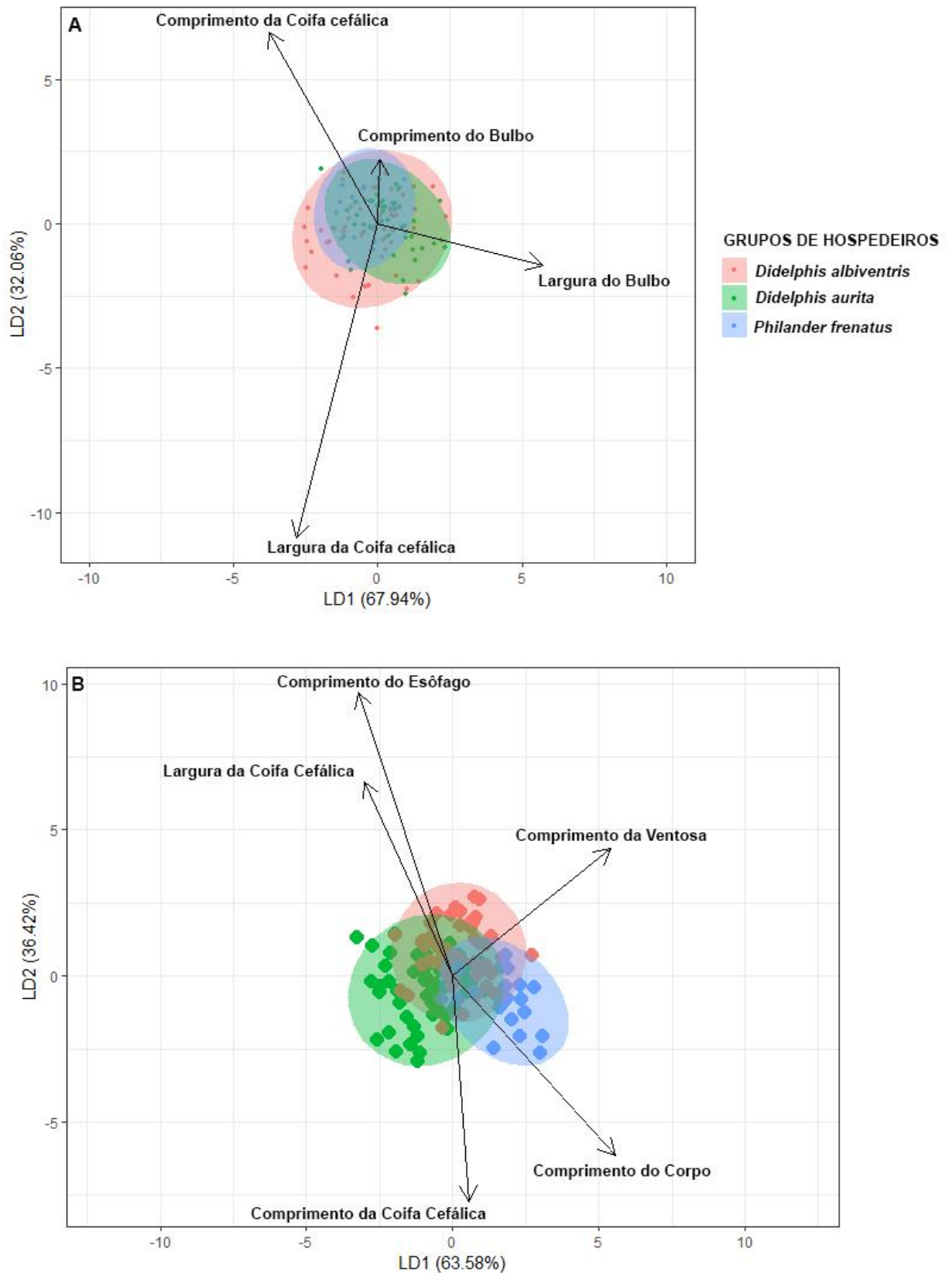


Figura 28: Análise discriminante baseada nas espécies hospedeiras, considerando a morfometria de espécimes fêmeas (A) e machos (B) de *Aspidodera raillieti*, recuperados dos marsupiais coletados em localidades na Mata Atlântica brasileira. Os vetores representam as variáveis que mais explicaram a variação entre grupos.

Na análise conjunta das localidades, considerando os espécimes machos e fêmeas de *A. raillieti*, foi observada uma sobreposição das populações entre as áreas (Tabela 23; Figuras 29A e 29B). Apesar disto, para os espécimes machos, foi possível observar a ocorrência de dois grupos parcialmente sobrepostos: um formado por MAM/PB e SRT/PB, RIO/RJ e PTY/RJ, CAR/ES e POA/RS, e outro formado por PET/RJ, CUR/PR, SAI/SC e SGS/MG (Tabela 23; Figura 29B).

Adicionalmente, quando analisadas cada região separadamente (Nordeste, Sudeste e Sul), foi possível observar uma maior variação morfométrica para os espécimes machos recuperados de localidades pertencentes à região sudeste, com maior sobreposição entre as localidades RIO/RJ e PTY/RJ, e CAR/ES e entre as localidades PET/RJ e SGS/MG (Tabela 23; Figura 30B). Para a região Sul, foi observada uma maior sobreposição entre as localidades de CUR/PR e SAI/SC, porém maior diferenciação destas localidades com POA/RS, principalmente quando analisados os espécimes machos de *A. raillieti* (Tabela 23; Figuras 31A e 31B). Para a região Nordeste foi observada uma elevada sobreposição de suas localidades, seja considerando-se espécimes fêmeas ou machos de *A. raillieti* (Tabela 23). Além disso, para os espécimes fêmeas recuperados de hospedeiros desta região não foi observado um resultado estatisticamente significativo (Tabela 23), indicando que não houve diferença morfométrica deste parasito entre estas localidades. Deste modo, apenas para esta região, não serão apresentados os gráficos da análise discriminante.

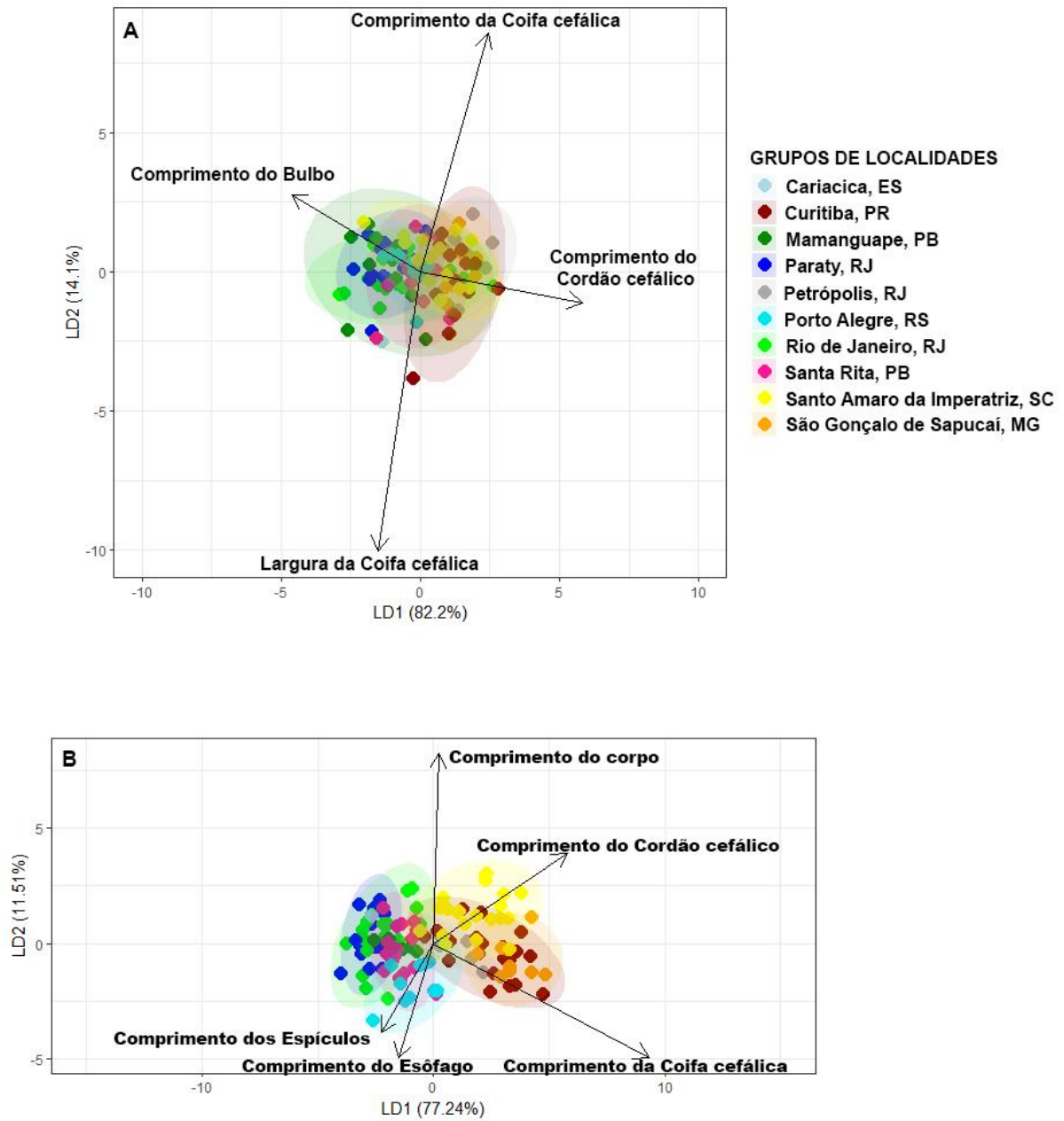


Figura 29: Análise discriminante baseada nas localidades, considerando a morfometria de espécimes fêmeas (A) e machos (B) de *Aspidodera raillieti*, recuperados dos marsupiais coletados em localidades na Mata Atlântica brasileira. Os vetores representam as variáveis que mais explicaram a variação entre grupos.

