

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA



Tese

**Helmintos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae)
do sul do Brasil**

Thainá Dutra Vieira

Pelotas, 2020

Thainá Dutra Vieira

**Helminhos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae)
do sul do Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (área do conhecimento: Parasitologia).

Orientador: Profa. Dra. Gertrud Müller Antunes

Coorientadora: Profa. Dra. Marcia Raquel Pegoraro de Macedo

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

V657h Vieira, Thainá Dutra

Helminhos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil / Thainá Dutra Vieira ; Gertrud Müller, orientadora ; Marcia Raquel Pegoraro de Macedo, coorientador. — Pelotas, 2020.

137 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. *Salvator merianae*. 2. Parasitos. 3. Nematoda. 4. Acanthocephala. 5. Dna ribossômico. 6. Lagarto. 7. Teiú. 8. Trematoda. I. Müller, Gertrud, orient. II. Macedo, Marcia Raquel Pegoraro de, coorient. III. Título.

CDD : 598.112

Thainá Dutra Vieira

**Helminhos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae)
do sul do Brasil**

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (área do conhecimento: Parasitologia), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas

Data da defesa: 29/06/2020

Banca examinadora:

Profa. Dra. Gertrud Müller Antunes (Orientadora)

Profa. Dra. Marcia Raquel Pegoraro de Macedo (Coorientadora)

Profa. Dra. Maria João Faria Leite Dias dos Santos (Coorientadora exterior/PDSE)
(Universidade do Porto)

Prof. Dr Marco Antônio Tonus Marinho (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr Tiago Gallina Corrêa (Universidade Federal do Pampa)

Profa. Dra. Camila Belmonte Oliveira (Universidade Federal de Pelotas)

Agradecimentos

À Deus, pela vida, saúde, bençãos, por sempre me guiar e me proteger pelo caminho.

À minha amada família, à cada um em especial. Vocês são minha base, sempre me deram amor, educação e suporte para seguir em frente e conquistar cada vitória. Obrigada pela dedicação, paciência, pelo carinho e aconchego, eu amo vocês!

Ao meu amor e companheiro de vida Jeferton que sempre me apoiou e embarcou comigo para umas das maiores aventuras da vida, o doutorado sanduíche (PDSE) em Portugal. Por ser meu porto seguro em todas as situações, foste suporte quando eu mais temia desistir.

À minha amada e saudosa Vó Genecy (*in memoriam*). Exemplo de amor, de força e coragem. Obrigada por me ensinar tanto, e por cuidar de mim!

À professora Gertrud Müller, pela oportunidade, por todo aprendizado, pela experiência compartilhada e incentivo para sempre alçar novos voos.

À Dra. Marcia Macedo, pela coorientação, pelos ensinamentos, ajuda e todo apoio de sempre.

À Dra. Fabiana Fedatto, minha colega e amiga, que além de incentivar na realização deste trabalho colaborou sempre sem medir esforços. Obrigada!

Às minhas queridas amigas, companheiras de estudos e da vida, Mirian Bruni e Alice Suárez, as quais os momentos de aprendizado são sempre intercalados com confraternização. Obrigada por caminharem ao meu lado!

À professora Maria João Santos que me acolheu na Universidade do Porto em Portugal, durante o PDSE. Obrigada pelos ensinamentos e pela grande oportunidade!

Ao Dr Luís Rangel que compartilhou comigo seus conhecimentos no Laboratório de Patologia Animal da UPorto, obrigada pela companhia, disponibilidade e ajuda.

À Dra. Carolina Mascarenhas pela ajuda na identificação das larvas de *Dioctophyme renale*.

Ao professor Marco Marinho por toda ajuda e ensinamentos sobre os métodos filogenéticos.

Aos professores da banca, pela disponibilidade, tempo e pelas considerações feitas.

Aos amigos, colegas e professores do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres e do PPGMPar pelo convívio e troca de aprendizados ao longo dos últimos seis anos.

Ao Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre pela doação dos lagartos.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia pela oportunidade e crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo financiamento e realização de um sonho, concluir o doutorado e participar do PDSE, oportunizando crescimento profissional, pessoal e cultural.

Aos amigos brasileiros que o PDSE me deu a oportunidade de conhecer, Natalie Dantas, Daniel Martins, Márcio Carvalho, Nicolás Belete, Célia Araújo, e os portugueses Armando e Arminda Peneda e Pedro Vale. Obrigada pela convivência, vocês foram nossa família em Portugal.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram e torceram para a conclusão desse trabalho.

Obrigada!!

“Isso também passa”

Chico Xavier

Nota ao leitor

A presente tese contempla as atividades desenvolvidas durante a realização de meu doutorado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia na Universidade Federal de Pelotas (início março/2016). Parte do estudo foi desenvolvida em período de mobilidade realizado no exterior por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (Edital nº47/2017 PDSE) na Universidade do Porto, Porto, Portugal (novembro de 2018 a maio de 2019). O documento está organizado em formato de capítulos, seguindo as normas da instituição, sendo composto por uma introdução geral, dois capítulos, conclusões e considerações finais. Na introdução geral são abordados tópicos sobre parasitismo, taxonomia de parasitos/helmintos, biologia do hospedeiro, revisão de literatura, e os objetivos. Cada capítulo apresenta sua seção de material e métodos correspondente.

No primeiro capítulo são apresentados os resultados dos estudos e procedimentos realizados para identificação morfológica dos helmintos encontrados no hospedeiro. O segundo capítulo trata sobre a caracterização molecular de alguns helmintos, realizados no Brasil e parte em Portugal. Nas considerações finais são apresentadas as principais contribuições do estudo, e sugestões para estudos futuros. Nos apêndices estão inseridas três divulgações científicas sobre o presente estudo, duas já publicadas e uma sob revisão. Ao final do documento, também nos apêndices, encontra-se um artigo que não constituirá o corpo da tese. Nele são apresentados os resultados do projeto intitulado: "Identificação morfológica e molecular de helmintos de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Parechinidae) do Porto, Portugal" que foi realizado paralelamente à tese durante o período de mobilidade (Código Financeiro 001/PDSE/EditalNº 47-2017/CAPES). Este ainda será traduzido para língua inglesa e submetido à revista *Parasitology Research* após as considerações da banca. Algumas das normas exigidas pelos periódicos para os manuscritos do apêndice C e D foram adaptadas para tornar a leitura do texto fluida, como por exemplo, as figuras e as tabelas foram montadas com suas respectivas legendas.

Resumo

VIEIRA, Thainá Dutra. **Helmintos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil**. 2020. 137f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Salvator merianae é um lagarto amplamente distribuído na América do Sul, no entanto dados sobre parasitos associados ao lagarto são escassos para a região Sul do Brasil. Sendo assim, este estudo teve como objetivo investigar a fauna helmíntica de *S. merianae* proveniente da região sul do Brasil, e realizar a identificação morfológica e caracterização molecular dos helmintos encontrados. Foram examinados 47 espécimes, coletados de quatro municípios do Rio Grande do Sul. Os helmintos foram identificados com base na morfologia e morfometria, e o DNA genômico de três espécies foi extraído para caracterização molecular a partir de marcadores de DNA ribossômicos (18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S). Os índices parasitológicos de prevalência (P%), abundância média de infecção (AM) e intensidade média de infecção (IM) foram estimados para cada espécie de helminto encontrada. Do total de lagartos examinados 93,6% estavam parasitados por pelo menos uma espécie de helminto. Foram encontradas quatro espécies de Nematoda: *Diaphanocephalus galeatus* (Diaphanocephalidae), *Cruzia brasiliensis* (Kathlanidae), *Physaloptera tupinambae* (Physalopteridae) e *Dioctophyme renale* (larvas de terceiro estágio) (Dioctophymatidae), uma espécie de Trematoda: *Brachylaima* sp. (forma imatura) (Brachylaimidae) e uma espécie de Acanthocephala: *Centrorhynchus* sp. (forma imatura) (Centrothynchidae). *D. galeatus* foi a espécie mais prevalente (P=85,1%), seguida de *P. tupinambae* (P=53,2%) e *C. brasiliensis* (P=46,8%) respectivamente. Registra-se pela primeira vez em *S. merianae*: *C. brasiliensis*, *D. renale* (larvas de terceiro estágio) e formas imaturas de *Brachylaima* sp e *Centrorhynchus* sp. Também pela primeira vez foram obtidas sequências de DNA ribossômico de *D. galeatus*, *C. brasiliensis* e *P. tubinambae* provenientes de *S. merianae*. Árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de Máxima verossimilhança e inferência Bayesiana, e com base nos dados moleculares as espécies tiveram seu posicionamento taxonômico inferido em seus respectivos *taxa*. Com a realização deste estudo dados moleculares são fornecidos para *D. galeatus*, *C. brasiliensis* e *P. tubinambae* parasitos de *S. merianae* complementando os já existentes e ampliando o conhecimento sobre a helmintofauna associada ao lagarto.

Palavras-chave: *Salvator merianae*. lagarto. teiú. parasitos. Nematoda. Trematoda. Acanthocephala. DNA ribossômico.

Abstract

VIEIRA, Thainá Dutra. **Helminths of *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) from the south of Brazil.** 2020. 137f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Salvator merianae is a lizard widely distributed in South America, however data about parasites associated with the lizard are scarce for the southern region of Brazil. Thus, this study aimed to investigate the helminth fauna of *S. merianae* from the Southern region of Brazil, and to do morphological and molecular identification to helminths found. Forty-seven specimens, collected from four municipalities in Rio Grande do Sul, were examined. Helminths were identified based on morphology and morphometry, and the genomic DNA of three species was extracted for molecular characterization using ribosomal DNA markers (18S, ITS1, 5.8S, ITS, 28S). The parasitological indices of prevalence (P%), mean abundance of infection (MA) and mean intensity of infection (MI) were estimated for each species of helminth found. Of the total lizards examined, 93.6% were parasitized by at least one species of helminth. A total of four Nematoda species were found: *Diaphanocephalus galeatus* (Diaphanocephalidae), *Cruzia brasiliensis* (Kathlanidae), *Physaloptera tupinambae* (Physalopteridae) and *Diocetophyme renale* (third stage larvae) (Diocetophymatidae), one Trematoda species: *Brachylaima* sp. (immature form) (Brachylaimidae) and one Acanthocephala species: *Centrorhynchus* sp. (immature form) (Centrothynchidae). *D. galeatus* was the most prevalent species (P=85.1%), followed by *P. tupinambae* (P=53.2%) and *C. brasiliensis* (P=46.8%) respectively. It is registered for the first time in *S. merianae*: *C. brasiliensis*, *D. renale* (third stage larvae) and immature forms of *Brachylaima* sp and *Centrorhynchus* sp. Also for the first time, ribosomal DNA sequences from *D. galeatus*, *C. brasiliensis* and *P. tubinambae* from *S. merianae* were obtained. Phylogenetic trees were built using the Maximum Likelihood and Bayesian Inference methods, and based on molecular data, the species had their taxonomic position inferred in their respective taxa. With the realization of this study, molecular data are provided for the *D. galeatus*, *C. brasiliensis* and *P. tubinambae* parasites of *S. merianae*, complementing the existing ones and expanding the knowledge about the helminth fauna associated with the lizard.