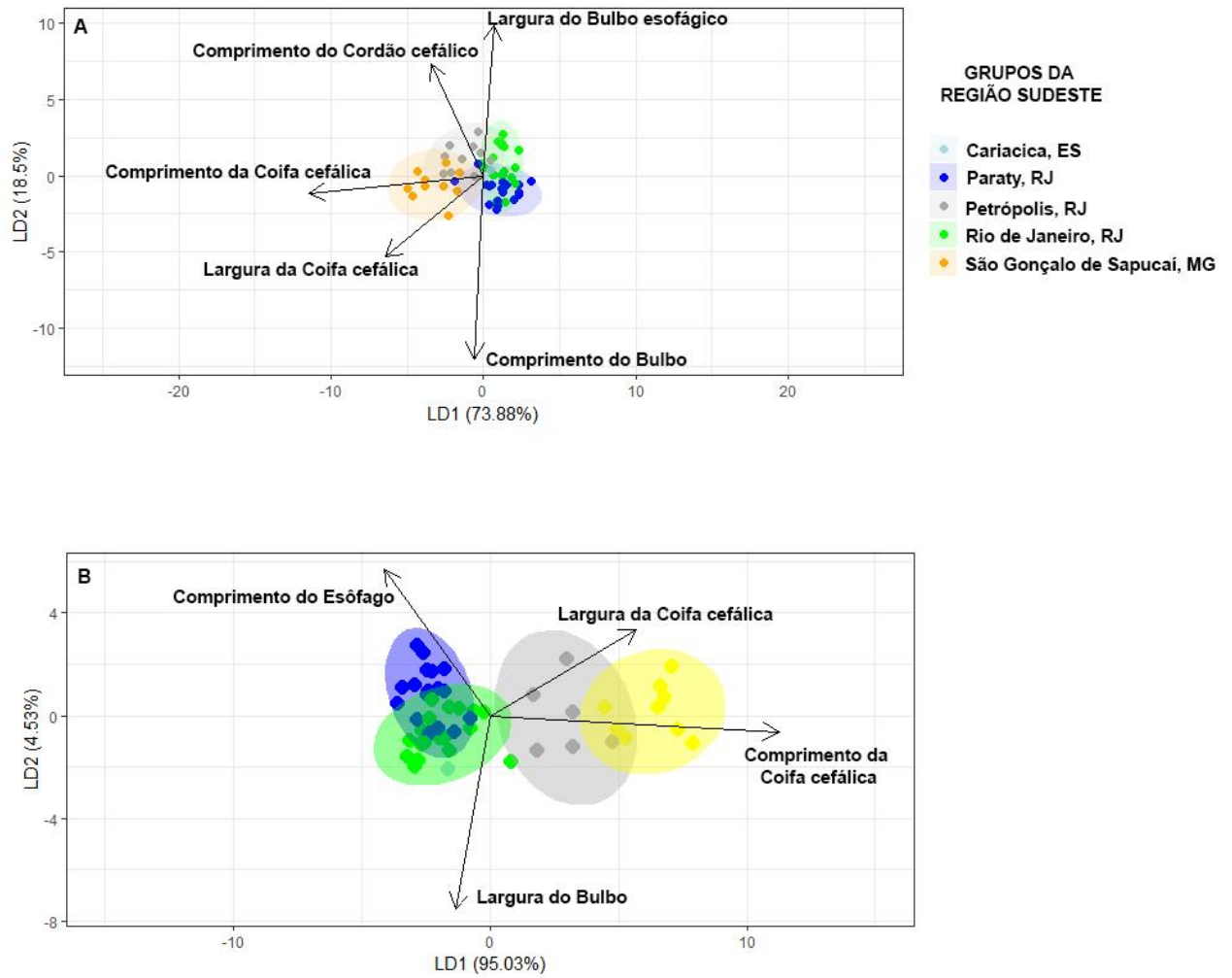


Figura 30: Análise discriminante baseada na região Sudeste, considerando a morfometria de espécimes fêmeas (A) e machos (B) de *Aspidodera raillieti*, recuperados dos marsupiais coletados em localidades na Mata Atlântica brasileira. Os vetores representam as variáveis que mais explicaram a variação entre grupos.

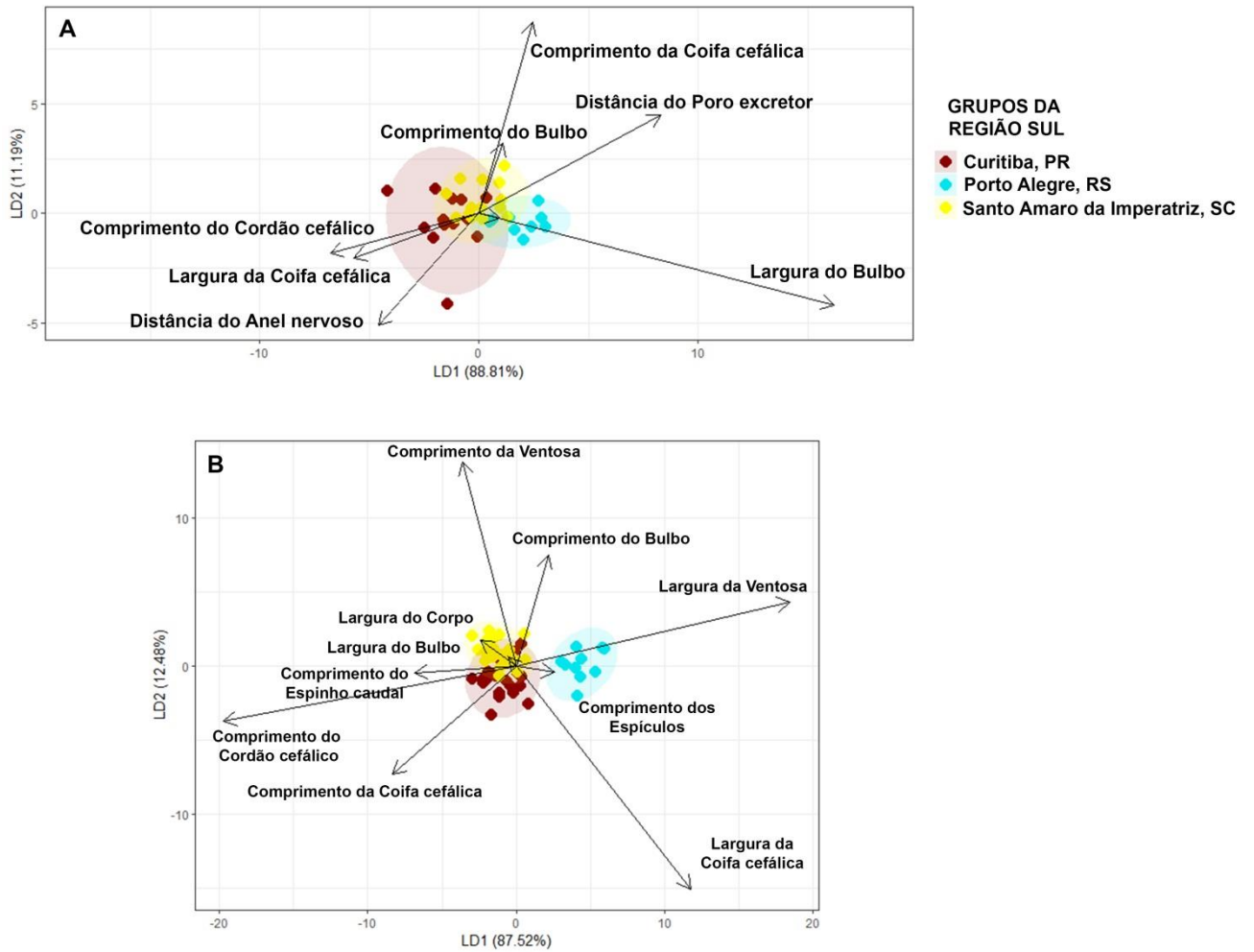


Figura 31: Análise discriminante baseada na região Sul, considerando a morfometria de espécimes fêmeas (A) e machos (B) de *Aspidodera raillieti*, recuperados dos marsupiais coletados em localidades na Mata Atlântica brasileira. Os vetores representam as variáveis que mais explicaram a variação entre grupos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Análises filogenéticas e filogeográficas

5.1.1 *Estrutura populacional de Aspidodera raillieti associada aos clados e as localidades*

A estrutura das populações pode ser influenciada por diferentes forças evolutivas. Dentre elas, o fluxo gênico é de fundamental importância, pois permite a troca de material genético entre as populações, homogeneizando a variação genética entre as mesmas (Freeland *et al.*, 2011). Estudos filogeográficos de helmintos parasitos têm mostrado que a troca gênica entre suas populações é fortemente influenciada pelo deslocamento dos hospedeiros vertebrados (Blouin *et al.*, 1995; Criscione *et al.*, 2005) e invertebrados (Peng *et al.*, 2017). Entretanto, *A. raillieti* é um parasito que apresenta ciclo biológico monoxênico, portanto espera-se que sua estrutura populacional seja determinada pelo deslocamento e encontro dos marsupiais hospedeiros.

Nas análises filogenéticas e redes de haplótipos foram observados quatro haplogrupos correspondentes de *A. raillieti*, denominados clados I a IV. No entanto, foi observada estruturação geográfica apenas no clado III, que reuniu predominantemente localidades das regiões Nordeste e Sudeste, e no clado IV, que reuniu exclusivamente localidades das regiões Sudeste e Sul. Estes clados ocorreram em simpatria nas localidades RIO/RJ, PTY/RJ e CUR/PR. Este fato sugere que essas linhagens experimentaram eventos históricos que contribuíram para a divergência genética observada nos clados III e IV. Já o clado I indica que houve ou pode haver fluxo gênico entre as localidades do estado do Rio Grande do Sul (POA/RS) e as localidades do estado da Paraíba (SRT/PB e MAM/PB), assim como o clado II indica para Rio Grande do Sul e Bolívia (>2500 km de distância). As relações filogenéticas próximas entre os espécimes de *A. raillieti* de POA/RS e das localidades da Paraíba sugere a existência de linhagem distribuída ao longo da diagonal de formações abertas formadas pelos biomas Cerrado, Caatinga e Pampa (Mares *et al.*, 1985, 1986; Alho *et al.*, 1986; Costa, 2003; Nascimento *et al.*, 2019).

Costa (2003), estudando padrões filogeográficos de diferentes espécies de pequenos mamíferos, incluindo marsupiais didelfídeos, observou que populações oriundas da Mata Atlântica e Amazônia estão intimamente relacionadas. Uma das hipóteses propostas para explicar estas relações é a interconexão das duas florestas

tropicais através da bacia dos rios Paraguai-Paraná, que no passado serviram como corredor que conectava as faunas da Amazônia e da Mata Atlântica. Esta hipótese pode explicar a proximidade dos espécimes de *A. raillieti* de POA/RS com os da Bolívia, sugerindo a colonização da Mata Atlântica por este nematódeo na região Sul. Os clados sugerem, portanto, que as linhagens de *A. raillieti* podem ter correlação com o ambiente, uma vez que o clado I está relacionado com biomas florestais (Amazônia e Mata Atlântica), enquanto clado II está relacionado com biomas de formações abertas (Cerrado, Caatinga e Pampas). Porém, para melhor esclarecer os padrões de distribuição destas linhagens seria necessário obter amostras de espécimes de *A. raillieti* de localidades inseridas nos biomas Cerrado, Caatinga e Amazônia.

Apesar da proximidade filogenética entre localidades geograficamente distantes, o compartilhamento de haplótipos só se deu entre localidades mais próximas (<300 km de distância), tal como observado entre as localidades RIO/RJ e PTY/RJ (145 km de distância), entre SRT/PB e MAM/PB (37 km de distância), entre PET/RJ e SGS/MG (279 km de distância), entre CUR/PR e SAI/SC (185 km de distância) e entre SAI/SC e POA/RS (300 km de distância).

As estruturas observadas nas análises filogenéticas e redes de haplótipos foram corroboradas pela análise AMOVA, que indicou maior variação genética entre clados (interpopulacional) do que dentro dos clados (intrapopulacional) e pelos valores altos (>0,25) e significativos de F_{st} , que indicam alta diferenciação genética e ausência ou baixo fluxo gênico entre os quatro clados (Hartl & Clark, 2010; Freeland *et al.*, 2011).

Contudo, não foi observada estruturação entre localidades, uma vez que os resultados de AMOVA demonstrou percentual de variação genética dentro e entre localidades muito similares (41% e 59%, respectivamente). Este fato é corroborado pelos valores de F_{st} , que demonstraram maior diferenciação genética entre algumas localidades mais distantes, mas também foram observados valores altos de F_{st} entre localidades geograficamente próximas, indicando alta diferenciação genética (F_{st} : 0,51 a 0,88), possivelmente causada pela simpatria dos clados III e IV nas localidades RIO/RJ e PTY/RJ. Desta forma, não foi observada estruturação geográfica. Estes resultados são corroborados pelo teste de Mantel, o qual demonstrou que, apesar de significativa e positiva, a correlação entre distância geográfica e distância genética foi muito baixa, indicando ausência de isolamento por distância. Alguns valores de F_{st} não foram significativos, o que pode ser

causado pela ausência de diferenciação genética, como observado entre as localidades do estado da Paraíba, ou pela amostragem limitada de algumas localidades (CAR/ES e BOL).