Keywords: *Salvator merianae*. lizard. black and white tegu. parasites. Nematoda. Trematoda. Acanthocephala. Ribosomal DNA.

Lista de figuras

Introdução

- Figura 1** Diagrama esquemático do cluster do DNA ribossômico mostrando a posição dos genes 18S, 5.8S e 28S, separados pelos espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2..... 19
- Figura 2** *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae). Fonte: Fotografia realizada e cedida por Bernardon, F. F. (2017)..... 20
- Figura 3** Distribuição geográfica de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) no Brasil..... 21
- ### Capítulo 1
- Figura 1** Localização dos municípios de Pelotas (31°46'19"S 52°20'33"W), Capão do Leão (31°46'3"S 52°26'55"W), Morro Redondo (31°35'18"S 52°37'47"W) e Rio Grande (32°1'60"S 52°5'55"W) onde foram coletados os espécimes de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil..... 30
- Figura 2** Espécime de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) em necropsia para pesquisa de helmintos no sul do Brasil. **a)** vista dorsal; **b)** vista ventral, mostrando a incisão realizada durante a necropsia..... 32
- Figura 3** *Diaphanocephalus galeatus* (Rudolphi, 1819) (Diaphanocephalidae), encontrado no estômago, intestino delgado e grosso de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** vista lateral da região

anterior; **b)** lábio vulvar da fêmea situado próximo à região posterior do corpo, seta indica o ovo dentro do ovejeter; **c)** região posterior do macho, setas indicam os espículos;. **d)** macho e fêmea em cópula, região posterior de ambos..... 36

Figura 4 *Physaloptera tupinambae* Pereira, Alves, Rocha, Lima & Luque, 2014 (Physalopteridae) encontrado no estômago de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** região anterior; **b)** região posterior da fêmea; **c)** região posterior do macho; **d)** detalhe das papilas cloacais do macho; **e-f)** parasito com a porção anterior aderida na mucosa do estômago do hospedeiro, a seta indica a região anterior..... 38

Figura 5 *Cruzia brasiliensis* Costa, 1965 (Kathlaniidae) encontrado no intestino grosso e ceco de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** região anterior, setas apontam o divertículo intestinal (DI) e o bulbo esofágico (B); **b)** região anterior, destaque dos três lábios; **c)** região anterior, setas apontam para as estruturas semelhantes a dentes presente na faringe, **d)** porção equatorial da fêmea, seta aponta para a vulva; **e)** detalhe dos ovos com casca espessa e rugosa; **f)** região posterior da fêmea, seta aponta o ânus; **g)** região posterior do macho, seta aponta o gubernáculo; **h)** detalhe cloaca do macho, seta aponta papila não pareada..... 42

Figura 6 *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Dioctophymatidae) (larvas terceiro estágio) encontradas na membrana estomacal e superfície dos rins de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** região anterior da larva, setas indicam as papilas cervicais; **b)** fêmea de *D. renale*, setas apontam para o primórdio vulvar próximo a junção do esôfago(E) e intestino(IN); **c)** detalhe do primórdio vulvar da fêmea; **d)** região

	posterior do macho, setas apontam para o primórdio genital; e) região posterior da fêmea; e) parasitos encistados na serosa estomacal.....	45
Figura 7	<i>Brachylaima</i> sp. (Brachylaimidae)(forma imatura) encontrado no intestino delgado e grosso de <i>Salvator merianae</i> (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. a) espécime de <i>Brachylaima</i> sp.; b) primeiro terço do corpo, ventosa oral (VO), faringe (F) e acetábulo (A); c) segundo terço do corpo, poro genital (PG), testículos (T), ovário (OV), setas indicam os cecos.....	48
Figura 8	<i>Centrorhynchus</i> sp. (Centrorhynchidae) (forma imatura) encontrado no intestino delgado e grosso de <i>Salvator merianae</i> (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. a) espécime de <i>Centrorhynchus</i> sp.; b) região anterior com detalhe da probóscide e dos ganchos.....	50
Capítulo 2		
Figura 1	Diagrama esquemático dos primers utilizados para amplificar cada região do cluster do DNA ribossômico (DNAr).....	56
Figura 2	(a) Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança com base na região 18S DNAr de <i>Diaphanocephalus. galeatus</i> e outras espécies de Strongylida; (b) Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima verossimilhança com base na região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) de <i>D. galeatus</i> e outras espécies de Strongylida. Os valores nos nós representam os valores de bootstrap e as probabilidades Bayesianas posteriores, respectivamente. Traços indicam nós não presentes nas árvores de Inferência Bayesiana.....	61

- Figura 3** Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança com base na região 18S e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNAr *Cruzia brasiliensis* e outros representantes de Ascaridida. Os valores nos nós representam os valores de bootstrap..... 63
- Figura 4** Relações filogenéticas estimadas por Inferência Bayesiana com base na região 18S e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNAr de *Cruzia brasiliensis* e representantes de Ascaridida. Os valores nos nós representam os valores das probabilidades Bayesianas..... 63
- Figura 5** Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança com base na região 18S DNAr de *Physaloptera tupinambae* e outros representantes de Physalopteridae. *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 (Gnathostomatidae) foi utilizado como grupo externo. Os valores nos nós representam os valores de bootstrap..... 65
- Figura 6** Relações filogenéticas estimadas por Inferência Bayesiana com base na região 18S DNAr de *Physaloptera tupinambae* e outros representantes de Physalopteridae. *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 (Gnathostomatidae) foi utilizado como grupo externo. Os valores nos nós representam os valores das probabilidades Bayesianas..... 66

Lista de tabelas

Introdução

Tabela 1	Helminhos registrados em <i>Salvator merianae</i> (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) no Brasil, seus respectivos sítios de infecção, localidade de registro e referências.....	23
-----------------	--	----

Capítulo 1

Tabela 1	Helminhos parasitos de <i>Salvator merianae</i> (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil e seus respectivos sítios de infecção (SI), prevalência (P%), abundância média (AM), intensidade média de infecção (IM) e amplitude de infecção (Ax).....	33
-----------------	---	----

Tabela 2	Comparação entre os dados morfológicos e morfométricos dos espécimes de <i>C. brasiliensis</i> de <i>Salvator merianae</i> do presente estudo com espécimes de <i>C. brasiliensis</i> e <i>C. americana</i> em suas descrições originais.....	40
-----------------	---	----

Capítulo 2

Tabela 1	Primers utilizados para realização da PCR	57
-----------------	---	----

Sumário

1 Introdução	16
1.1 Parasitismo	16
1.2 Taxonomia integrativa: contribuição da biologia molecular nos estudos parasitológicos	17
1.3 <i>Salvator merianae</i> (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae).....	19
1.4 Helminhos parasitos de <i>Salvator merianae</i>	22
2 Objetivos	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
Capítulo 1: Helminhos parasitos de <i>Salvator merianae</i> (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil	27
1 Introdução	28
2 Material e métodos	29
2.1 Coleta e caracterização dos hospedeiros.....	29
2.2 Coleta, preparo e identificação morfológica dos parasitos	31
3 Resultados e discussão	32
3.1 Helminhos de <i>Salvator merianae</i>	34
3.1.1 Filo Nematoda.....	34
3.1.2 Filo Platyhelminthes.....	46
3.1.3 Filo Acanthocephala	49
4 Conclusão	51
Capítulo 2: Caracterização molecular e análises filogenéticas de <i>Diaphanocephalus galeatus</i>, <i>Physaloptera tupinambae</i> e <i>Cruzia brasiliensis</i> (Nematoda) parasitos de <i>Salvator merianae</i> (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil	52
1 Introdução	53

2	Material e métodos	54
2.1	Coleta e caracterização molecular dos hospedeiros	54
2.1.1	Extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	55
2.1.2	Extração de DNA com kit comercial e PCR.....	56
3	Resultados e discussão	59
3.1	<i>Diaphanocephalus galeatus</i>	59
3.2	<i>Cruzia brasiliensis</i>	62
3.3	<i>Physaloptera tupinambae</i>	64
4	Conclusões	66
	Conclusões gerais	67
	Considerações finais	68
	Referências	69
	Apêndices	84
	Apêndice A - <i>Diaphanocephalus galeatus</i> (Nematoda: Diaphanocephalidae), parasite of <i>Salvator merianae</i> (Squamata: Teiidae) in southern Brazil.....	85
	Apêndice B - First record of <i>Brachylaima</i> (Trematoda: Brachylaimidae) in <i>Salvator merianae</i> (Squamata: Teiidae).	90
	Apêndice C – Número dos espécimes testemunhos depositados em coleções	95
	Apêndice D - Morphological, molecular and phylogenetic analyses of <i>Diaphanocephalus galeatus</i> (Nematoda: Diaphanocephalidae). Artigo formatado e submetido à revista Parasitology International.....	97
	Apêndice E – Artigo referente ao projeto desenvolvido durante Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (Edital nº47/2017 PDSE) na Universidade do Porto, Porto, Portugal escrito com a intenção de submissão à revista Parasitology Research	114
	Apêndice F - Formulário para necropsias.....	129
	Anexos	131
	Anexo A - Licença para coleta dos animais atropelados.....	132

1 Introdução

1.1 Parasitismo

Os parasitos estão entre os organismos mais diversos, altamente especializados e que podem atuar como reguladores de populações de hospedeiros, além de manterem a integridade e estabilidade dos ecossistemas (WINDSOR, 1995; BROOKS; HOBERG, 2001). Estima-se que para cada espécie de uma comunidade de animais de vida livre, há pelo menos uma espécie de parasito associada (POULIN, 2000).

Ao extrair recursos de seus hospedeiros, os parasitos os forçam a alterar seu balanço energético, influenciando conseqüentemente em sua aptidão, mesmo na ausência de sinais clínicos de infecção (HUDSON *et al.*, 2002; THOMAS *et al.*, 2009).

Eles podem influenciar uma variedade de atributos do hospedeiro, desde polimorfismo fenotípico e caracteres sexuais secundários, até a manutenção da reprodução sexual, atuando como agentes de seleção natural. Tais efeitos podem direcionar a diversificação biológica, influenciando o isolamento e a especiação reprodutiva do hospedeiro (SUMMERS *et al.*, 2003).

Com base nos conhecimentos da diversidade parasitária presente nos animais silvestres, informações importantes podem ser inferidas, sobre a dieta do hospedeiro e a importância dos parasitos em suas redes alimentares; a ação de parasitos influenciando o comportamento, crescimento e taxa de reprodução do hospedeiro; interações competitivas; seu papel como agentes seletivos, entre outros (HATCHER *et al.*, 2006; SUMMERS *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 2009).

Pesquisas demonstram a importância ecológica e evolutiva da biodiversidade parasitária, e podem auxiliar na compreensão da ecologia, história natural, ciclo de vida e evolução tanto do parasito quanto do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2008.)

Os parasitos podem apresentar ciclos de vida complexos, sendo eles direto (monoxênico), ou indireto (heteroxênico), quando há necessidade de hospedeiro intermediário. Além disso, hospedeiros paratênicos ou de transporte podem participar do ciclo. Nestes, o parasito não se desenvolve, mas permanece encistado até que seja ingerido pelo hospedeiro definitivo (NEVES, 2016).

Os lagartos são hospedeiros para uma ampla variedade de parasitos, que podem ser adquiridos por ingestão de presas infectadas e material vegetal contaminado, coprofagia, geofagia ou penetração ativa de larvas (ANDERSON, 2000).

Estudos realizados com lagartos na América do Sul demonstraram que estes abrigam várias espécies de parasitos, a maioria nematoides (ÁVILA, 2009; ÁVILA; SILVA 2010; 2011; ÁVILA *et al.*, 2011; 2012; 2013; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). Nos últimos anos, estudos relacionados à ecologia do parasitismo com lagartos, bem como a elaboração de listas taxonômicas e descrição de novas espécies têm aumentado, porém a maior parte dessa informação refere-se à região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (ÁVILA, 2009).

Para a região Sul e Bioma Pampa estudos helmintológicos com lagartos são escassos, o conhecimento sobre a diversidade parasitária associada à *Salvator merianae* é quase inexistente. Considerando a distribuição e ocorrência de *S. merianae* em grande parte do território brasileiro, este estudo contribui para ampliar com o conhecimento da helmintofauna associada a espécie, auxiliando no preenchimento da lacuna existente sobre dados parasitológicos desse hospedeiro na região.

1.2 Taxonomia integrativa: contribuição da biologia molecular nos estudos parasitológicos

A taxonomia clássica de helmintos é fundamentada em características morfológicas e morfométricas, baseando-se em medições e comparação de estruturas

(MOURA, 2006). Entretanto essa forma de identificação clássica tem induzido à necessidade de introdução de outros métodos de análise e ferramentas.

As descrições de táxons baseadas exclusivamente em dados morfológicos podem gerar incertezas taxonômicas na delimitação das espécies. Muitas vezes os organismos apresentam tamanho diminuto, o que dificulta a observação de características determinantes para o diagnóstico em microscopia óptica convencional (LEE, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2009), e até mesmo seu estado de preservação pode acarretar em perda ou dano de estruturas morfológicas importantes para a taxonomia.

Em outros casos, essa dificuldade pode ocorrer entre espécies muito semelhantes ou espécies com grande variabilidade morfológica intraespecífica (HANDOO *et al.*, 2008). Em contrapartida a genética molecular vem inovando no campo das ciências biológicas, possibilitando o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (FREELAND, 2005; TENEVA, 2009).

O crescente conhecimento sobre a variabilidade de informações genéticas tem estimulado o uso de marcadores moleculares de DNA, em conjunto com dados morfológicos, para inferir o relacionamento filogenético de diversos táxons. Reconstruções filogenéticas baseadas em dados moleculares podem ser inferidas a partir da análise comparativa de sequências homólogas de DNA ou proteínas (LEMEY *et al.*, 2009). Com este progresso uma série de técnicas baseadas em DNA foi desenvolvida para identificação específica e a variação genética de parasitos (HUANG *et al.*, 2012).

O DNA ribossômico (DNAr) tem sido um alvo amplamente utilizado para estudos moleculares e para a investigação de relações filogenéticas entre espécies de helmintos (BLOUIN, 2002). Os ribossomos são considerados alvos úteis em estudos taxonômicos, estudos de diferenciação de espécies e divergência evolucionária porque: i) estão presentes em todos os organismos; ii) seus genes codificam para componentes estruturais; iii) estão presentes em múltiplas cópias, repetidas em tandem e iv) possuem regiões conservadas (18S, 5.8S e 28S) alternadas com regiões altamente variáveis (regiões espaçadoras ITS1 e ITS2) (Figura 1) (HIBBETT, 1992; HILLIS; DIXON, 1991; NOLAN; CRIBB, 2005; POWERS, 2004).



Figura 1 - Diagrama esquemático do cluster do DNA ribossômico mostrando a posição dos genes 18S, 5.8S e 28S, separados pelos espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2

Através de comparações de sequências do gene 18S do DNAr, região mais conservada, estudos com organismos distintamente relacionados são realizados, enquanto que o gene 28S DNAr, é uma região menos conservada. As regiões ITS1 e ITS2 estão flanqueando o gene 5.8S DNAr, que é o menor e menos variável. Geralmente, para as análises moleculares taxonômicas ou filogenéticas regiões parciais do gene 18S e 28S DNAr, e regiões completas do gene 5,8S, ITS1 e ITS2 têm sido as mais utilizadas (WHITE *et al.*, 1990; BLAXTER *et al.* 1998; POWERS, 2004; DE LEY, 2005; GASSER, 2006; KONG *et al.*, 2015).

O uso conjunto de dados genéticos e morfológicos pode contribuir significativamente para a identificação de espécies em relação ao uso de apenas uma das fontes de informação (PIRES, MARINONI, 2010; WILL, *et al.*, 2005). A integração entre dados morfológicos, moleculares e ecológicos criou o conceito de taxonomia integrativa. Segundo Dayrat, (2005) a taxonomia integrativa pode ser a melhor abordagem para ampliar o conhecimento da diversidade dos organismos.

1.3 *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae)

Salvator merianae (Figura 2) conhecido como *argentine black and white tegu* ou teiú é considerado um dos maiores lagartos sul americano, podendo atingir até 50cm de comprimento rostro-cloacal (QUINTELA; LOEBMANN, 2009; SCOTT *et al.*, 2019).

Sua distribuição é restrita à América do Sul, sendo encontrado no leste da Bolívia, Argentina, Paraguai, Uruguai, Brasil (quase todos os estados exceto Acre, Roraima e Amapá, e introduzido em Fernando de Noronha) mas foi introduzido na Flórida (EUA) (COSTA; BÉRNILS, 2018; QUINTELA; LOEBMANN, 2009; SCOTT *et al.*, 2019) (Figura 3).

Possui hábito diurno, habita campos, áreas rochosas e matas, próximo a cursos de água, bem como refúgios próximos às construções humanas. É onívoro, com uma dieta muito variada constituída por frutas, insetos, moluscos, peixes, anfíbios, répteis,

roedores, aves adultas, ninhegos, ovos e carcaças. Sua dieta é considerada por alguns autores como generalista e oportunista (ACHAVAL; OLMOS, 2003; KIEFER; SAZIMA, 2002; MACHADO, 2007; SAZIMA; D'ANGELO, 2013; SILVA; HILLESHEIM, 2004).



Figura 2 - *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae).
Fonte: Fotografia realizada e cedida por Bernardon, F. F. (2017).

O consumo de frutos e sementes dá à espécie papel importante na conservação da composição florística em áreas de mata nativa, uma vez que a maioria das sementes atravessam ilesas o trato digestivo do lagarto tendo sua germinação comprovada após serem excretadas (CASTRO; GALETTI, 2004).

Apresentam dimorfismo sexual, sendo que os machos apresentam papada e pescoço mais desenvolvidos e são maiores do que as fêmeas (ACHAVAL; OLMOS, 2007). Os adultos apresentam coloração preta e branca, enquanto que os juvenis são normalmente mais marrons (ENGE, 2006).



Figura 3 - Distribuição geográfica de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) no Brasil, limites demarcados em verde, e o balão verde em destaque corresponde ao arquipélago de Fernando de Noronha. Fonte: Mapa criado no programa ArcGIS de acordo com Scott *et al.*, (2019) e referências citadas.

Suas atividades apresentam variação sazonal, sendo mais intensas nos meses quentes (outubro, novembro e dezembro) onde é visto com frequência forrageando, e com período de hibernação nos meses frios quando os lagartos se abrigam em tocas devido a diminuição do metabolismo (VAN SLUYS; ROCHA, 1999; CECHIN *et al.*, 2011). Tocas com agrupamentos de até 30 indivíduos foram observadas na Estação Ecológica do Taim (RS/Brasil) por Wink; Cechin, (2008).

Após a hibernação (entre agosto e setembro) começam a emergir das tocas para termorregular. Os machos emergem antes das fêmeas para estabelecer seus territórios. Iniciam a ingestão de água e alimentos e recuperam a massa corpórea,

logo em seguida os adultos já iniciam o período reprodutivo que dura até novembro (ANDRADE *et al.*, 2004). As fêmeas são ovíparas, com ninhadas que podem ser consideradas grandes, variando entre 24 a 49 ovos, e realizam cuidado parental da desova (YANOSKY; MERCOLLI, 1995).

Para fugir de ameaças, o teiú costuma correr rapidamente em busca de uma toca ou abrigo, inflar e elevar o corpo, enfrentar com mordidas e golpes, e podem fazer autotomia caudal (BORGES-MARTINS, *et al.*, 2007; SAZIMA; HADDAD, 1992).

Devido à pressão de caça e comércio que as espécies de *Salvator* Duméril & Bibron, 1839 vêm sofrendo há anos, a exportação e consumo da carne e pele destes animais, fez com que o gênero fosse incluído no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (PORINI, 2006; UNEP-WCMC, 2020).

1.4 Helmintos parasitos de *Salvator merianae*

Em relação aos helmintos parasitos de *S. merianae* foram registradas na literatura dez espécies de nematoides, uma de cestóide e uma de trematódeo, todos realizados no Brasil (ÁVILA; SILVA 2010, 2011; FEDATTO-BERNARDON *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2012, 2014; RAMALHO, *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2017; VIEIRA, *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2020) (Tabela 1).

A maioria dos estudos realizados com helmintos em *S. merianae* apresentam registros de ocorrência ou descrição de novas espécies para o hospedeiro, nenhum inclui dados genéticos ou moleculares. Os estudos moleculares existentes com as espécies que parasitam este lagarto foram realizados com espécimes obtidas de outros hospedeiros.

Recentemente um estudo molecular foi realizado e uma sequência parcial do gene 28S DNAr de *D. galeatus* parasito de *Dracaena paraguayensis* Amaral, 1950 (Squamata: Teiidae) foi disponibilizada representando a primeira caracterização molecular da espécie (PEREIRA *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Helmintos registrados em *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) no Brasil, seus respectivos sítios de infecção, localidade de registro e referências.