A elevada diversidade genética encontrada em *A. raillieti* também foi identificada em populações do nematódeo *Heligmosomoides polygyrus* (Dujardin, 1845), parasito do roedor florestal *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758). A fim de compreender o padrão filogeográfico de *H. polygyrus* provenientes de diferentes localidades da Europa, Nieberding *et al.* (2005) estudaram a estrutura genética das populações deste nematódeo. Os autores constataram elevado número de haplótipos para o gene MT-CYB, totalizando 126 haplótipos de 136 indivíduos sequenciados. Foram observados cinco grupos principais, tanto nas reconstruções filogenéticas quanto nas redes de haplótipos, os quais apresentaram alto grau de divergência genética, sendo separados por uma distância genética de 18 a 35 passos mutacionais, de forma similar ao observado entre clados encontrados de *A. raillieti* (19 a 23 passos mutacionais). Populações de *H. polygyrus* mostraram-se geograficamente estruturadas, mas algumas ocorreram em simpatria em determinadas localidades, bem como observado nos clados III e IV de *A. raillieti*.

Assim como *A. raillieti*, *H. polygyrus* possui ciclo biológico monoxênico e ampla distribuição congruente à de seu hospedeiro, embora seja um parasito espécie-específico. Uma vez que esse nematódeo em sua fase de vida livre não possui capacidade de dispersão, o fluxo gênico entre populações é dependente do deslocamento e encontro entre hospedeiros, desta forma o parasito compartilha parcialmente a história filogeográfica de seu hospedeiro (Nieberding *et al.*, 2004; 2005). Porém, diferentemente de *H. polygyrus*, *A. raillieti* é um parasito generalista, o que torna a compreensão de seus padrões filogeográficos mais complexa.

Outro estudo de estrutura genética populacional do trematódeo *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875), parasito de peixes, utilizando o gene MT-CO1, de cinco países do sudeste da Ásia, apresentou um padrão diferente de *A. raillieti*. Não foi observada estruturação geográfica, pois AMOVA e Fst não mostraram forte diferenciação entre os grupos regionais, bem como não foi encontrado isolamento por distância, com teste de Mantel não significativo, evidenciando que a distância geográfica não é limitante ao fluxo gênico entre as populações das diferentes localidades. Na rede de haplótipos, foi observada estrutura em forma de estrela, com um haplótipo central, o que sugere uma expansão populacional recente, sem estrutura filogeográfica e alto fluxo gênico entre localidades, assim como observado

nas outras análises (Tatonova *et al.*, 2013). Este padrão em estrela não foi observado em nossas análises, exceto no Clado III, onde há um haplótipo mais frequente, Haplótipo 9, e alelos raros separados deste por apenas um passo mutacional. Os diferentes padrões de estruturação populacionais observados para *C. sinensis* e *A. raillieti* pode se dar por histórias demográficas distintas, que podem ter deixado assinaturas, levando aos padrões de estruturação observados atualmente nas populações (Dantas *et al.*, 2013).

Santos *et al.* (2012) realizaram um estudo com base em genes mitocondriais e nucleares para descrever a estrutura genética de populações do cestódeo *Echinococcus vogeli* Rausch et Bernstein, 1972 da Amazônia brasileira. *Echinococcus vogeli* é um parasito de ciclo biológico heteroxênico, com hospedeiros silvestres, mas também possuem ciclo sinantrópico, parasitando humanos. Neste estudo, foram observadas duas populações de *E. vogeli* bem estruturadas geograficamente, uma a oeste e outra ao leste da Amazônia brasileira, com AMOVA indicando maior diferenciação entre as populações e altos valores de Fst. Essas populações são separadas por dois mil e quinhentos quilômetros (2500 km) de distância, o que pode restringir o fluxo gênico entre os dois grupos geográficos estudados (Santos *et al.*, 2012). Porém, nos nossos resultados observamos linhagens bastante divergentes em localidades geograficamente próximas (clados III e IV), o que nos leva a concluir que a restrição ao fluxo gênico pode ser decorrente de eventos históricos, levando a isolamento no passado, e não somente da distância geográfica.

5.1.2 Estrutura populacional de *Aspidodera raillieti* associada às espécies hospedeiras

As análises filogenéticas e rede de haplótipos mostraram que os clados de *A. raillieti* não estavam correlacionados com a espécie hospedeira, sendo que um mesmo clado foi encontrado em diferentes espécies de marsupiais. Além disto, também houve compartilhamento de haplótipos entre diferentes espécies hospedeiras, tais como entre espécimes de *D. aurita* de PET/RJ e *D. albiventris* de SGS/MG, e entre os espécimes de *D. aurita* de CUR/PR e *P. quica* de SAI/SC.

Corroborando o padrão encontrado nas filogenias e nas redes de haplótipos, não foi observada estruturação associada às espécies hospedeiras de *A. raillieti*, com AMOVA indicando menor variação genética entre os helmintos de cada espécie hospedeira (inter-hospedeiro). Porém, o elevado percentual de variação genética

dentro das espécies hospedeiras (intra-hospedeiro) e os valores de F_{st} muito altos ($>0,25$) e significativos entre algumas espécies hospedeiras podem ser decorrentes das distâncias geográficas entre as localidades de coleta dos marsupiais. Marsupiais Didelphini são filogeneticamente próximos, ocorrem em simpatria em determinadas localidades e possuem sobreposição dietária, o que pode explicar o compartilhamento de comunidades de parasitos e de seus haplótipos (Stallings, 1989; Leite, *et al.*, 1996; Santori *et al.*, 1997; 2015; Cáceres, 2001; Cáceres 2002; Ceotto *et al.*, 2009; Voss & Jansa, 2009; Jiménez *et al.*, 2011; Poulin, 2014).

Como observado para populações de *A. raillieti*, outros helmintos parasitos também não apresentaram padrão de estruturação genética de suas populações associada às espécies hospedeiras. No estudo de estrutura de populações de *E. vogeli* da Amazônia, foi possível verificar que a menor variação genética (6%) foi entre populações do parasito de humanos e do parasito de animais da região. Isto indica que a espécie hospedeira não é necessariamente uma barreira ao fluxo gênico entre as populações de alguns parasitos (Santos *et al.*, 2012).

Também foi demonstrada ausência de estruturação associada às espécies hospedeiras para o nematódeo *Dracunculus medinensis* (Linnaeus, 1758) (Thiele *et al.*, 2018). Este parasito possui ciclo biológico heteroxênico, sendo seus hospedeiros definitivos o homem e outros animais, incluindo cães e gatos. Thiele *et al.* (2018) estudaram a estrutura genética das populações deste nematódeo na África, com base em genes mitocondriais e microssatélites, a fim de, entre outros objetivos, verificar se hospedeiros humanos e cães compartilham ciclos de transmissão. Com base nas análises incluindo MT-CO1, foi observado compartilhamento de haplótipos entre hospedeiros diferentes e que não havia padrão discernível dependente do hospedeiro, confirmando que os nematódeos coletados de hospedeiros não humanos e humanos pertencem à mesma espécie. Esta ausência de diferenciação genética também foi observada nas análises dos microssatélites. Da mesma forma, outras análises, como AMOVA, evidenciaram que a maior variação genética se deu dentro das espécies hospedeiras (intrapopulacional), o que foi corroborado pelos valores baixos de F_{st} entre espécies hospedeiras e valores de F_{st} altos entre regiões de origem dos nematódeos. Para *D. medinensis*, a origem geográfica parece ter mais influência na estrutura populacional do parasito do que a espécie hospedeira, diferindo de *A. raillieti*, que não possui associação nem com a origem geográfica ou a espécie hospedeira.

López-Caballero *et al.* (2015) realizaram um estudo sobre divergência genética de indivíduos e populações do helminto *Oligacanthorhynchus microcephalus* s (Rudolphi, 1819) (filo Acanthocephala), parasitos de três marsupiais Didelphini (*Didelphis marsupialis*, *D. virginiana* e *Philander opossum*) de diversas localidades do México, a fim de detectar a existência de linhagens que possam corresponder a espécies independentes. As análises filogenéticas demonstraram um padrão similar ao de *A. raillieti* no presente estudo, em que os espécimes de *O. microcephalus* agruparam-se em três clados principais, os quais não estão correlacionados com as espécies hospedeiras ou com as localidades geográficas. Esta falta de estruturação das populações pode ser decorrente de vários aspectos, incluindo a história natural de seus hospedeiros, grande capacidade de dispersão dos marsupiais hospedeiros e outros fatores já citados, como simpatria e sobreposição de dietas (Almeida *et al.*, 2008; Lira *et al.*, 2008; Cerboncini *et al.*, 2011; López-Caballero *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2011). Desta forma, assim como realizado no trabalho de Nieberding *et al.* (2004), um estudo comparativo dos padrões filogeográficos de *A. raillieti* e seus hospedeiros permitiria verificar se há congruência e avançar com hipóteses para a estruturação observada.

5.1.3 **História demográfica e biogeográfica de *Aspidodera raillieti***

Flutuações demográficas decorrentes de eventos pretéritos deixam assinaturas genéticas. Dentre esses eventos, destacam-se as glaciações pleistocênicas, as quais são de grande importância para a atual estrutura genética das populações de diversas espécies, bem como formações de rios e montanhas (Hewitt, 2000; Dantas *et al.*, 2013). Algumas análises nos permitem fazer inferências sobre as flutuações demográficas, tais como os testes de neutralidade utilizados neste estudo.

Valores dos testes de neutralidade significativamente negativos sugerem que a população sofre seleção purificadora ou está em processo de expansão, tendo como característica o excesso de alelos raros (Hartl & Clark, 2010). Nos testes de neutralidade dos diferentes grupos estudados, alguns apresentaram valores negativos. Para os grupamentos por hospedeiros somente o grupo de espécimes parasitos de *P. quica* apresentou valores negativos. Porém, é necessário ressaltar que os parasitos de *P. quica* são representados somente pela localidade de SAI/SC, logo, os resultados dos testes de neutralidade para o grupo dos espécimes de *A. raillieti* parasitos de *P. quica* e os espécimes da localidade de SAI/SC foram os

mesmos. Para os grupamentos das localidades, PTY/RJ, PET/RJ, SRT/PB, CUR/PR, SGS/MG e SAI/SC apresentaram valores negativos, sendo que algumas foram negativas para D de Tajima e outras somente para Fs de Fu.

Esta assinatura de expansão foi corroborada pelos índices de diversidade genética, sendo demonstrado, para todos os grupamentos estudados (clados, localidades, e hospedeiros) uma alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica para o gene MT-CO1, indicando que, embora haja grande número de haplótipos, os mesmos diferem uns dos outros por poucas substituições nucleotídicas. Este achado indica uma assinatura de rápida expansão populacional com pequeno tamanho efetivo (Avise, 2000).