Helmintos	Sítio de infecção	Localidade	Referências
Nematoda			
Heterakidae			
<i>Spinicauda spinicauda</i> Olfers, 1819	ID, IG, C	Pernambuco, Mato Grosso e Ceará	RAMALHO <i>et al.</i> , 2009; ÁVILA <i>et al.</i> , 2011
Physalopteridae			
<i>Physaloptera lutzi</i> Cristofaro, Guimarães & Rodrigues, 1976		Pernambuco e Ceará	ÁVILA <i>et al.</i> , 2011; TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2017
<i>Physaloptera retusa</i> Rudolphi, 1819		Mato Grosso	ÁVILA; SILVA, 2011
<i>Physaloptera tupinambae</i> Pereira, Alves, Rocha, Lima & Luque, 2012	EST*	Minas Gerais, Ceará e Sergipe	PEREIRA <i>et al.</i> , 2012; MELO <i>et al.</i> , 2019
<i>Physaloptera binae</i> Pereira, Alves, Rocha, Lima & Luque, 2014		Minas Gerais	PEREIRA <i>et al.</i> , 2014
Diaphanocephalidae			
<i>Diaphanocephalus galeatus</i> (Rudolphi, 1819)	IG, ID*, EST, C	Pernambuco, Mato Grosso, Sergipe, Ceará e Rio Grande do Sul	RAMALHO, <i>et al.</i> , 2009; ÁVILA <i>et al.</i> , 2010; 2011; ÁVILA; SILVA, 2011; VIEIRA <i>et al.</i> , 2016 ¹ ; MELO <i>et al.</i> , 2019
Onchocercidae			
<i>Oswaldofilaria petersi</i> Bain & Sulahian, 1974	I	Pernambuco e Ceará	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2016
Kathlaniidae			
<i>Cruzia travassosi</i> Kalil & Vogelsangi, 1932		Mato Grosso e Goiás	ÁVILA <i>et al.</i> , 2010; 2011; ÁVILA; SILVA, 2011
<i>Cruzia lauroi</i> Vieira, Gonçalves, Lima, Sousa & Muniz-Pereira, 2020	ID, IG*, C	Minas Gerais	VIEIRA <i>et al.</i> , 2020;
<i>Cruzia</i> sp.		Ceará	BRITO <i>et al.</i> , 2014
Trematoda			
Brachylaimidae			
<i>Brachylaima</i> sp.	ID	Rio Grande do Sul	FEDATTO-BERNARDON <i>et al.</i> , (2017) ¹
Cestoda			
Anoplocephalidae			
<i>Oochoristica</i> sp.	ID	Pernambuco	RAMALHO <i>et al.</i> , 2009

¹ – Registros que fazem parte deste estudo (ver Apêndices A e B); *Sítio de infecção mais frequente; intestino (I), intestino delgado (ID), intestino grosso (IG), ceco (C) e estômago (EST).

Oswaldofilaria petersi parasito de *Crocodilurus amazonicus* (Spix, 1825) (Squamata: Teiidae) proveniente do Peru, teve o DNA sequenciado para uma análise de múltiplos *locus* que estabeleceu as relações evolutivas de Onchocercidae, uma família de nematoides filariformes que abrange várias espécies de importância médica ou veterinária (LEFOULON *et al.*, 2015).

Em um estudo sobre a taxonomia morfológica e filogenia molecular de *Physaloptera* (Nematoda: Spirurida), *Physaloptera retusa* parasito de *Tupinambis teguixin* Linnaeus, 1758 (Squamata: Teiidae) do Rio de Janeiro, Brasil, teve duas sequências amplificadas: a subunidade 18S do DNA ribossômico e a subunidade 1 do citocromo c oxidase mitocondrial. O uso combinado dos métodos morfológicos e moleculares auxiliou para a descrição de espécies e caracterização do gênero (BARROS, 2015).

Apenas cinco das mais de 100 espécies de *Centrorhynchus* tiveram caracterização molecular publicada, e oito possuem sequências de DNA depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>), e todas são parasitos de aves oriundos da Argentina, México, China, EUA e Paquistão. *Centrorhynchus nahuelhuapensis* Steinauer, Flores & Rauque, 2019 (Acanthocephala: Centrorhynchidae) parasito de *Strix rufipes* King, 1828 na Patagônia é a primeira a ser estudada por caracterização molecular na América do Sul (STEINAUER, *et al.*, 2019).

Para *Brachylaima* Dujardin, 1843, sequências de 10 espécies estão disponíveis no GenBank, nenhuma de répteis. A maioria é proveniente de moluscos (hospedeiros intermediários) do México, Japão, China, França, e República Checa; duas de mamíferos da China e EUA, e uma de ave nos EUA.

As demais espécies de parasitos registrados para *S. merianae* não possuem estudos genéticos realizados.

Até pouco tempo não havia conhecimento sobre a fauna helmintológica de *S. merianae* na região sul do Brasil e Bioma Pampa. Os primeiros estudos helmintológicos relataram *D. galeatus* (Nematoda) (VIEIRA *et al.*, 2016) e *Brachylaima* sp. (Trematoda) (FEDATTO-BERNARDON *et al.*, 2017) (Apêndices A e B), sendo que este último foi descrito pela primeira vez neste hospedeiro na América do Sul.

Portanto visa-se identificar e realizar a caracterização molecular dos parasitos de teiús provenientes de municípios do Rio Grande do Sul, bem como apresentar os

índices parasitológicos de prevalência, abundância média e intensidade média de infecção.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar a fauna helmíntica de *Salvator merianae* proveniente da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar morfologicamente os helmintos parasitos de *S. merianae*;
- ✓ Calcular prevalência, abundância média e intensidade média de infecção dos helmintos encontrados;
- ✓ Sequenciar os genes 18S e 28S do cluster de DNA ribossômico (DNAr) e a região do espaçador transcrito interno (ITS1-5.8S-ITS2) do mesmo cluster dos helmintos encontrados;
- ✓ Inferir as relações filogenéticas e/ou posição taxonômica dos táxons registrados.

Capítulo 1:

Helmintos parasitos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil

1 Introdução

Estudos parasitológicos sobre helmintos que infectam Squamata (principalmente lagartos) na América do Sul aumentaram consideravelmente nos últimos anos. Novos registros de hospedeiros e/ou localidades e descrição de várias novas espécies são os mais frequentemente realizados (ÁVILA; SILVA, 2011).

Os lagartos são considerados organismos modelo para estudos ecológicos especialmente para investigações parasitológicas (AHO, 1990; PIANKA; VITT, 2003).

O Brasil é considerado o terceiro país com a maior riqueza de répteis do mundo, sendo descritas aproximadamente 795 espécies, das quais 272 são lagartos (282 considerando as subespécies), distribuídas em 14 famílias (COSTA; BÉRNILS, 2018). Apesar da grande diversidade de lagartos no país, estudos sobre helmintos são restritos a poucas espécies e concentram-se principalmente na região sudeste e central do país (ÁVILA, 2009; ÁVILA; SILVA, 2010, 2011; ÁVILA *et al.*, 2011; 2012; 2013).

Salvator merianae (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) (lagarto teiú) ocorre no leste da Bolívia, Argentina, Paraguai, Uruguai, Brasil e foi introduzido na Flórida (EUA) (QUINTELA; LOEBMANN, 2009; SCOTT *et al.*, 2019).

Este lagarto possui hábito diurno, habita campos, áreas rochosas e matas, próximo a cursos de água. Sua dieta é onívora e oportunista, composta de itens muito variados como: frutas, insetos, moluscos, peixes, anfíbios, répteis, roedores, aves adultas, ninhegos, ovos e até carcaças (ACHAVAL; OLMOS, 2003; SAZIMA; D'ANGELO, 2013).

Em relação aos helmintos parasitos de *S. merianae* foram registradas dez espécies de nematoides: *Cruzia* sp.; *Cruzia travassosi* Kalil & Vogelsangi, 1932; *Cruzia lauroi* Vieira, Gonçalves, Lima, Sousa & Muniz-Pereira, 2020 (Kathlaniidae);

Diaphanocephalus galeatus (Rudolphi, 1819) (Diaphanocephalidae); *Spinicauda spinicauda* Olfers, 1819 (Heterakidae); *Physaloptera lutzi* Cristofaro, Guimarães & Rodrigues, 1976; *Physaloptera retusa* Rudolphi, 1819; *Physaloptera tupinambae* Pereira, Alves, Rocha, Lima & Luque, 2014; *Physaloptera binae* Pereira, Alves, Rocha, Lima & Luque, 2014 (Physalopteridae); *Oswaldofilaria petersi* Bain & Sulahian, 1974 (Onchocercidae); um cestóide: *Oochoristica* sp. (Anoplocephalidae) e um trematódeo *Brachylaima* sp. (ÁVILA; SILVA 2010, 2011; BRITO et al., 2014; FEDATTO-BERNARDON et al., 2017; MELO et al., 2019; PEREIRA et al., 2012, 2014; TEIXEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2016; VIEIRA et al., 2020; RAMALHO et al., 2009).

Para a região Sul do Brasil não existiam registros para o hospedeiro até a publicação da ocorrência de *D. galeatus* e *Brachylaima* sp. (VIEIRA et al., 2016; FEDATTO-BERNARDON et al., 2017) (Apêndices A e B). Portanto o objetivo deste estudo foi investigar os parasitos associados a este lagarto, e estimar os índices parasitológicos de ocorrência para o hospedeiro no Rio Grande do Sul.

2 Material e métodos

2.1 Coleta e caracterização dos hospedeiros

Foram examinados 47 espécimes (21 machos e 26 fêmeas) de *S. merianae* coletados entre 2007 e 2020 nos municípios de Pelotas (31°46'19"S 52°20'33"W), Capão do Leão (31°46'3"S 52°26'55"W), Morro Redondo (31°35'18"S 52°37'47"W) e Rio Grande (32°1'60"S 52°5'55"W), Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 1). Trinta e oito hospedeiros foram vítimas de atropelamentos e coletados em rodovias e nove doados pelo Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre e Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Pelotas (NURFS-CETAS/UFPel) após o óbito durante processo de reabilitação.

A coleta dos animais atropelados foi licenciada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Sistema de Autorização e Informação em

Biodiversidade/ICMBIO-SISBIO 38913-1/38913-5 e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal CEEA/UFPel nº 8876).

Os hospedeiros foram acondicionados em sacos plásticos e transportados para o Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (LAPASIL/DEMP), onde foram necropsiados para a coleta de helmintos. Trinta e nove lagartos foram etiquetados e congelados, a -20°C , individualmente, e oito foram necropsiados logo após a coleta. Informações como data e local de coleta, causa da morte, tipo de armazenamento e data de necropsia foram descritas conforme formulário em anexo (Apêndice F). Os hospedeiros foram classificados como adulto ou juvenil, sendo a sexagem feita durante a necropsia, pelo exame do aparelho reprodutor.

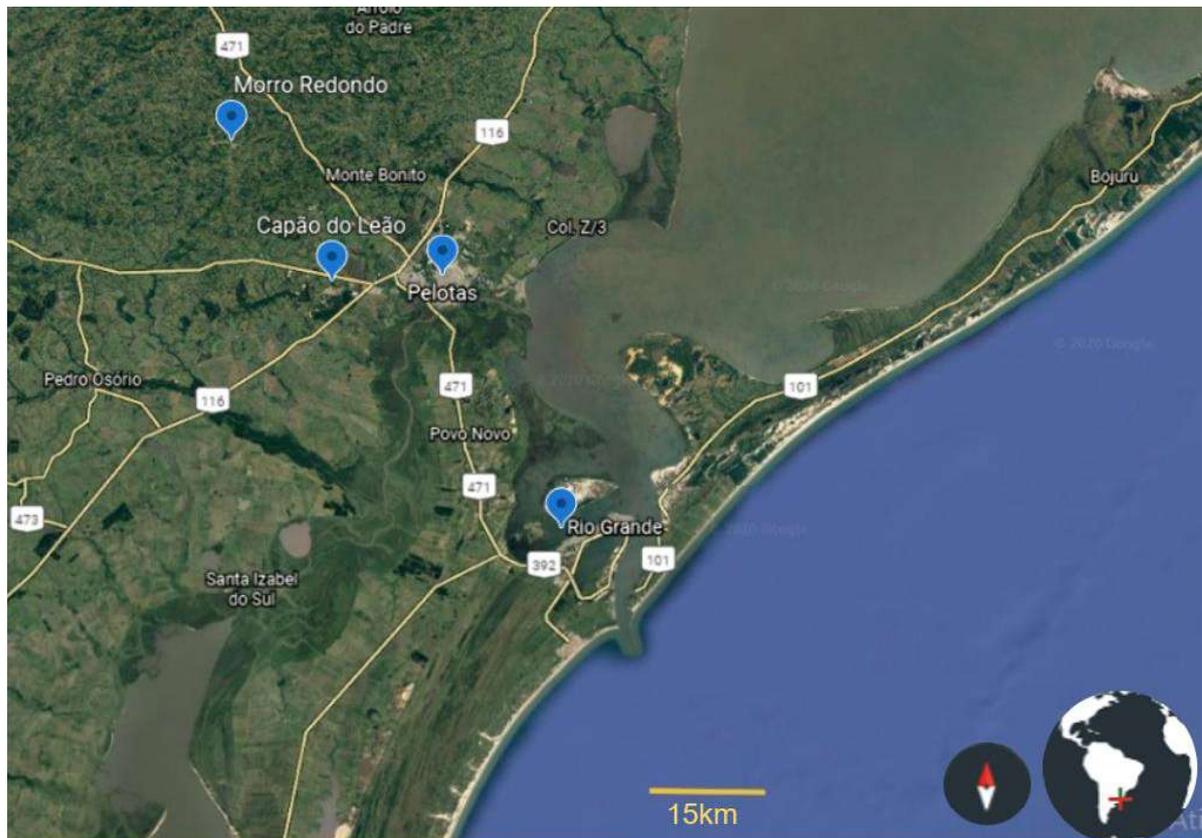


Figura 1 - Localização dos municípios de Pelotas ($31^{\circ}46'19''\text{S}$ $52^{\circ}20'33''\text{W}$), Capão do Leão ($31^{\circ}46'3''\text{S}$ $52^{\circ}26'55''\text{W}$), Morro Redondo ($31^{\circ}35'18''\text{S}$ $52^{\circ}37'47''\text{W}$) e Rio Grande ($32^{\circ}1'60''\text{S}$ $52^{\circ}5'55''\text{W}$) onde foram coletados os espécimes de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. Fonte: Extraído e modificado do site Google Earth Versão 9.3.111.2.

2.2 Coleta, preparo e identificação morfológica dos parasitos

Os hospedeiros foram necropsiados (Figura 2) e tiveram seus órgãos individualizados, abertos e lavados sob tamis de malha 150 μ m. Os conteúdos dos órgãos e as mucosas, bem como os músculos da cauda foram inspecionados ao estereomicroscópio Olympus SZ.

Os helmintos encontrados foram coletados, quantificados, fixados em solução AFA (álcool 96°GL, formol 40% 100ml, ácido acético glacial PA 30ml e água destilada 400ml) e preparados para identificação específica de acordo com Amato; Amato (2010). Os nematoides foram clarificados com lactofenol de Amann e/ou glicerina montados em lâminas semipermanentes. Os trematódeos e acantocéfalos foram corados com Carmin clorídrico de Langeron e montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá.

As lâminas preparadas com os helmintos foram visualizadas ao microscópio para identificação morfológica e análise morfométrica de acordo com bibliografia específica de cada grupo (COSTA, 1965; FREITAS; LENT, 1938; LICHTENFELS, 1980; MACE; ANDERSON, 1975; MEASURES; ANDERSON, 1985; PEREIRA *et al.*, 2012; PETROCHENKO, 1971; POJMAVSKA, 2002; VALENTE *et al.*, 2016; YAMAGUTI, 1963). As fotografias foram realizadas em microscópio com sistema de câmera acoplada.



Figura 2 – Macho de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) em necropsia para pesquisa de helmintos no sul do Brasil. **a)** vista dorsal; **b)** vista ventral, mostrando a incisão realizada durante a necropsia.

Alguns espécimes testemunhos foram depositados na Coleção de Helmintos do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (CHLAPASIL/UFPel); na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Rio de Janeiro, Brasil; na Coleção de Invertebrados Museo de La Plata (MLP-He), La Plata, Argentina; na Coleção de Parasitologia do Centro de Investigação Marinha (CIIMAR) da Universidade do Porto e outros foram preparados para depósito posterior (Apêndice C).

Os índices parasitológicos de prevalência (P%), abundância média (AM) e intensidade média de infecção (IM) foram calculados de acordo com Bush *et al.* (1997). Amostras dos espécimes de helmintos encontrados também foram preservadas em etanol 70% para análises moleculares.

3 Resultados e discussão

Dos 47 espécimes de *S. merianae* analisados, 44 (P=93,6%) estavam parasitados por pelo menos uma espécie de helminto. Nematoda com P=93,6%

(n=44), Trematoda com P=10,6% (n=5) e Acanthocephala P=14,9% (n=7), sendo a diversidade composta por seis taxa.

Foram encontradas quatro espécies de nematoides: *Diaphanocephalus galeatus* (Diaphanocephalidae), *Physaloptera tupinambae* (Physalopteridae), *Cruzia brasiliensis* Costa, 1965 (Kathlaniidae) e *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Dioctophymatidae) (larva terceiro estágio); uma de trematódeo *Brachylaima* sp. (Brachylaimidae) (forma imatura) e uma de acantocéfalo *Centrorhynchus* sp. (Centrorhynchidae) (forma imatura), conforme apresentado na Tabela 1 e nas Figuras 3-8.

Diaphanocephalus galeatus foi o helminto mais prevalente (85,1%), seguido de *P. tupinambae* (53,2%) e *C. brasiliensis* (46,8%). *Cruzia brasiliensis* apresentou a maior intensidade de infecção (IM=69,6 helmintos/hospedeiro) sendo encontrados até 510 nematoides em um único espécime de lagarto.

Tabela 1 - Helmintos parasitos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil e seus respectivos sítios de infecção (SI), prevalência (P%), abundância média (AM), intensidade média de infecção (IM) e amplitude de infecção (Ax).

Helmintos	SI	P% (**NI)	AM	IM	Ax	Nº total
Nematoda						
<i>Diaphanocephalus galeatus</i>	EST, ID, IG	85,1(40)	27,9	32,9	1-159	1315
<i>Physaloptera tupinambae</i>	EST	53,2(25)	10,8	20,4	1-87	506
<i>Cruzia brasiliensis</i>	C, IG	46,8 (22)	32,6	69,6	1-510	1531
<i>Dioctophyme renale</i> (larva)	CC	6,4 (3)	0,14	2,3	2-3	7
Trematoda						
<i>Brachylaima</i> sp.	ID, IG	10,6 (5)	2,8	26,8	2-104	134
Acanthocephala						
<i>Centrorhynchus</i> sp.	ID, IG	14,9 (7)	1,5	10	1-45	70
Número total lagartos infectados		44				

**NI=número de lagartos infectados.

Cavidade celomática (CC), ceco (C), estômago (EST), intestino delgado (ID) e intestino grosso (IG).

3.1 Helmintos de *Salvator merianae*

3.1.1 Filo Nematoda

Diaphanocephalus galeatus (Rudolphi, 1819) (Figura 3)

Diaphanocephalus galeatus foi encontrado parasitando o estômago, intestino delgado e grosso de 40 *S. merianae*, totalizando 1315 espécimes (731 fêmeas e 584 machos) com intensidade média de infecção de 32,9 helmintos/hospedeiro (tabela 1).

Diaphanocephalidae Travassos, 1920 agrupa dois gêneros, *Diaphanocephalus* Diesing, 1851 e *Kalicephalus* Molin, 1861. Em *Diaphanocephalus* os nematoides possuem sulco peri-oral delimitado por cumes anteriores e posteriores; possuem dois processos cuticulares membranosos na base da cavidade bucal; os espículos dos machos não são alados, sua bolsa copuladora é em formato de sino/campânula e possui uma protuberância muscular dorsal anterior. São registrados parasitando comumente o intestino delgado de lagartos da América do Sul (LICHTENFELS, 1980).

Atualmente existem duas espécies válidas para o gênero: *D. galeatus* e *D. diesingi* Freitas & Lent, 1938 (PEREIRA *et al.*, 2019) as quais se diferenciam pelo tamanho dos espículos e gubernáculo nos machos e a região vulvar e ovejeter nas fêmeas.

Estudos desenvolvidos para a espécie constam de descrições morfológicas e ocorrência de *D. galeatus* em novos hospedeiros e/ou localidade. Recentemente um estudo molecular foi realizado e uma sequência parcial do gene 28S DNAr foi disponibilizada representando a primeira caracterização molecular da espécie (PEREIRA *et al.*, 2019).

Registros de *D. galeatus* existem apenas para a América do Sul. No Brasil a espécie já foi registrada em *S. merianae* no estado do Mato Grosso por Ávila e Silva (2011), no Rio Grande do Sul por Vieira *et al.* (2016-presente estudo) e em Pernambuco e Ceará por Teixeira *et al.* (2017). *D. galeatus* também foi registrado em outras espécies de lagartos: em *Tupinambis teguixin* (Linnaeus, 1758) no Brasil, Argentina, e Bolívia (FREITAS; LENT, 1938; VICENTE *et al.*, 1993); em *Salvator rufescens* (Günther, 1871) na Argentina (SPINELLI *et al.* 1992); e em *Dracaena*

paraguayensis (Amaral, 1950) e *Dracaena guianensis* (Daudin, 1802) ambos no Brasil (ALHO, 1965; PEREIRA *et al.*, 2019).

Spinelli *et al.* (1992) observaram que *D. galeatus* provenientes de *Tupinambis teguixin* é histófago e causa lesões anatômicas provocadas pela destruição da mucosa intestinal através da ação mecânica de sua cápsula bucal. No entanto, não ocorre ulcerações na área afetada, apenas perda de tecido, e, portanto, uma via de entrada para microrganismos causadores de infecções.

O conhecimento referente ao ciclo de vida restringe-se a estudos experimentais realizados com quatro espécies de *Kalicephalus*. Neste caso o parasito apresenta ciclo direto/monoxeno em que as fêmeas depositam ovos em estágio de mórula, os quais se desenvolvem rápido nas culturas fecais e na água (semelhante aos ancilóstomos). O primeiro e o segundo estádios larvais são rhabditiformes e o terceiro strongyliformes, como na maioria dos nematoides bursados com estágios de vida livre (ANDERSON, 2000). Segundo Anderson, (2000) não há evidências de que ocorra penetração das larvas na pele, mas não se anula a possibilidade de larvas infectantes invadirem animais de corpo mole como moluscos e anfíbios, os quais podem servir como hospedeiros paratênicos se as larvas persistirem em seus tecidos.

Registros anteriores mencionam comumente o intestino delgado e grosso como local de infecção por *D. galeatus* (ÁVILA; SILVA, 2011; PEREIRA *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2017). No entanto, em *S. merianae* os nematoides também foram encontrados livres no estômago e intestino grosso, e fixados apenas no intestino delgado. Isso sugere que o sítio de infecção preferencial é o intestino delgado, e que com o fato de alguns lagartos não terem sido necropsiados imediatamente ao óbito os parasitos se movimentam após a morte do hospedeiro, em uma tentativa de escapar e/ou sobreviver.