Segundo Carnaval *et al.* (2009) (Figura 32) e Porto *et al.* (2012) (Figura 33), baseados na distribuição de diferentes espécies de animais endêmicas pertencentes a grupos distantes, a Mata Atlântica possui cinco áreas de grande diversidade genética, as quais correspondem a refúgios florestais do Pleistoceno, decorrentes dos períodos glaciais. Esses refúgios seriam: 1) um grande refúgio do norte do Espírito Santo até o litoral norte da Bahia; 2) um grande refúgio na região Sudeste, incluindo Sul do Rio de Janeiro, Nordeste de São Paulo e Sudeste de Minas Gerais; 3) uma pequena área na costa de Alagoas e Pernambuco; 4) uma pequena área na Chapada Diamantina, interior da Bahia; e 5) uma pequena área no nordeste do Mato Grosso do Sul. Segundo Carnaval & Moritz (2008), em áreas não refugiadas é esperado encontrar assinaturas moleculares de expansão recente. Em nossos resultados, verificamos que os clados III e IV sugerem expansão populacional. Uma vez que estes clados estão distribuídos em regiões que não correspondiam a refúgios, isto indica que pode ter havido expansão de duas linhagens de *A. raillieti* isoladas a partir das áreas florestais de refúgios que se ampliaram para outras regiões durante períodos interglaciais. Uma dessas linhagens pode ter se diferenciado no Refúgio 1 e se expandido pelas regiões Nordeste e Sudeste até o norte da Região Sul, dando origem ao clado III; enquanto a segunda linhagem pode ter se diferenciado no Refúgio 2 e se expandido pelas regiões Sudeste e Sul, dando origem ao clado IV. A inclusão de espécimes de *A. raillieti* inseridas em possíveis refúgios permitiria testar essas hipóteses.

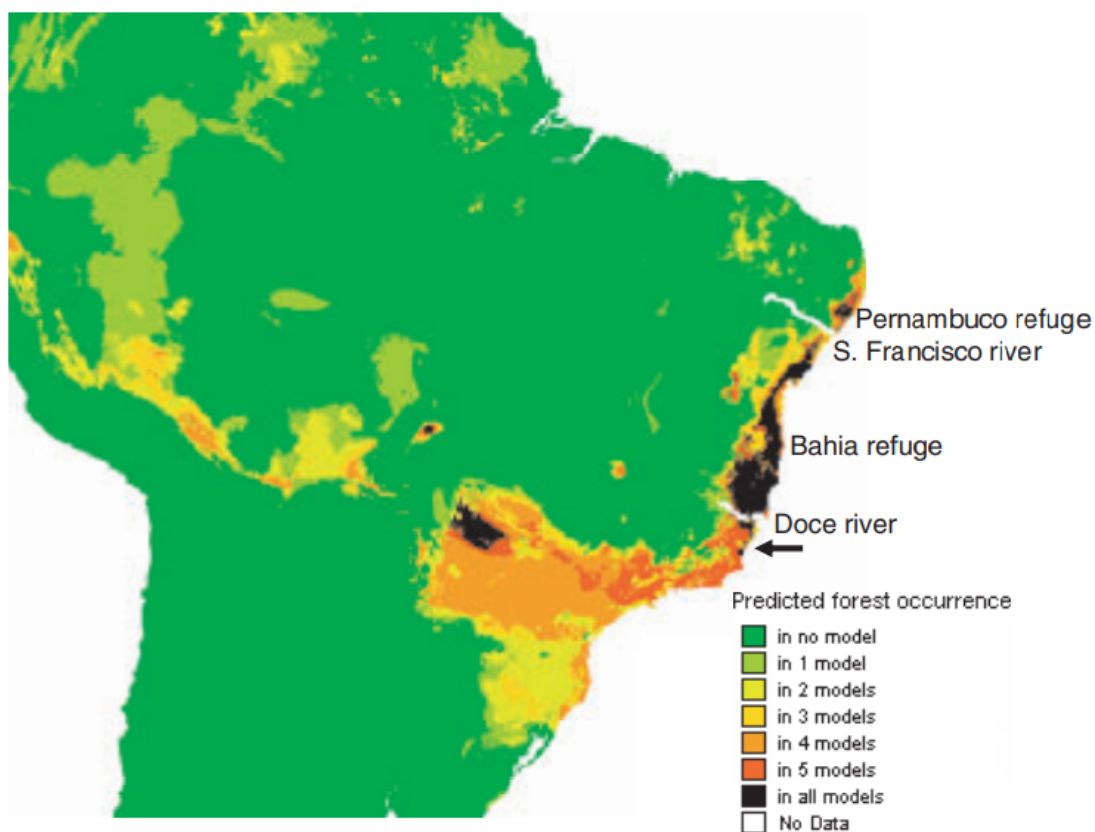


Figura 32: Áreas de refúgio florestal para Mata Atlântica em diferentes cenários climáticos (Carnaval *et al.*, 2008).

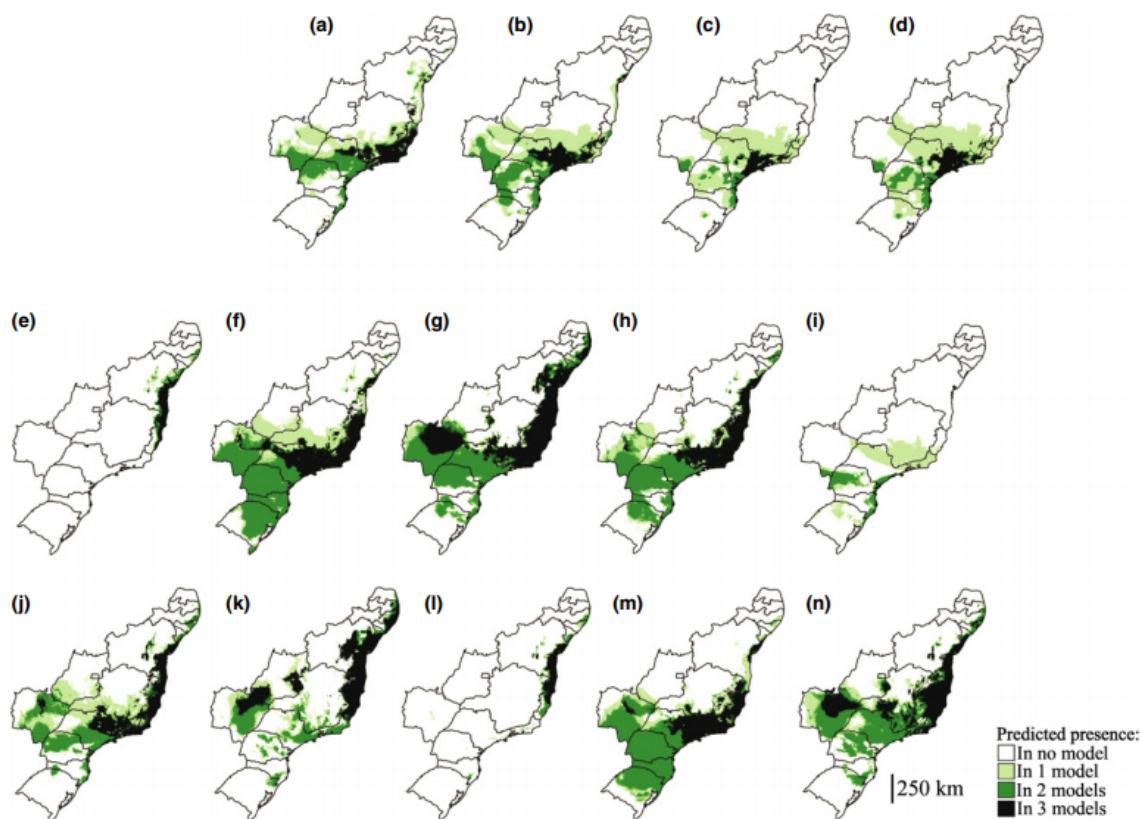


Figura 33: Localização de áreas de refúgio na Mata Atlântica para 14 espécies de animais endêmicas em diferentes cenários climáticos (Porto *et al.*, 2012).

Para melhor compreender a história evolutiva deste parasito, uma vez que *A. raillieti* possui distribuição Neotropical e parcialmente Neártica, seria necessário incluir espécimes de mais localidades. Seria necessário também incluir marcadores nucleares a fim de verificar se o padrão filogeográfico observado para o gene MT-CO1 se repete ou se as assinaturas não são decorrentes de seleção. Além disso, a inclusão de uma escala temporal, através de estimativas de tempos de divergência entre as linhagens recuperadas, permitiria verificar se há congruência entre eventos de Cladogênese e paleogeográficos.

5.2 Comparação morfológica entre espécimes de *Aspidodera raillieti* provenientes de diferentes clados filogenéticos, localidades geográficas e hospedeiros

No presente estudo, foram realizadas análises morfológicas por MEV a fim de verificar possíveis diferenças morfológicas dentro e entre os clados obtidos a partir das análises filogenéticas e filogeográficas, localidades geográficas e espécies hospedeiras. Desta forma, optamos por buscar identificar na região anterior do corpo (coifa cefálica) de *A. raillieti*, onde é encontrada maior variabilidade morfológica, características que pudessem ajudar a distinguir os clados recuperados (Santos *et al.*, 1990; Chagas-Moutinho *et al.*, 2007).

As análises morfológicas realizadas por MEV confirmaram a identificação dos espécimes estudados como *A. raillieti*, concordando com os achados de Chagas-Moutinho *et al.* (2007). No entanto, foram observadas diferenças morfológicas em algumas estruturas de *A. raillieti*, tais como nas projeções interlabiais, que fazem parte dos cordões cefálicos, e na delimitação do poro presente no ápice dos interlábios.

Dentre os espécimes representantes do clado I, não foi observada variação na forma da projeção interlabial assim como na delimitação do poro presente no ápice dos interlábios (Figura 24). Ambos os espécimes estudados apresentaram interlábio delgado com poro discreto no ápice. Porém, só foram avaliados espécimes parasitos de *D. albiventris* de POA/RS, o que evidencia a necessidade de analisar a morfologia da coifa cefálica de espécimes parasitos de *D. pernigra* da Bolívia, que também compõem o clado I.

Já os espécimes de *A. raillieti* representantes do clado II, apresentaram variação morfológica intrapopulacional. Os espécimes parasitos de *D. albiventris* de POA/RS (Figura 25A) e de SRT/PB (Figura 25B) apresentaram interlábio delgado com poro discreto no ápice, assim como os espécimes do clado I. Por outro lado, os outros dois espécimes deste clado, também parasitos de *D. albiventris* de SRT/PB (Figuras 25C e 25D), apresentaram interlábio triangular. Esta variação evidenciava a falta de homogeneidade na forma do interlábio dentro do clado.

Dentre os espécimes de *A. raillieti* representantes do clado III, também foi observada variação morfológica intraclado, na qual dois dos espécimes parasitos de *D. albiventris* de SRT/PB deste clado apresentaram projeções interlabiais com forma delgada (Figuras 26A e 26C). No entanto, um deles apresentou poro bem definido enquanto o outro apresenta poro discreto. Quando analisados espécimes de *A. raillieti* parasitos de *D. aurita* das localidades PTY/RJ e RIO/RJ, foi observada variação morfológica, em que o interlábio apresentou desde forma delgada com discreta dilatação na região anterior a triangular e o poro variou de bem definido a de difícil visualização. Além da forma do interlábio, como visto no clado II, a variação na delimitação do poro presente no ápice do interlábio também não demonstrou correlação com o clado ou espécie hospedeira.

Por fim, os espécimes do clado IV também apresentam diferenças morfológicas intrapopulacionais. Todos os espécimes estudados deste Clado possuía interlábio com forma delgada, exceto o espécime parasito de *D. aurita* do RIO/RJ (Figura 27D) que possuía uma discreta dilatação na região anterior. Também neste grupo, houve variação na delimitação do poro nos espécimes parasitos de *D. albiventris* de CUR/PR (Figura 27A), de *P. quica* de SAI/SC (Figura 27B) e de *D. aurita* de PET/RJ (Figura 27C), que variou de discreto a difícil visualização (Figura 27D).