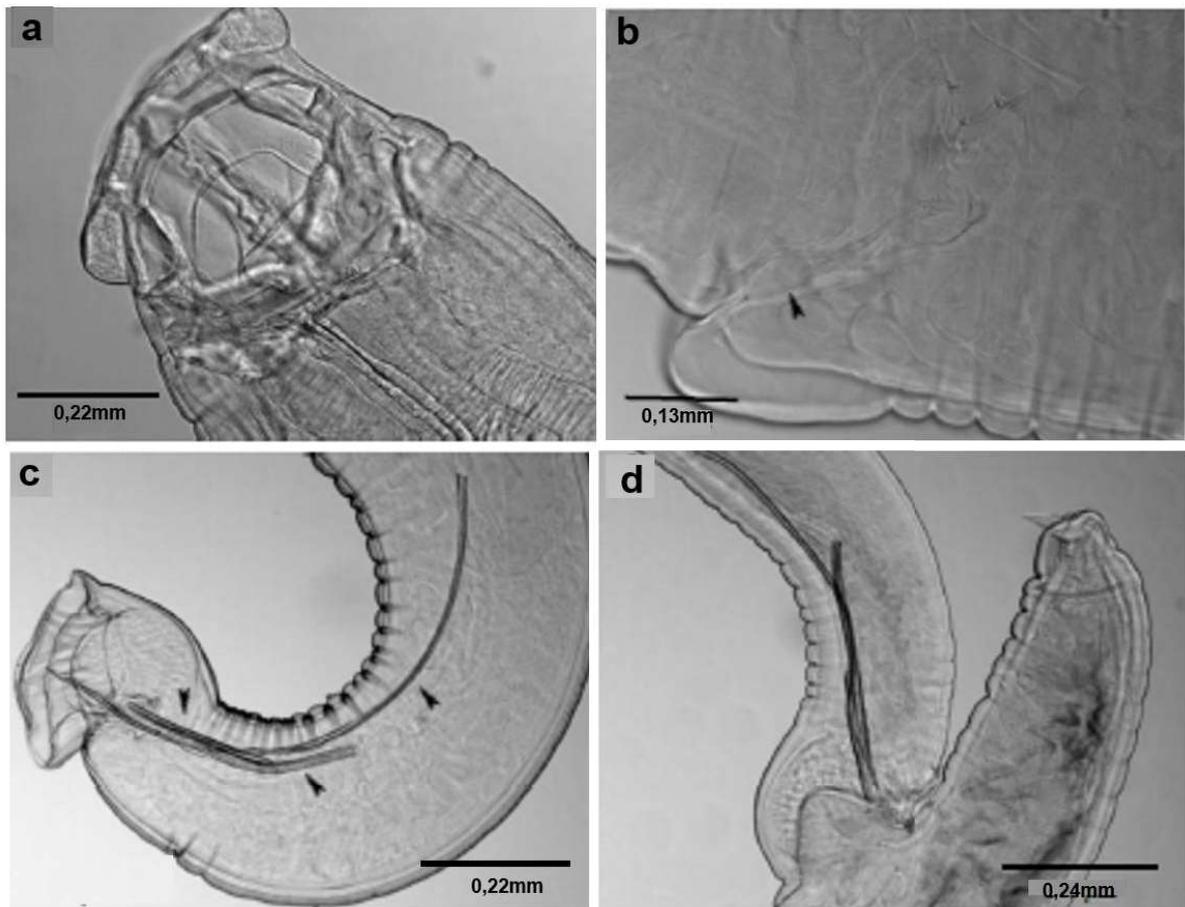


Figura 3 – *Diaphanocephalus galeatus* (Rudolphi, 1819) (Diaphanocephalidae), encontrado no estômago, intestino delgado e grosso de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** vista lateral da região anterior; **b)** lábio vulvar da fêmea situado próximo à região posterior do corpo, seta indica o ovo dentro do ovejetor; **c)** região posterior do macho, setas indicam os espículos; **d)** macho e fêmea em cópula, região posterior de ambos.

Physaloptera tupinambae Pereira, Alves, Rocha, Souza Lima e Luque 2012 (Figura 4)

Physaloptera tupinambae foi encontrado parasitando o estômago de 25 espécimes de *S. merianae* com intensidade média de infecção de 20,4 helmintos/hospedeiro, num total de 506 nematoides (201 fêmeas, 166 machos, 139 larvas) (Tabela 1).

Physaloptera inclui mais de 100 espécies comumente encontradas parasitando o estômago de anfíbios, répteis, aves e mamíferos (PEREIRA *et al.*, 2012). Segundo Aho (1990) as espécies são adaptadas para infectar lagartos em diferentes ambientes, exibindo baixa especificidade, um padrão comum entre os parasitas de répteis.

No Brasil, oito espécies foram relatadas em répteis: *Physaloptera bonnei* Ortlepp, 1922; *Physaloptera liophis* Vicente & Santos, 1974; *Physaloptera lutzi* Cristofaro, Guimarães & Rodrigues, 1976; *Physaloptera monodens* Molin, 1860; *Physaloptera obtusissima* Molin, 1860; *Physaloptera retusa* Rudolphi, 1819; *Physaloptera tupinambae* e *Physaloptera binae* Pereira, Alves, Rocha, Souza Lima & Luque, 2012; 2014 (PEREIRA *et al.*, 2014). Sendo que destas apenas quatro foram encontradas parasitando *S. merianae*. *Physaloptera lutzi* no estado do Ceará e Pernambuco, *P. retusa* no estado do Mato Grosso, *P. binae* em Minas Gerais e *P. tupinambae* no Ceará, Sergipe e Minas Gerais (ÁVILA; SILVA, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2019).

O ciclo evolutivo das espécies de *Physaloptera* é heteroxeno, na fase adulta machos e fêmeas são parasitos obrigatórios de vertebrados e na fase larval podem infectar um ou mais hospedeiros intermediários, sendo estes invertebrados como grilos, gafanhotos, baratas e besouros (GRAY; ANDERSON, 1982), tais invertebrados foram itens alimentares frequentemente encontrados durante as necrópsias realizadas.

As fêmeas eliminam os ovos larvados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo, estes são então ingeridos pelos hospedeiros intermediários. No intestino dos invertebrados ocorre a eclosão das larvas L1 que o atravessam e encistam-se em sua parede externa. Cerca de 11 a 16 dias após a infecção mudam para larva L2 e depois de 12 dias mudam para larva L3 infectante. O período pré-patente varia de 56 a 85 dias (STUNKARD, 1953).

Os parasitos adultos vivem aderidos à mucosa gástrica do hospedeiro, são hematófagos e podem provocar erosões, levando a gastrite catarral ou hemorrágica e anemia (URQUHART *et al.*, 1998).

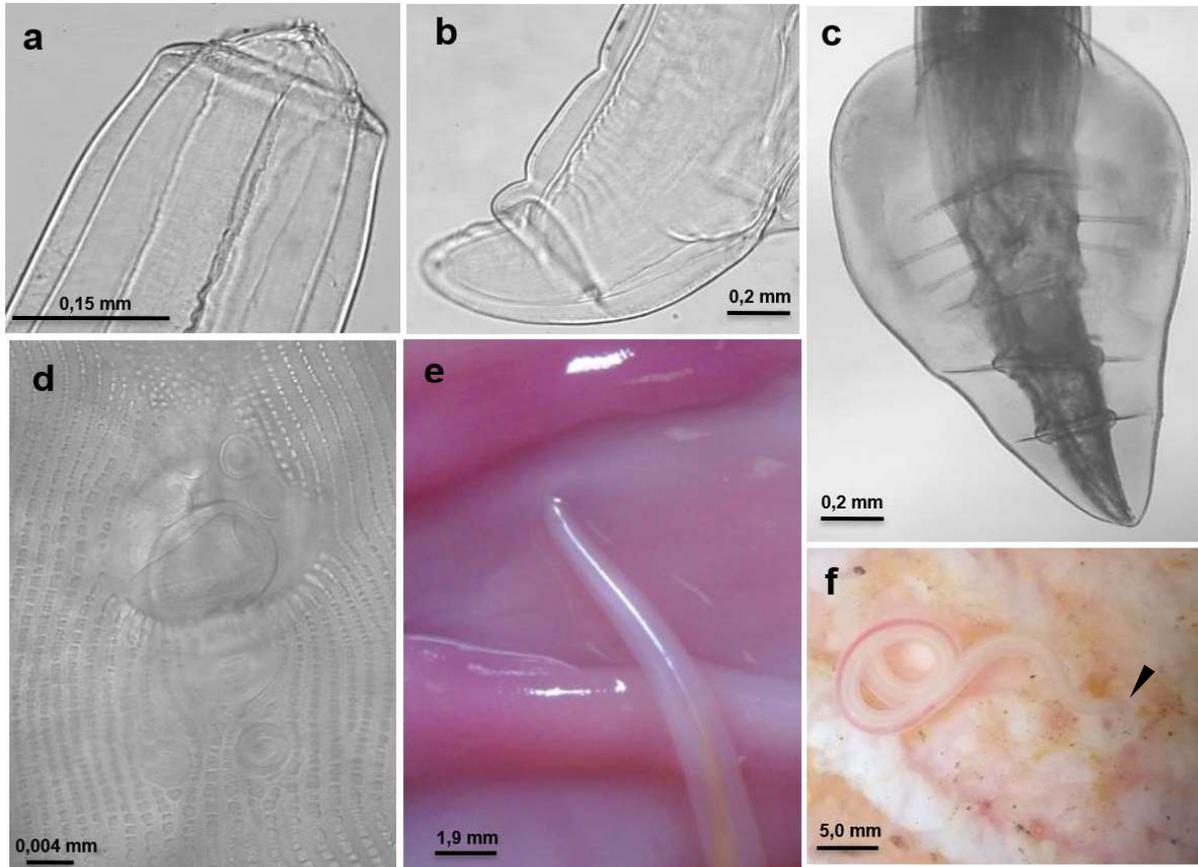


Figura 4 – *Physaloptera tupinambae* Pereira, Alves, Rocha, Lima & Luque, 2014 (Physalopteridae) encontrado no estômago de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** região anterior; **b)** região posterior da fêmea; **c)** região posterior do macho; **d)** detalhe das papilas cloacais do macho; **e-f)** parasito com a porção anterior aderida na mucosa do estômago do hospedeiro, a seta indica a região anterior.

Cruzia brasiliensis Costa, 1965 (Figura 5)

Vinte e dois lagartos estavam infectados por *C. brasiliensis* sendo a espécie que apresentou maior intensidade média de infecção, 69,6 helmintos/hospedeiro, com amplitude variando de 1 a 510 parasitos por hospedeiro. Ao todo 1531 nematoides (534 machos, 664 fêmeas e 333 larvas) foram encontrados parasitando o intestino grosso e ceco dos hospedeiros (Tabela 1).

Cruzia Travassos, 1917 inclui 14 espécies que ocorrem nas Américas do Norte, Central e do Sul, sendo registradas parasitando o intestino grosso de anfíbios, répteis e, principalmente, mamíferos (ADNET *et al.*, 2009). Répteis da região Neotropical foram relatados como hospedeiros de *Cruzia rudolphii* Ruiz, 1947; *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819); e *Cruzia travassosi* Khalil & Vogelsang, 1932 (VIEIRA *et al.*, 2020).