Estes achados demonstraram variação morfológica em *A. raillieti* dentro de uma única espécie hospedeira. Também constatamos que há variabilidade morfológica dentro de um mesmo hospedeiro. Além disso, foram observados espécimes de *A. raillieti* representantes de clados distintos e com morfologia semelhante. Isto demonstra que os clados obtidos a partir do marcador genético MT-CO1 não mostrou correlação com os caracteres morfológicos variáveis observados na coifa cefálica, nem com as espécies hospedeiras.

Monte *et al.* (2014) compararam aspectos morfológicos e morfométricos de dois haplótipos de *Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935 que ocorrem no Brasil,

baseado no marcador molecular MT-CO1. Neste estudo, foi observada discreta variação nas bifurcações que unem os raios laterais da bolsa copuladora e nos raios ventrais e dorsais dos espécimes machos entre os dois haplótipos de *A. cantonensis*. Esta correlação das diferenças morfológicas e os haplótipos não foi encontrada presente estudo.

Maldonado *et al.* (2010) realizaram um estudo comparando a morfologia e morfometria de isolados do nematódeo *A. cantonensis* de diferentes localidades do Brasil (Pernambuco; São Gonçalo e Barra do Piraí, Rio de Janeiro; e Joinville, Santa Catarina) e de uma localidade do Japão. Nesse estudo também foram observadas variações morfológicas intraespecíficas em estruturas de importância taxonômica, tais como observados nos isolados de São Gonçalo, os quais apresentaram raios da bolsa copuladora mais longos e mais finos quando comparados aos espécimes do Japão e Pernambuco. Apesar das variações intraespecíficas, os autores observaram características morfológicas particulares que confirmaram a indentidade dos espécimes estudados como *A. cantonensis*, de forma análoga ao que foi observado no presente.

No estudo de López-Caballero *et al.* (2015) o helminto *O. microcephalus* parasito de três espécies de marsupiais Didelphini de diversas localidades do México, foram observadas diferenças tanto na morfometria quanto nas análises por MEV, sendo que os espécimes representantes de uma das linhagens do parasito (clado I) apresentam ganchos presentes na probóscide menores do que dos espécimes das outras duas linhagens (clados II e III). No entanto, os autores consideram que estes dados não fornecem evidências suficientes para separar o clado I, enfatizando a necessidade de descrição taxonômica adequada e a realização de uma análise de divergência genética desta linhagem ao longo de sua distribuição geográfica a fim de confirmar se é uma única espécie (López-Caballero *et al.*, 2015).

Neste contexto, torna-se evidente a necessidade de estudos de diversidade morfológica e genética ao longo da distribuição geográfica de uma espécie, a fim de detectar possíveis variações ao nível intraespecífico, evitando erros de identificação.

5.2.1 Implicações para a Taxonomia

Aspidodera raillieti está mais relacionada morfologicamente com as espécies *A. subulata* e *A. lanfredi*, ambas parasitas de marsupiais (Santos *et al.*, 1990; Chagas-Moutinho *et al.*, 2014). *Aspidodera raillieti* e *A. subulata* parasitam *D.*

albiventris, *M. nudicaudatus* e *P. quica*. *Aspidodera raillieti* difere de *A. subulata* por apresentar cordões cefálicos tocando a base da coifa cefálica e ultrapassando o nível do vestibulo (Santos *et al.*, 1990).

Dentre os espécimes analisados no presente estudo, observamos características que confirmam a identificação taxonômica de *A. raillieti*, não sendo encontrado nenhum espécime de *A. subulata* em *D. albiventris*, *D. aurita* ou *P. quica* de nossa amostra. Em um estudo sobre a fauna de helmintos de três espécimes de *D. albiventris* coletados no Piauí (Parque Nacional da Serra da Capivara), foi encontrado somente um destes marsupiais parasitado com um espécime fêmea de *A. subulata*. Enquanto dois deles estavam parasitados por *A. raillieti* (totais de 26 e 72 helmintos em cada marsupial) (Santos *et al.*, 2019). Portanto, a baixa abundancia de *A. subulata* no estudo citado pode explicar o fato de não encontrarmos este parasito em nossa amostra de marsupiais, uma vez que analisamos a morfologia somente dos espécimes que tiveram fragmentos do gene MT-CO1 e aqueles utilizados nas análises morfométricas.

Aspidodera raillieti e *A. lanfredi* ocorrem em simpatria somente na espécie hospederia *D. aurita* e diferem nas estruturas que compõem a coifa cefálica (Chagas-Moutinho *et al.*, 2014). *Aspidodera raillieti* possui projeção cuticular digitiforme no lábio latero-ventral esquerdo que se encaixa no lábio latero-ventral direito, característica que também foi observada em nossos espécimes. Já *A. lanfredi* apresenta projeção cuticular membranosa que se encaixa no lábio latero-ventral direito (Chagas-Moutinho *et al.*, 2007; 2014). Outra estrutura que diferencia *A. raillieti* de *A. lanfredi* são as projeções interlabiais. Segundo Chagas-Moutinho *et al.* (2014), o interlábio de *A. lanfredi* é mais robusto que o de *A. raillieti*, com a base larga estreitando-se em direção ao ápice. No entanto, observamos esta estrutura com característica similar em alguns de nossos espécimes, o que chamamos de forma triangular: dois espécimes parasitos de *D. albiventris* de Santa Rita, PB, representantes do clado II, e um espécime parasito de *D. aurita* de Paraty, RJ, representante do clado III. Portanto, devido à variação na forma dessa estrutura, em nível intraespecífico, concluímos que a forma do interlábio não é um caractere que permita distinguir estas duas espécies de *Aspidodera*.

Aspidodera lanfredi foi encontrado apenas em *D. aurita* na localidade de Cachoeira de Macacu, RJ, e desde então não houve mais registros. No entanto, não há exemplares do parasito depositados em coleções científicas ou sequências nucleotídicas depositadas em bancos genéticos (Chagas-Moutinho *et al.*, 2014).

Desta forma, é necessária nova coleta na localidade e hospedeiro tipos visando validar a espécie.

Estudos filogenéticos baseados em dados morfológicos e moleculares para a família Aspidoderidae desafiam a divisão tradicional em duas subfamílias (Aspidoderinae e Lauroiinae), sugerindo que os cordões cefálicos não são confiáveis como caráter diagnóstico (Jiménez *et al.*, 2008; 2012; 2013). Em nossas análises morfológicas por MEV, utilizamos características presentes na coifa cefálica, incluindo os cordões cefálicos, procurando correlacioná-las com os clados obtidos nas análises filogenéticas e filogeográficas. No entanto, pudemos observar uma grande diversidade morfológica na coifa cefálica de diferentes populações de *A. raillieti*, sem encontrar correlação com clados, localidades ou hospedeiros. Logo, os resultados deste estudo corroboram a hipótese proposta por Jiménez *et al.* (2008; 2012; 2013), de que os cordões cefálicos anastomosados não são consistentes como caráter diagnóstico para o gênero *Aspidodera*. Sendo assim, fica evidente que espécies do gênero *Aspidodera* parasitos de marsupiais necessitam ser revisadas com objetivo de identificar caracteres taxonômicos consistentes, conciliando-os através de hipóteses filogenéticas.

5.3 Comparação morfométrica entre espécimes de *Aspidodera raillieti* provenientes de diferentes localidades geográficas e hospedeiros

No presente estudo foram realizadas análises discriminantes múltiplas a fim de comparar a variação morfométrica de espécimes de *A. raillieti* provenientes de diferentes espécies hospedeiras, entre localidades amostradas e entre regiões Nordeste, Sudeste e Sul. Dentre todas as variáveis estudadas, as que melhor discriminaram os grupos estudados (espécies hospedeiras, localidades amostradas e regiões Nordeste, Sudeste e Sul), ou a maioria deles, foram: largura e o comprimento da coifa cefálica.

Quando analisado o grupo formado pelas espécies hospedeiras (*D. albiventris*, *D. aurita* e *P. franatus*), tanto para helmintos fêmeas quanto para machos, não foi observada acentuada separação morfométrica em *A. raillieti*, embora alguns espécimes machos das diferentes espécies hospedeiras não estivessem sobrepostos (Figura 28). Este resultado corrobora as análises filogenéticas e filogeográficas, as quais permitiram verificar ausência de estrutura genética entre populações de *A. raillieti* associadas às espécies hospedeiras, em

que haplótipos são compartilhados entre diferentes hospedeiros. A congruência entre as diferentes análises sugere que a diversidade intraespecífica de *A. raillieti* seja delimitada por outros fatores, que não a espécie hospedeira.

Quando analisada a diferenciação morfométrica entre as localidades geográficas, os helmintos fêmeas apresentaram grande sobreposição entre localidades, enquanto os machos foram diferenciados em dois grupos: o primeiro composto pelos machos das localidades de MAM/PB, SRT/PB, RIO/RJ, PTY/RJ, CAR/ES e POA/RS, e o segundo formado pelos machos das localidades PET/RJ, CUR/PR, SAI/SC e SGS/MG (Figura 29). Estes dois grupos observados são similares aos clados III e IV recuperados por inferências filogenéticas e redes de haplótipos.

Devido à sobreposição morfométrica entre as localidades geográficas, realizamos análises discriminantes múltiplas para verificar se os espécimes de *A. raillieti* de localidades mais próximas apresentavam sobreposição. Desta forma, os dados foram separados em três regiões (Nordeste, Sudeste e Sul). Os espécimes machos e fêmeas de *A. raillieti* da região Nordeste, composta pelas localidades MAM/PB e SRT/PB, não apresentaram diferenciação morfométrica significativa (Tabela 23). Esta sobreposição observada entre as duas localidades pode ser causada pela proximidade geográfica das localidades (37 km de distância), sugerindo ser uma única população. No entanto, os haplótipos de ambas as localidades desta região foram agrupados em dois clados (II e III).

Os espécimes machos da região Sudeste apresentaram uma maior variação morfométrica, com maior sobreposição entre as localidades RIO/RJ, PTY/RJ, e CAR/ES e entre as localidades PET/RJ e SGS/MG (Figura 30B). Estes achados foram congruentes com as análises moleculares, em que a maioria dos haplótipos das localidades RIO/RJ, PTY/RJ e todos os haplótipos de CAR/ES se agruparam no clado III, enquanto todos os haplótipos de PET/RJ e SGS/MG se agruparam no clado IV.

Já os espécimes da região Sul, principalmente os machos, apresentaram uma maior sobreposição entre as localidades de CUR/PR e SAI/SC, que foram diferenciados dos espécimes da localidade de POA/RS (Tabela 23; Figura 31). Nas análises moleculares, observamos que três clados (I, II e IV) circulam nos marsupiais de POA/RS, o que pode ter relação com a diferenciação morfométrica observada entre os espécimes desta localidade e os de CUR/PR e SAI/SC.

Alguns estudos a fim de conhecer a variação morfométrica de helmintos parasitos têm utilizado análises multivariadas e demonstrado diferenças entre populações. Gharamah *et al.* (2012) desenvolveram um estudo a fim de investigar as variações populacionais e entre hospedeiros do nematódeo *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803), parasito de ovinos e caprinos da Malásia e Lêmen. Nesse estudo, análises discriminantes demonstraram que os parasitos dos dois países separaram-se em dois grupos, principalmente devido aos comprimentos do corpo, das papilas cervicais e do espículo. Porém, não foi observado isolamento quanto aos hospedeiros, ovinos e caprinos, semelhante ao que observamos em *A. raillieti* em nossas análises morfológicas e genéticas. Os autores sugerem que esta diferenciação se dê pelo isolamento geográfico.

De forma similar ao presente trabalho, Pinacho-Pinacho *et al.* (2018) realizaram um estudo morfométrico utilizando análise multivariada da variância (MANOVA) a fim de diferenciar linhagens do complexo de espécies *Neoechinorhynchus golvani* Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala) parasito de peixes, recuperadas em análises filogenéticas baseadas em genes mitocondriais e nucleares. O teste de MANOVA mostrou que uma das linhagens recuperadas se distingue das demais por possuir comprimento um pouco menor dos ganchos apicais presentes na probóscide. Desta forma, associado a dados morfológicos, foi descrita uma nova espécie, *Neoechinorhynchus costarricense*. Porém, no presente estudo não foi possível verificar uma correlação dos clados com caracteres morfológicos ou dados morfométricos, além da ausência de outro gene para verificar a consistência das linhagens recuperadas.

Estes achados demonstram que existem evidentes variações morfométricas em *A. raillieti*, o que destaca a importância de se estudar maior número de espécimes possível na descrição de novas espécies. Isto permite revelar a variação intraespecífica, morfológica e morfométrica.

6 CONCLUSÕES

Conclusão geral

Não foi observada correlação entre a morfologia de *A. raillieti* e os clados filogenéticos, localidades de captura ou espécie hospedeira. No entanto, *A. raillieti* apresentou estruturação genética, de forma análoga aos agrupamentos observados através da morfometria, que sugerem correlação com eventos pretéritos. Além disso, os clados também sugerem uma correlação com o ambiente, uma vez que os clados I, III e IV são congruentes com os biomas florestais (Amazônia e Mata Atlântica), enquanto clado II parece ser congruente com biomas de formações abertas (Cerrado, Caatinga e Pampa).

Conclusões específicas

- As populações de *A. raillieti*, parasitos de marsupiais Didelphini da Mata Atlântica, estão estruturadas em quatro Clados (I, II, III e IV).
- O clado I sugere relação próxima de populações de *A. raillieti* da Amazônia e Mata Atlântica, corroborando uma interconexão histórica das duas florestas através da bacia dos rios Paraguai-Paraná.
- Clado II indica relação próxima das populações de *A. raillieti* das localidades da Paraíba e do Rio Grande do Sul.
- Clados III e IV apresentaram evidências de expansão populacional, sugerindo divergência em eventos pretéritos, atualmente ocorrendo em simpatria em localidades do estado do Rio de Janeiro e Paraná.
- Não há relação de especificidade entre os clados de *A. raillieti* e as espécies hospedeiras (*D. albiventris*, *D. aurita* e *P. quica*), havendo compartilhamento de haplótipo entre hospedeiros.

- *Aspidodera raillieti* possui grande variabilidade morfológica em caracteres presentes na coifa cefálica, que não está associada aos clados filogenéticos ou às espécies hospedeiras.
- A variabilidade fenotípica observada em caracteres de importância taxonômica sugere a necessidade de uma revisão das espécies do gênero.
- Os clados III e IV de *A. raillieti* tem suporte genético e morfométrico, mas não especificidade ao hospedeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alho CJR, Pereira, LA, & Paula AC. Patterns of habitat utilization by small mammal populations in Cerrado Biome of Central Brazil. *Mammalia*. 1986; 50(4): 447–460.

Amato JFR *et al.* Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado. Rio de Janeiro: Imprensa Universitária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1991.

Anderson RC *et al.* Keys to the nematode parasites of vertebrates, Archival volume. CABI Publishing, Wallingford, UK. 2009. 463pp.

Avise JC. Molecular markers, natural history and evolution. Springer Science & Business Media. 2004.

Avise JC. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*. 2009; 36(1): 3-15.

Avise JC. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard university press. 2000.

Avise JC *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*. 1987; 18(1): 489-522.

Bandelt H *et al.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*. 1999; 16 (1): 37-48.

Blouin MS *et al.* Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics*. 1995; 141(3): 1007-1014.

Cáceres NC. Diet of three didelphid marsupials (Mammalia, Didelphimorphia) in southern Brazil. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*. 2004; 69(6): 430-433.

Cáceres NC. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 2002; 37(2): 97-104.

Cáceres NC. Os Marsupiais do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação. 2º ed. Campo Grande, MS: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2012. 498pp.

Cáceres NC & Monteiro-Filho ELA. Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 2001; 36(2): 85-92.

Carnaval AC & Moritz C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 2009; 35(7): 1187-1201.

Carreira JCA *et al.* Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & vectors*. 2012; 5(1): 111.

Ceotto P *et al.* Diet variation of the marsupials *Didelphis aurita* and *Philander frenatus* (Didelphimorphia, Didelphidae) in a rural area of Rio de Janeiro state, Brazil. *Mastozoologia Neotropical*. 2009; 16(1): p. 49-58.

Cerqueira R. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae). *Journal of Biogeography*; 1985; 135-145.

Chagas-Moutinho VA *et al.* Further description of *Aspidodera raillieti* (Nematoda: Aspidoderidae) from *Didelphis marsupialis* (Mammalia: Didelphidae) by light and scanning electron microscopy. *Parasitology Research*. 2007; 101(5): 1331.

Chagas-Moutinho VA *et al.* New Aspidoderidae species parasite of *Didelphis aurita* (Mammalia: Didelphidae): A light and scanning electron microscopy approach. *Acta Tropica*. 2014; 130: 162-166.

Cirino BS. Análise da helmintofauna de *Metachirus nudicaudatus* (Geoffroy, 1803) do município de Igrapiúna, estado da Bahia. São Gonçalo. Monografia [Licenciatura em Ciências Biológicas] - Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2019.

Cole R & Viney M. The population genetics of parasitic nematodes of wild animals. *Parasites & vectors*, 2018; 11(1): 590.

Colombo AF & Joly CA. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology*. 2010; 70(3): 697-708.

Costa LP. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*. 2003; 30(1): 71-86.

Costa-Neto SF *et al.* Metacommunity structure of the helminths of the black-eared opossum *Didelphis aurita* in peri-urban, sylvatic and rural environments in southeastern Brazil. *Journal of helminthology*. 2019; 93(6): 720-731.

Criscione CD *et al.* Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular ecology*. 2005; 14(8): 2247-2257.

Cunha AA & Vieira MV. Support diameter, incline, and vertical movements of four didelphid marsupials in the Atlantic forest of Brazil. *Journal of Zoology*. 2002; 258(4): 419-426.

Dantas G *et al.* Introdução à filogeografia aplicada à conservação biológica de vertebrados Neotropicais. Curitiba: Editora CRV; 2013. 194 pp.

Dayrat B. Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, 2005; 85(3): 407-417.

Diesing KM. Revision der Nematoden. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe*. 1861; 42(28): 595-736.

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32 (5): 1792 - 1797.

Emmons L & Feer F. Neotropical rainforest mammals: a field guide. 1997.

Excoffier L *et al.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992; 131(2): 479-491.

Excoffier L *et al.* Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*. 2005; 1: 47.

Freeland JR *et al.* *Molecular ecology*. 2011.

Freitas JFT. Notas sôbre 'Heterakidae' Railliet & Henry, 1914 (Nematoda, Subuluroidea). Revista Brasileira de Biologia. 1956; 16: 461–482.

Freitas SR *et al.* Habitat preference and food use by *Metachirus nudicaudatus* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphita, Didelphidae) in a restinga forest at rio de janeiro. Revista Brasileira de Biologia. 1997; 57: 93-98.

Fu Y. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 1997; 147 (2): 915-925.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2019, Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/>> Acesso em: 05 de out de 2019.

Gardner AL. ed. Mammals of South America, volume 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. Vol. 2. University of Chicago Press, 2008.

Gentile R *et al.* Community structure and population dynamics of small mammals in an urban-sylvatic interface area in Rio de Janeiro, Brazil. Zoologia (Curitiba). 2018; 35.

Gentile R *et al.* Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. Studies on Neotropical Fauna and Environment. 2000; 35(1): 1-9.

Gentile R *et al.* Population dynamics of four marsupials and its relation to resource production in the Atlantic Forest in Southeastern Brazil. Mammalia. 2004; 68(2-3): 109-119.

Gharamah AA *et al.* Morphological variation between isolates of the nematodes *Haemonchus contortus* from sheep and goat populations in Malaysia and Yemen. J Helminthol. 2012; 26:1-7.

Gomes DC *et al.* Nematode parasites of marsupials and small rodents from the Brazilian Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Revista Brasileira de Zoologia. 2003; 20(4): 699-707.

Guindon S *et al.* New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 2010; 59 (3): 307-321.

Haag KL *et al.* Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Journal of Parasitology*. 2004; 90(2): 234-240.

Hartl DL & Clark AG. *Princípios de Genética de Populações*. 4 ed. Artmed, Porto Alegre, 2010.

Hodda, M. Phylum Nematoda Cobb, 1932. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa*. 2011; 3148: 63–95.

Inglis (a), William G *et al.* The comparative anatomy and systematic significance of the head in the nematode family Heterakidae. In: *Proceedings of the Zoological Society of London*. 1957; 133-143.

Inglis WG. The evolution, host relationships and classification of the nematode superfamily Heterakoidea. *Bulletin of the British Museum (Natural History), D. Zoology*. 1967; 15(1): 1-28.

Inglis WG (b). A review of the nematode superfamily Heterakoidea. *The Annals and Magazine of Natural History; Zoology, Botany, and Geology*. 1957; 12: 905–912.

Jari Oksanen F *et al.* Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner (2018). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-3. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Jiménez FA *et al.* Four events of host switching in Aspidoderidae (Nematoda) involve convergent lineages of mammals. *Journal of Parasitology*, 2012; 98(6): 1166-1175.

Jiménez FA *et al.* Aspidoderidae from North America, with the description of new species of Aspidodera (Nematoda: Heterakoidea). *Journal of Parasitology*. 2006; 92(4): 847 - 854.

Jiménez FA *et al.* Structure of parasite component communities of didelphid marsupials: insights from a comparative study. *Journal of Parasitology*. 2011; 97(5): 779 – 787.

Jiménez FA *et al.* *Aspidodera kinsellai* n. sp. (Nematoda: Heterakoidea) from Nine-Banded Armadillos in Middle America with Notes on Phylogeny and Host–Parasite Biogeography. *Journal of Parasitology*. 2013; 99(6): 1056-1061.

Jiménez-Ruiz AF & Gardner SL. The nematode fauna of long-nosed mice *Oxymycterus* spp. From the Bolivian Yungas. *Journal of Parasitology*. 2003, 89(2), 299-308.

Jiménez-Ruiz FA *et al.* The systematic position of Lauroiinae Skrjabin and Schikhobalova, 1951 (Nemata: Heterakoidea: Aspidoderidae), as revealed by the analysis of traits used in its diagnosis. *Cladistics*. 2008; 24(4): 459-476.

Kearse M *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012; 28 (12): 1647-1649.

Kim J *et al.* Phylogeography of the highly invasive sugar beet nematode, *Heterodera schachtii* (Schmidt, 1871), based on microsatellites. *Evolutionary applications*. 2019; 12(2): 324-336.

Lefort V *et al.* SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, 34: 2017; 2422–2424.

Legendre P & Legendre L. 2012. *Numerical Ecology*. Vol. 24 Elsevier Academic Press: p. 1006.

Leite YLR *et al.* Diet and vertical space use of three sympatric opossums in a Brazilian Atlantic forest reserve. *Journal of tropical ecology*. 1996; 12(3), 435-440.