Em *S. merianae* existe apenas registro de *Cruzia* sp., *C. travassosi* e *Cruzia lauroi* Vieira, Gonçalves, Lima, Sousa & Pereira, 2020 (ÁVILA *et al.*, 2010, 2011; ÁVILA; SILVA, 2011; BRITO *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2020). No Brasil os registros de *Cruzia* ficam restritos a cinco espécies: *C. brasiliensis* e *C. tentaculata* parasitando mamíferos (ADNET *et al.*, 2009; COSTA, 1965; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2016), e *C. travassosi*, *C. rudolphii* e *C. lauroi* répteis (ÁVILA *et al.*, 2008, 2010; ÁVILA; SILVA, 2011; VIEIRA *et al.*, 2020), porém na maioria dos registros os autores não forneceram nenhuma descrição taxonômica das espécies.

Vieira *et al.* (2020) elaboraram uma chave de identificação para as espécies do gênero e consideraram apenas 10 espécies válidas, classificando *C. travassosi*, *Cruzia mazza* Khalil & Vogelsang, 1932, *Cruzia mexicana* Khalil & Vogelsang, 1932 e *Cruzia testudinis* (Hárwood, 1932) como “*species inquirendae*” (de identidade duvidosa que requer investigação adicional), pelo fato de suas descrições necessitarem de maior detalhamento taxonômico.

Dentre as características principais para diferenciação entre espécies de *Cruzia* estão: o número de estruturas semelhantes à “dentes” presentes na faringe, presença ou ausência de papila caudal não pareada, a disposição e número das papilas caudais dos machos, e posição da vulva das fêmeas.

Os espécimes de *C. brasiliensis* do presente estudo apresentam de 17-19 “dentes” na faringe, 11 pares de papilas caudais nos machos, sendo 3 pré-cloacais, 3 ad-cloacais e 5 pós-cloacais (3:3:5) e possuem papila cloacal não pareada. Segundo as chaves de identificação de Vieira *et al.* 2020 e as descrições originais disponíveis,

tais características morfológicas assemelham-se mais com as presentes em *C. brasiliensis* e *Cruzia americana* (Maplestone, 1930) (Tabela 2).

Alguns dados morfométricos apresentam intervalos com variações maiores. Entretanto, segundo Mota (1989) os nematoides podem variar consideravelmente conforme a espécie hospedeira, existindo uma diferença notável em suas dimensões, forma e habitat.

Tabela 2 – Comparação entre os dados morfológicos e morfométricos dos espécimes de *C. brasiliensis* de *Salvator merianae* do presente estudo com espécimes de *C. brasiliensis* e *C. americana* em suas descrições originais.

Hospedeiro	<i>Cruzia brasiliensis</i>				<i>Cruzia americana</i>			
	<i>Salvator merianae</i>		<i>Sus domesticus</i>		<i>Didelphis virginiana</i>			
Localidade	Rio Grande do Sul (Brasil)		Bahia (Brasil)		Ohio (EUA)		Louisiana (EUA)	
Referências	presente estudo		Costa (1965)		Crites (1956)		Li (2019)	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Comprimento do corpo	8,2-13,2	11,3-21,3	9,6-15,7	14,2-18,5	11,1-12,3	16,4-18,3	6,7-8,4	7,45-10,3
Largura do corpo	0,14-0,65	0,4-0,95	0,53-0,70	0,54-1,04	0,49-0,64	0,63-0,67	0,27-0,44	0,28-0,45
Comprimento faringe	0,12-0,15	0,14-0,29	0,16-0,27	0,22-0,28	0,16-0,22	0,16-0,18	0,12-0,16	0,13-0,16
Número de "dentes" na faringe	17-19		17-22		15-18		13-17	
Comprimento esôfago	0,8-1,13	1,61-2,8	0,99-2,75	0,22-2,88	2,11-3,14	2,23-2,41	1,45-1,88	1,62-2,1
Comprimento bulbo	0,25-0,35	0,26-0,45	0,29-0,40	0,31-0,43	0,27-0,30	0,27-0,32	0,20-0,24	0,22-0,25
Comprimento divertículo intestinal	0,86-0,88	0,88-1,28	0,48-0,85	0,50-0,93	0,81-0,98	0,88-1,22	0,60-0,98	0,75-1,1
Anel nervoso até região anterior	0,45-0,52	0,61-0,68	0,49-0,62	0,50-0,67	0,44-0,61	0,49-0,55	0,35-0,43	0,36-0,45
Poros excretor até região anterior	1,15-1,18	1,1-2,27	-	-	1,11-1,94	1,25-1,57	0,72-0,87	0,75-0,98
Comprimento espículos	0,59-0,95		0,7-0,96		0,89-1,0		0,56-0,77	
Comprimento gubernáculo	0,16-0,20		0,21		0,14-0,16		0,10-0,18	
Posição e número das papilas caudais	3:3:5		3:3:5		3:3:5		3:3:4	
Papila cloacal não pareada	presente		presente		presente		presente	
Posição da vulva	equatorial		equatorial		pré-equatorial		pré-equatorial	
Comprimento x largura ovos	0,09-0,12 x 0,04-0,06		0,10-0,14 x 0,05-0,07		0,10-0,12 x 0,05-0,07		0,09-,11 x 0,04-0,05	
Anus até região posterior	0,82-1,04		-		0,73-0,98		0,55-0,82	

A possibilidade da espécie encontrada em *S. merianae* ser *C. americana* é menos viável quando levado em consideração que o único hospedeiro registrado para o nematoide é o marsupial *Didelphis virginiana* (Kerr, 1792) que tem distribuição restrita na América Central, México, Estados Unidos e parte do Canadá, e que registros de ocorrência do nematoide foram feitos apenas para a América do Norte (ALDEN, 1995). Além disso, recentemente, Li (2019) redescreveu a espécie com base

em espécimes coletados do mesmo hospedeiro e região, utilizando microscopia eletrônica de varredura. Neste estudo, o autor menciona que a espécie apresenta apenas 10 pares de papilas caudais (3:3:4) diferentemente do relatado por Costa (1965) em sua descrição original.

C. brasiliensis foi registrada até o momento parasitando *Sus domesticus* (suínos domésticos) na Bahia (COSTA, 1965) e *Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758 (catetos) no estado de Tocantins no Brasil (PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2016), a presença do nematoide em *S. merianae* reforça a ideia de ocorrência de infecções cruzadas entre animais domésticos e silvestres, mas necessita estudos moleculares das populações de parasitos em diferentes ambientes para comprovar esta hipótese.

Em lagartos, o encontro dessas espécies, que normalmente ocorrem em mamíferos, pode ser indicativo de hábitos alimentares semelhantes e/ou interações interespecíficas dos hospedeiros. A dieta onívora e os hábitos cada vez mais antrópicos são comportamentos observados em ambos hospedeiros. As espécies de *Cruzia* possuem ciclo direto (CRITES, 1956ab), e a coocorrência dos hospedeiros no ambiente poderia favorecer a disseminação e infecção pela mesma espécie de parasito em ambos.

Pela primeira vez registra-se *C. brasiliensis* parasitando *S. merianae*.

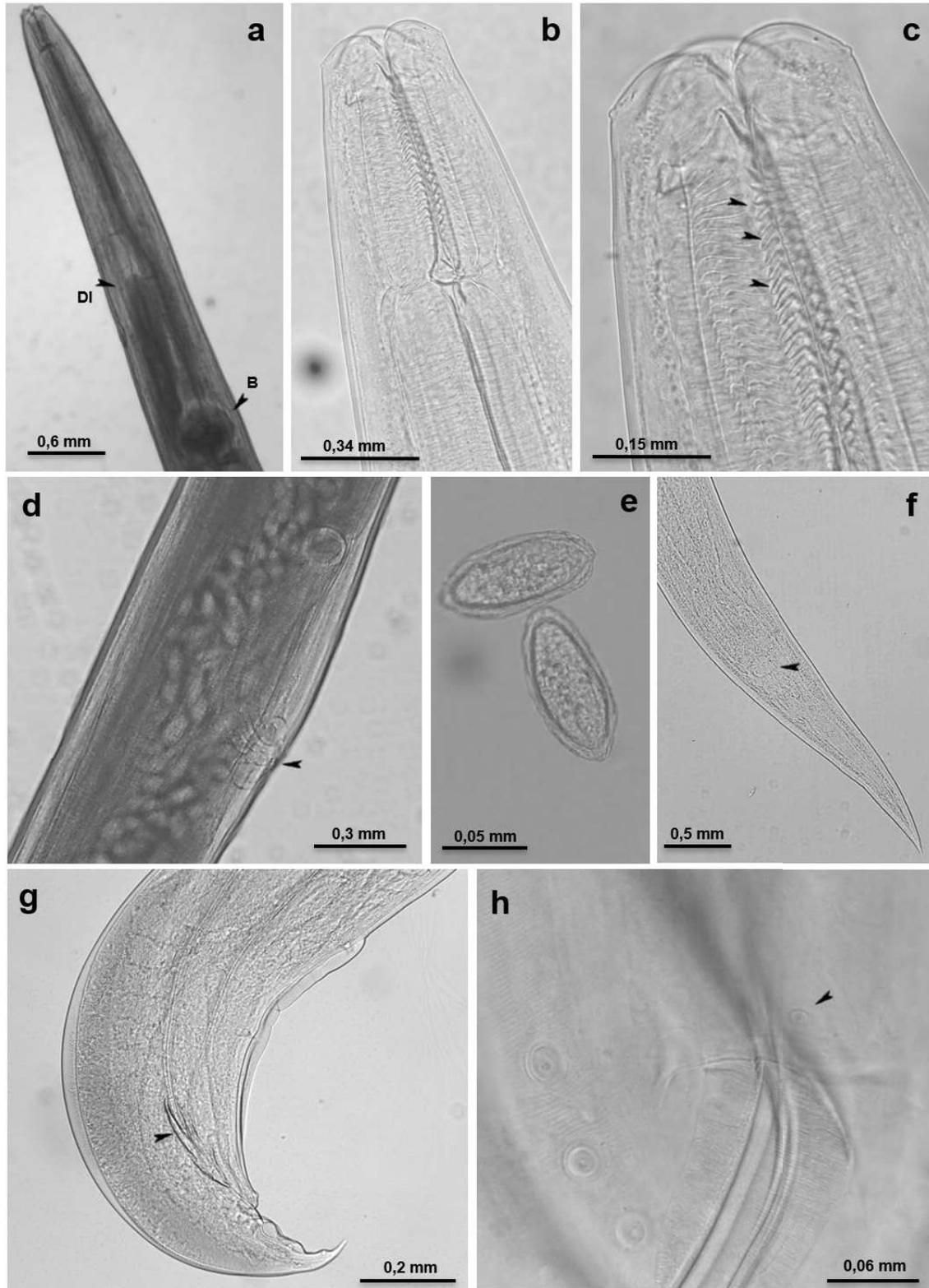


Figura 5 – *Cruzia brasiliensis* Costa, 1965 (Kathlianiidae) encontrado no intestino grosso e ceco de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** região anterior, setas apontam o divertículo intestinal (DI) e o bulbo esofágico (B); **b)** região anterior, destaque dos três lábios; **c)** região anterior, setas apontam para as estruturas semelhantes a dentes presente na faringe; **d)** porção equatorial da fêmea, seta aponta para a vulva; **e)** detalhe dos ovos com casca espessa e rugosa; **f)** região posterior da fêmea, seta aponta o ânus; **g)** região posterior do macho, seta aponta o gubernáculo; **h)** detalhe cloaca do macho, seta aponta papila não pareada.