Librado P & Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009; 25 (11): 1451-1452.

Lima MM *et al.* Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and

reservoirs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2012; 106(3): 143-149.

López-Caballero J *et al.* Genetic divergence of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Acanthocephala: Archiacanthocephala: Oligacanthorhynchidae), parasite of three species of opossum (Mammalia: Didelphidae) across Central and Southeastern Mexico. Comparative Parasitology. 2015; 82(2): 175-186.

Miller MA *et al.* Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Gateway Computing Environments Workshop (GCE) (2010).

Maddison WP & Maddison DR. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, 2011.

Maldonado Júnior A *et al.* First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2010; 105(7): 938-941.

Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research. 1967; 27: 209-220.

Mares MA *et al.* The Brazilian Caatinga in South American zoogeography: tropical mammals in a dry region. Journal of Biogeography. 1985; 12: 57–69.

Mares MA. Small mammals community structure and composition in the Cerrado province of Central Brazil. Journal of Tropical Ecology. 1986; 2: 301–325.

Mittermeier RA *et al.* Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: Biodiversity hotspots. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 3-22.

Mittermeier RA *et al.* Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions Cemex. Mexico City. 2004.

Miyaki CY. Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. Megadiversidade. 2009; 5: 96-100.

MMA (Ministério do Meio Ambiente), 2019, Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlântica_emdesenvolvimento> Acesso em: 05 de out de 2019.

Monte TC *et al.* Brazilian *Angiostrongylus cantonensis* haplotypes, ac8 and ac9, have two different biological and morphological profiles. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014; 109(8): 1057-1063.

Myers N *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000; 403(6772): 853.

Nadler & De León. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology*, 2011, 138 (13): 1688-1709.

Nascimento DC *et al.* Genetic variability of populations of the white-eared opossum, *Didelphis albiventris* Lund 1840 (Didelphimorphia; Didelphidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 2019; 79(4): 594–602. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.184842>

Nieberding C *et al.* A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2004; 271(1557): 2559-2568.

Noireau F *et al.* *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary research*. 2009; 40(2): 1-23.

Noss RF *et al.* How global biodiversity hotspots may go unrecognized: lessons from the North American Coastal Plain. *Diversity and Distributions*, 2015; 21(2): 236-244.

Nychka D *et al.* (2017). "fields: Tools for spatial data." doi: 10.5065/D6W957CT (URL: <http://doi.org/10.5065/D6W957CT>), R package version 9.6, <URL: www.image.ucar.edu/~nychka/Fields>

Paradis E *et al.* APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004; 20: 289-290

Peng J *et al.* Phylogeography of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) in southern China and some surrounding areas. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017; 11(8): e0005776.

Poulin R. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *International Journal for Parasitology*. 2014; 44(9): 581-589.

Prosser SW *et al.* Advancing nematode barcoding: a primer cocktail for the cytochrome C oxidase sbunit I gene from vertebrate parasite nematodes. *Molecular Ecology Resources*. 2013; 13: 1108-1115.

Railliet A & Henry A. Observations sur less nématodes du genre *Aspidodera* Railliet & Henry, 1912. *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle Paris*. 1913; 19(2): 93-99.

Rambaut A *et al.* Drummond, Tracer. 2014.

Rey L. *Parasitologia*. 4a Ed. Guanabara Koogan, 2010. 856p.

Ribeiro MC *et al.* The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*. 2009; 142(6): 1141-1153.

Ronquist F *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*. 2012; 61 (3): 539- 42.

Santori RT *et al.* Inter and intraspecific differences in food resources selection and use in captive *Philander frenatus* and *Didelphis aurita* (Didelphimorphia; Didelphidae). *Oecologia Australis*. 2015; 19(1).

Santori RT *et al.* Natural diet at a restinga forest and laboratory food preferences of the opossum *Philander frenata* in Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 1997; 32(1): 12-16.

Santos CP *et al.* The genus *Aspidodera* Railliet and Henry. 1912 (Nematoda: Heterakoidea): Revision, New Synonyms and Key for Species. *Revista Brasileira de Biologia*. 1990; 50(4): 1017-1031.

Santos EGN *et al.* Morphological and Genetic Characterization of Nematodes of the Opossum *Didelphis albiventris* and the Armadillo *Dasybus novemcinctus* from Serra da Capivara National Park. *Oecologia Australis*, 2019; 23 (2).

Santos GB *et al.* Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology*. 2012; 42(13-14): 1115-1118.

Schmidt GD & Roberts LS. *Foundations of parasitology*. Saint Louis: Mosby, 2009.

Sharma M *et al.* Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Echinococcus granulosus* sensu stricto complex based on mitochondrial DNA signature. PLoS One. 2013; 8(12): e82904.

Skrjabin KI & Schikhobalova NP. (Reconstrução da sistemática da família Heterakidae). Dokl Akad Nauk SSSR. 1947; 58: 718 – 721 (russo).

Smyth JD & Wakelin D. Introduction to animal parasitology. CalBridge University Press, 1994.

Stallings JR. Small mammal inventories in an eastern Brazilian park. Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences. 1989; 34(4): 153-200.

Sutton CA *et al.* Contribución al conocimiento de la fauna parasitológica Argentina. VI. Sobre un nuevo Lauroiinae (Nematoda, Ascaridida). Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle Section A Zoologie, biologie et écologie animales. 1980; 2: 81–85.

Tabarelli M *et al.* Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade. 2005; 1(1): 132-138.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 1989; 123 (3): 585-595.

Team RCR: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. URL <http://www.R-project.org>.

Travassos L. Sobre as espécies brasileiras da subfamília Heterakinae Railliet & Henry, 1912. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1913; 5(3): 271-318.

Venables WN & Ripley BD (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0

Vicente JJ *et al.* Nematóides do Brasil. Parte V: nematóides de mamíferos. Revista Brasileira de Zoologia. 1997, 14(1), 1-452.

Vicente JJ. Revisão da subfamília Aspidoderinae Skrjabin e Shikhobalova, 1947 (Nematoda). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1966; 64: 131-161.

Voss RS & Jansa SA. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2009; 2009 (322): 1-177.

Voss RS *et al.* A revision of *Philander* (Marsupialia: Didelphidae), part 1: *P. quica*, *P. canus*, and a new species from Amazonia. *American Museum Novitates*. 2018; 2018(3891): 1-70.

Wright S. *Evolution and the genetics of populations*, vol. 4. Variability within and among natural populations. 1978.

Xia X & Lemey P. Assessing substitution saturation with DAMBE. *The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny*, 2009; 2: 615-630.

Xia X & Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 2001; 92 (4): 371-373.

Xia X *et al.* An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003; 26 (1): 1-7.

Zhang Z. Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. In: Zhang z.-q.(ed.) *animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (addenda 2013)*. *Zootaxa*, 2013; 3703(1): 5-11.

8 APÊNDICES E/OU ANEXOS

8.1 Apêndice 1 – Protocolo do Isolamento do DNA

- Os nematódeos foram retirados do etanol 70 % e colocados em água destilada durante uma hora. Em seguida, foi retirada a água com auxílio de micropipeta e, então, os nematódeos foram incubados em termobloco a 56° C durante 5 minutos, a fim de retirar o excesso de etanol e água restantes.
- Após retirar a amostra do termobloco, foram adicionados 50 µL da solução de lise T1. Os nematódeos foram então macerados com auxílio de pistilos adaptados aos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Após, foram adicionados mais 40 µL de T1 (totalizando 90 µL) e 15 µL de Proteinase K, e então as amostras foram agitadas e centrifugadas a 2.500 rpm. As amostras foram incubadas a 56 °C durante a noite, de 14 – 16h (*overnight*).
- Após *overnight*, foram adicionados 100 µL do tampão B3. As amostras foram então agitadas, centrifugadas a 2.500 rpm e incubadas a 70 °C durante 10 minutos. Terminado o tempo de incubação, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente a fim de esfriar. Foram, então, adicionados 230 µL de etanol absoluto e as amostras foram agitadas e centrifugadas a 2.500 rpm.
- Todo o conteúdo das misturas foi adicionado cuidadosamente às colunas de filtragem encaixadas sobre tubos coletores de 2,0 mL, que foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, os tubos coletores contendo filtrado foram descartados e novos tubos coletores foram acoplados às colunas.
- Para lavagem do DNA, foram adicionados 500 µL do tampão BW às colunas, que foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto. Após, o filtrado presente nos tubos coletores foi descartado e foram adicionados 500 µL tampão B5 à coluna. Foi realizada uma centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a amostra foi centrifugada novamente a 14.000 rpm por 3 minutos.
- Após a última centrifugação, novos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, identificados foram acoplados às colunas e, então, adicionados 30 µL de tampão BE, a fim de eluir o DNA. Então, as amostras foram mantidas a

temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto.
O DNA isolado foi armazenado a -20 °C.

8.2 Anexo 1 – Tabela de medidas de *Aspidodera railieti*

Tabela 24: Comparação morfométrica (mm) dos espécimes machos de *Aspidodera railieti* provenientes de cada localidade estudada e os descritos na literatura.

	MAM/PB	SRT/PB	CAR/ ES	PET/RJ	RIO/RJ	PTY/RJ	SGS/MG	CUR/PR	SAI/SC	POA/RS	Chagas- Moutinho, 2007	Santos et al., 1990	Vicente, 1966	Proença, 1937
Corpo compr. X larg.	3,79 - 5,37 (4,59)	3,55 - 5,39 (4,70)	4,24	4 - 5,18 (4,4)	4 - 5,24 (4,49)	3,16 - 6,71 (4,88)	3,95 - 6,39 (4,86)	3,87 - 5,89 (4,7)	4,05 - 7 (5,74)	4,82 - 5,66 (5,22)	5,5 - 8,51	2,99 - 10,31	6,34 - 6,82	5,5 - 5,6
Esôfago	0,24 - 0,34 (0,28)	0,18 - 0,34 (0,24)	0,29	0,24 - 0,5 (0,32)	0,18 - 0,32 (0,24)	0,18 - 0,26 (0,22)	0,32 - 0,47 (0,37)	0,21 - 0,42 (0,31)	0,24 - 0,45 (0,35)	0,21 - 0,37 (0,27)	0,30 - 0,38	0,15 - 0,61	0,31 - 0,39	0,31 - 0,34
Anel nervoso	0,84 - 0,93 (0,88)	0,8 - 1,04 (0,9)	0,76	0,81 - 0,91 (0,86)	0,74 - 0,96 (0,85)	0,78 - 1,16 (0,9)	0,8 - 0,97 (0,88)	0,77 - 0,97 (0,87)	0,65 - 0,97 (0,88)	0,82 - 1,09 (0,95)	0,92 - 1,76	0,59 - 1,24	0,89 - 0,98	1 - 1,2
Poros excretor	0,32 - 0,38 (0,35)	0,27 - 0,39 (0,35)	0,34	0,34 - 0,43 (0,37)	0,26 - 0,43 (0,34)	0,26 - 0,47 (0,35)	0,3 - 0,41 (0,36)	0,33 - 0,46 (0,39)	0,28 - 0,45 (0,37)	0,23 - 0,44 (0,36)	-	0,25 - 0,42	0,38 - 0,40	0,59 - 0,60
Espículos	0,46 - 0,56 (0,5)	0,47 - 0,61 (0,53)	0,48	0,45 - 0,59 (0,51)	0,44 - 0,61 (0,53)	0,37 - 0,64 (0,52)	0,4 - 0,61 (0,52)	0,46 - 0,67 (0,56)	0,38 - 0,68 (0,55)	0,45 - 0,64 (0,56)	-	0,39 - 0,73	0,51 - 0,63	0,60 - 0,61
Ventosa compr. X larg.	0,71 - 0,9 (0,77)	0,66 - 0,88 (0,78)	0,67	0,67 - 0,85 (0,77)	0,64 - 0,87 (0,76)	0,63 - 0,84 (0,76)	0,7 - 0,9 (0,82)	0,7 - 0,96 (0,83)	0,64 - 0,95 (0,81)	0,8 - 1 (0,93)	0,80 - 0,92	0,55 - 1,04	0,80 - 0,84	0,8 - 1
Gub.	0,08 - 0,09 (0,08)	0,06 - 0,1 (0,08)	0,05	0,08 - 0,09 (0,08)	0,05 - 0,08 (0,06)	0,05 - 0,08 (0,06)	0,09 - 0,12 (0,10)	0,07 - 0,11 (0,09)	0,07 - 0,11 (0,09)	0,08 - 0,1 (0,09)	-	0,06 - 0,12	0,06 - 0,08	0,10 - 0,11
Projeção digitiforme	0,03 - 0,05 (0,04)	0,02 - 0,04 (0,03)	0,03	0,03 - 0,04 (0,03)	0,02 - 0,05 (0,03)	0,02 - 0,03 (0,03)	0,03 - 0,04 (0,03)	0,02 - 0,04 (0,03)	0,02 - 0,05 (0,03)	0,03 - 0,04 (0,19)	-	-	-	-
Cloaca	0,13 - 0,2 (0,17)	0,13 - 0,2 (0,18)	0,18	0,16 - 0,2 (0,19)	0,12 - 0,18 (0,15)	0,1 - 0,2 (0,15)	0,15 - 0,21 (0,18)	0,15 - 0,21 (0,18)	0,13 - 0,21 (0,18)	0,14 - 0,22 (0,19)	0,08 - 0,19	0,11 - 0,19	0,16 - 0,18	0,12 - 0,13
Coifa compr. X larg.	0,04 - 0,05 (0,05)	0,03 - 0,06 (0,05)	0,03	0,04 - 0,07 (0,05)	0,04 - 0,06 (0,05)	0,04 - 0,07 (0,05)	0,02 - 0,06 (0,05)	0,04 - 0,07 (0,05)	0,04 - 0,07 (0,06)	0,03 - 0,06 (0,05)	-	-	0,04 - 0,05	0,035 - 0,04
Coifa compr. X larg.	0,3 - 0,42 (0,36)	0,27 - 0,48 (0,40)	0,34	0,03 - 0,44 (0,36)	0,28 - 0,45 (0,35)	0,34 - 0,45 (0,4)	0,37 - 0,59 (0,46)	0,34 - 0,51 (0,43)	0,33 - 0,6 (0,48)	0,42 - 0,55 (0,48)	0,50 - 0,52	0,24 - 0,50	0,32 - 0,39	0,32 - 0,34
Coifa compr. X larg.	0,10 - 0,12 (0,11)	0,10 - 0,13 (0,11)	0,10	0,12 - 0,14 (0,13)	0,1 - 0,13 (0,10)	0,09 - 0,11 (0,10)	0,13 - 0,16 (0,15)	0,11 - 0,16 (0,14)	0,12 - 0,15 (0,13)	0,11 - 0,13 (0,12)	-	0,09 - 0,19	0,10 - 0,11	0,14 - 0,15
Coifa compr. X larg.	0,09 - 0,11 (0,1)	0,09 - 0,11 (0,1)	0,09	0,1 - 0,13 (0,11)	0,08 - 0,1 (0,09)	0,08 - 0,1 (0,09)	0,12 - 0,14 (0,13)	0,10 - 0,14 (0,12)	0,09 - 0,13 (0,11)	0,1 - 0,13 (0,11)	-	-	-	-

Continuação da Tabela 24

Cordão cefálico	0,05 - 0,07 (0,06)	0,05 - 0,08 (0,06)	0,045	0,07 - 0,09 (0,08)	0,05 - 0,07 (0,06)	0,05 - 0,06 (0,06)	0,08 - 0,1 (0,09)	0,07 - 0,11 (0,09)	0,06 - 0,1 (0,08)	0,05 - 0,08 (0,07)	-	0,05 - 0,11	-	-
Razão														
Coifa x esôfago	1:8	1:8	1:8	1:6	1:8	1:9	1:6	1:6	1:7	1:8	-	-	-	-
Bulbo compr. X larg.	0,2 - 0,22 (0,21)	0,18 - 0,20 (0,2)	0,18	0,15 - 0,25 (0,19)	0,17 - 0,24 (0,19)	0,17 - 0,22 (0,2)	0,17 - 0,25 (0,2)	0,18 - 0,24 (0,2)	0,19 - 0,25 (0,22)	0,17 - 0,25 (0,20)	0,22 - 0,27	0,15 - 0,28	0,21 - 0,25	-
	0,17 - 0,20 (0,18)	0,11 - 0,19 (0,17)	0,17	0,14 - 0,2 (0,17)	0,14 - 0,19 (0,16)	0,12 - 0,16 (0,14)	0,16 - 0,21 (0,18)	0,10 - 0,20 (0,16)	0,14 - 0,21 (0,17)	0,12 - 0,2 (0,17)	-	0,11 - 0,23	0,16 - 0,21	-

* Gub. = Gubernáculo; compr. = comprimento; larg. = largura.

Tabela 25: Comparação morfométrica (mm) dos espécimes fêmeas de *Aspidodera raillieti* provenientes de cada localidade estudada e os descritos na literatura.

	MAM/PB	SRT/PB	CAR/ ES	PET/RJ	RIO/RJ	PTY/RJ	SGS/MG	CUR/PR	SAI/SC	POARS	Chagas- Moutinho, 2007	Santos et al., 1990	Vicente, 1966	Proença, 1937
Corpo compr.	4,24 - 6,63 (5,63)	3,95 - 6,66 (5,37)	6,16	4,66 - 6,68 (5,8)	4,82 - 6,18 (5,47)	4,66 - 6,76 (5,6)	5,18 - 7,5 (5,9)	4,26 - 7,24 (6,23)	5,53 - 7,55 (6,4)	4,82 - 6,34 (5,71)	5,97 - 7,78	5,01 - 12,32	5,73 - 6,52	6 - 6,3
X larg.	0,26 - 0,61 (0,43)	0,26 - 0,47 (0,38)	0,5	0,26 - 0,47 (0,4)	0,26 - 0,45 (0,36)	0,16 - 0,42 (0,3)	0,32 - 0,58 (0,46)	0,34 - 0,63 (0,52)	0,37 - 0,61 (0,48)	0,34 - 0,5 (0,39)	0,46 - 0,57	0,28 - 0,81	0,34 - 0,42	0,43 - 0,45
Esôfago	0,88 - 1,12 (1,03)	0,81 - 1,1 (1)	0,96	0,94 - 1,18 (0,99)	0,88 - 1,22 (0,96)	0,85 - 1,12 (0,97)	0,88 - 1,07 (0,99)	0,8 - 1,14 (0,98)	0,87 - 1,13 (0,98)	1 - 1,2 (1,09)	0,82 - 1,30	0,70 - 1,43	0,81 - 1,10	1,1 - 1,5
Anel nervoso	0,28 - 0,45 (0,36)	0,32 - 0,44 (0,36)	0,3	0,31 - 0,4 (0,36)	0,22 - 0,47 (0,36)	0,26 - 0,46 (0,38)	0,31 - 0,48 (0,39)	0,22 - 0,49 (0,4)	0,28 - 0,43 (0,36)	0,21 - 0,45 (0,38)	-	0,30 - 0,46	0,37 - 0,42	0,60 - 0,61
Poros excretor	0,44 - 0,66 (0,52)	0,48 - 0,64 (0,55)	0,46	0,45 - 0,6 (0,52)	0,48 - 0,65 (0,54)	0,4 - 0,67 (0,58)	0,44 - 0,64 (0,54)	0,38 - 0,66 (0,56)	0,46 - 0,63 (0,54)	0,47 - 0,62 (0,55)	-	0,43 - 0,99	0,53 - 0,57	0,59 - 0,62
Vulva	1,58 - 2,89 (2,18)	1,5 - 2,82 (2,19)	1,89	1,82 - 2,5 (2,2)	1,82 - 3,58 (2,8)	2,32 - 3,87 (3,05)	1,68 - 2,47 (2,13)	1,53 - 3,84 (2,27)	1,87 - 2,84 (2,34)	2,03 - 3,34 (2,5)	3,79 - 3,94	1,80 - 6,26	2,45 - 3,30	2,36 - 2,49
Ânus	0,87 - 1,32 (1,08)	0,71 - 1,18 (0,98)	1,05	1 - 1,34 (1,16)	0,74 - 1,07 (0,91)	0,76 - 1,05 (0,92)	1 - 1,39 (1,19)	0,97 - 1,39 (1,23)	0,92 - 1,34 (1,14)	0,79 - 1,18 (0,98)	1,04 - 1,3	0,58 - 1,38	0,82 - 0,98	0,92 - 1,1
Coifa compr.	0,11 - 0,17 (0,14)	0,12 - 0,15 (0,13)	0,12	0,13 - 0,16 (0,15)	0,11 - 0,13 (0,12)	0,1 - 0,15 (0,12)	0,15 - 0,19 (0,17)	0,11 - 0,19 (0,15)	0,15 - 0,17 (0,15)	0,13 - 0,16 (0,15)	0,14 - 0,17	0,09 - 0,19	0,10 - 0,12	0,14 - 0,16
X larg.	0,11 - 0,16 (0,13)	0,11 - 0,14 (0,13)	0,14	0,11 - 0,15 (0,13)	0,1 - 0,13 (0,12)	0,1 - 0,14 (0,11)	0,13 - 0,16 (0,15)	0,13 - 0,17 (0,14)	0,12 - 0,15 (0,14)	0,12 - 0,16 (0,13)	-	-	-	-
Cordão cefalico	0,06 - 0,09 (0,08)	0,07 - 0,08 (0,07)	0,07	0,08 - 0,11 (0,09)	0,06 - 0,1 (0,07)	0,05 - 0,1 (0,07)	0,09 - 0,11 (0,10)	0,08 - 0,12 (0,1)	0,07 - 0,11 (0,09)	0,07 - 0,09 (0,08)	-	0,05 - 0,14	-	-
Razão Coifa x esôfago	1:7	1:8	1:8	1:7	1:8	1:8	1:6	1:6	1:6	1:7	-	-	-	-
Bulbo compr.	0,19 - 0,33 (0,24)	0,15 - 0,24 (0,21)	0,22	0,18 - 0,23 (0,21)	0,19 - 0,25 (0,21)	0,2 - 0,24 (0,22)	0,22 - 0,26 (0,24)	0,18 - 0,28 (0,23)	0,21 - 0,32 (0,25)	0,22 - 0,29 (0,24)	0,25 - 0,31	0,18 - 0,29	0,29 - 0,24	0,20 - 0,21
X larg.	0,18 - 0,28 (0,21)	0,13 - 0,21 (0,18)	0,21	0,16 - 0,22 (0,20)	0,15 - 0,23 (0,19)	0,15 - 0,21 (0,17)	0,15 - 0,22 (0,20)	0,17 - 0,23 (0,2)	0,17 - 0,24 (0,2)	0,16 - 0,24 (0,2)	-	0,14 - 0,27	0,16 - 0,22	-

* compr. = comprimento; larg. = largura.