Diectophyme renale (Goeze, 1782) (Nematoda: Dioctophymatidae) (Figura 6)

Apenas três lagartos foram positivos para *D. renale*, sendo estas formas imaturas (larvas de terceiro estágio) (2 machos e 5 fêmeas) e encontravam-se encistados (individualmente) na membrana estomacal e superfície dos rins do hospedeiro (cavidade celomática) (Tabela 1).

Diectophyme renale conhecido popularmente como “verme gigante do rim”, tem distribuição mundial e é responsável por causar a doença denominada de Dioctofimose ou Dioctofimose. Seu ciclo biológico é complexo, envolvendo cães domésticos e animais silvestres como hospedeiros definitivos, oligoquetos aquáticos como hospedeiros intermediários e peixes e anuros como hospedeiros paratênicos (MACE; ANDERSON, 1975).

Os nematoides adultos são encontrados frequentemente no rim direito dos hospedeiros definitivos e também na cavidade peritoneal (ANDERSON, 2000). Após a postura dos ovos pelas fêmeas, eles são liberados juntamente com a urina do hospedeiro definitivo, e posteriormente ingeridos pelos oligoquetos aquáticos. Nos tecidos do hospedeiro intermediário o nematoide se desenvolve até a larva de terceiro estágio (infectante). De acordo com a literatura, os hospedeiros definitivos adquirem *D. renale* de duas maneiras: pela ingestão de oligoquetos aquáticos (hospedeiros intermediários) contendo as larvas de terceiro estágio ou através das larvas encistadas nos hospedeiros paratênicos (peixes e anuros) (MACE; ANDERSON, 1975; MEASURES; ANDERSON, 1985).

Casos em humanos foram descritos na Ásia, relacionando a infecção com o consumo de peixe cru (KATAFIGIOTIS *et al.*, 2013; URANO *et al.*, 2001).

No Brasil, estudos frequentemente relatam *D. renale* parasitando cães domésticos e, raramente, gatos (DA SILVA *et al.*, 2017; PEDRASSANI *et al.*, 2014; PERERA, *et al.*, 2017; RAPPETI *et al.*, 2017). Em animais silvestres há relatos em: *Nasua nasua* Linnaeus, 1766 (quati) (Procyonidae) (MILANELO *et al.*, 2009); *Chrysocyon brachyurus* Illiger, 1815 (lobo-guará) (DUARTE *et al.*, 2013; VARZONE *et al.*, 2008; VULCANI *et al.*, 2015); *Speothos venaticus* (Lund, 1842) (cachorro-vinagre) (PROENÇA, 1935); *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) (cachorro-do-mato) (Canidae) (RIBEIRO *et al.*, 2009); *Galictis cuja* (Molina, 1782) (furão) (BARROS *et al.*, 1990; PESENTI *et al.*, 2012; ZABOTT *et al.*, 2012); *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) (lontra)

(Mustelidae) (ECHENIQUEET *et al.*, 2018); *Leopardus geoffroyi* d'Orbigny & Gervais, 1844 (gato-do-mato-grande) (Felidae) (TRINDADE *et al.*, 2018); *Choloepus didactylus* (Linnaeus, 1758) (preguiça-real) (Pilosa) (ROCHA *et al.*, 1965) e *Cebus apella* (Linnaeus, 1758) (Primata) (ISHIZAKI *et al.*, 2010).

Estudos sobre ocorrência de larvas de terceiro estágio no Brasil são oriundos do estado de Santa Catarina em *Chaunus ictericus* (Spix, 1824) (Anura: Bufonidae) (n=58) (P%=5,17; AM=0,27; IM=5,33; 1-10 por hospedeiro) (PEDRASSANI *et al.*, 2009); estado de São Paulo em *Gymnotus sylvius* Albert & Fernandes-Matioli, 1999 (Gymnotiformes: Gymnotidae) (n=51) (P%=20; AM=0,3; IM=1,5) e *Acestrorhynchus lacustris* (Lütken, 1875) (Characiiformes: Acestrorhynchidae) (n=62) (P%=5; AM=0,05; IM=1) (ABDALLAH *et al.*, 2012); e no estado do Rio Grande do Sul em *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) (tigre-d'água) (n=60) (P%=50; AM=6,51; IM=13,03; 1-129 por hospedeiro), *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Chelidae) (cágado-de-barbêlas) (n=9) (P%=44,4; AM=1,66; IM=3,75; 1-5 por hospedeiro), *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Squamata: Dipsadidae) (parelheira) (n=3) (P%=33,3; AM=0,66; IM=2) e *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae) (tamboatá) (n=47) (P%=53,2; AM=2,3; IM=4,4; 1-13 por hospedeiro) (MASCARENHAS; MÜLLER, 2015; MASCARENHAS *et al.*, 2016, 2017, 2019).

Sobre o ciclo biológico de *D. renale*, até o momento a única espécie comprovada experimental e naturalmente atuando como hospedeiro intermediário é *Lumbriculus variegatus* (Müller, 1774) (Oligochaeta: Lumbriculida) (MACE; ANDERSON, 1975), no entanto, na América do Sul o oligoqueto foi encontrado apenas no Estado de Minas Gerais no Brasil (MARCHESE *et al.*, 2015) e na Argentina (MISERENDINO, 2007). Portanto, acredita-se que outras espécies/organismos também sejam potenciais hospedeiros intermediários do nematoide (BRINKHURST; JAMIESON, 1971 *apud* MARSHALL, 1978).

Nos últimos 10 anos os casos de diagnóstico de diotofimatose canina tem aumentando na cidade de Pelotas, sendo registrados cerca de 70 novos casos da doença (RAPPETI *et al.*, 2017). A detecção/ocorrência das larvas de terceiro estágio em *S. merianae* pode estar ligada à alta presença de cães errantes nessa região. Estes animais quando parasitados podem contaminar o ambiente disseminando ovos através da urina, uma vez que ambos, cães e lagartos, podem habitar os mesmos locais a infecção se torna possível.

Esse resultado acrescenta uma nova informação para os estudos de epidemiologia sobre a Dioctofimatoze, contribuindo também para o entendimento da biologia de *D. renale*, uma vez que seu ciclo não é totalmente elucidado na região sul do Brasil. Embora os índices de infecção do parasito em *S. merianae* sejam relativamente baixos demonstram que o lagarto pode, entre outros animais silvestres, ser um hospedeiro paratênico em potencial do nematoide ou servir como “espécie sentinela” alertando sobre a ocorrência da doença nessa região.

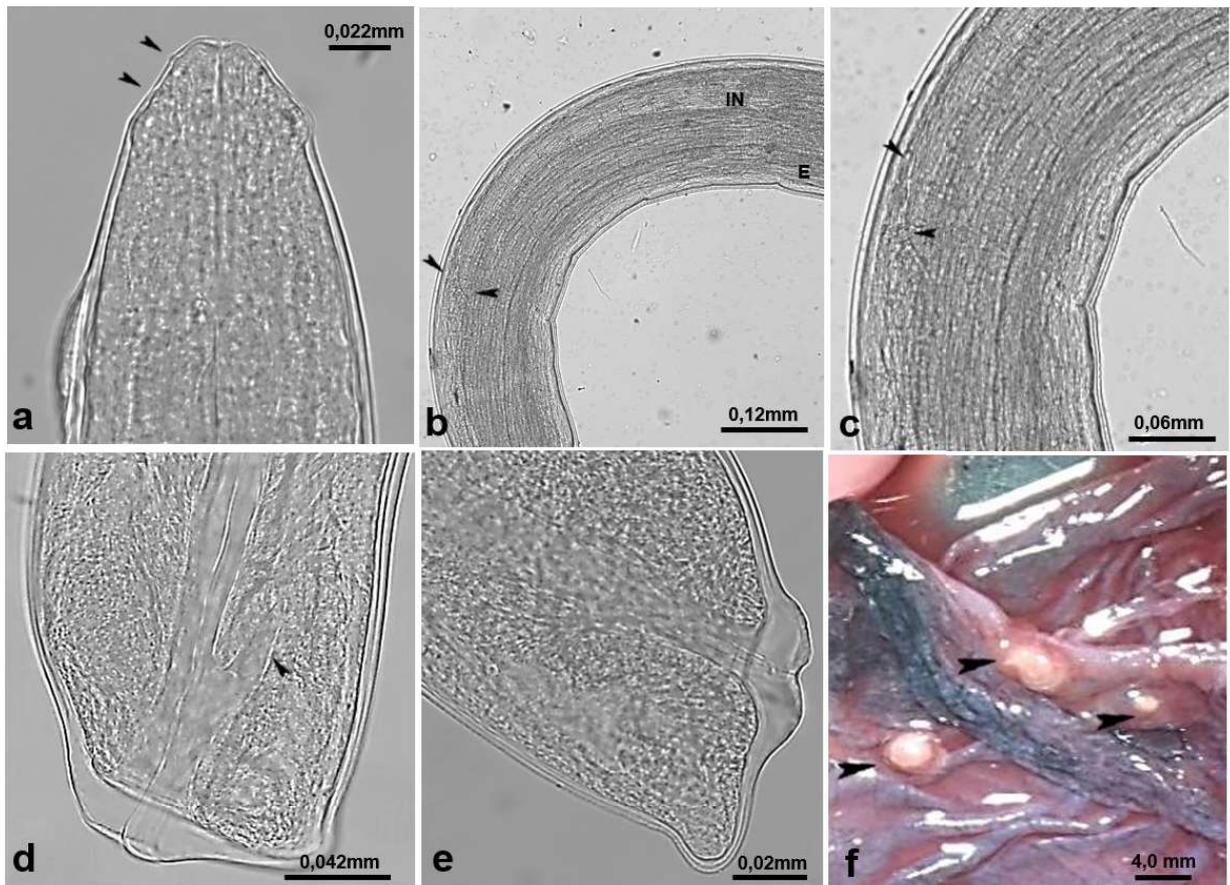


Figura 6 – *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Dioctophymatidae) (larvas de terceiro estágio) encontradas na membrana estomacal e superfície dos rins de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** região anterior da larva, setas indicam as papilas cervicais; **b)** fêmea de *D. renale*, setas apontam para o primórdio vulvar próximo a junção do esôfago (E) e intestino (IN); **c)** detalhe do primórdio vulvar da fêmea; **d)** região posterior do macho, seta aponta para o primórdio genital; **e)** região posterior da fêmea; **e)** parasitos encistados na serosa estomacal.

3.1.2 Filo Platyhelminthes

Classe Trematoda

***Brachylaima* sp.** (Brachylaimidae) (Figura 7)

Cinco lagartos foram encontrados parasitados por *Brachylaima* sp. com 10,6% de prevalência e amplitude de infecção variando de 2 a 104 parasitos por hospedeiro (Tabela 1). Um total de 134 espécimes foi coletado, alguns aderidos ao intestino delgado, mas a maioria livre nos intestinos delgado e grosso do hospedeiro.

Embora os espécimes encontrados sejam formas imaturas, seguem as características morfológicas do gênero *Brachylaima*: corpo alongado; acetábulo na metade anterior do corpo; faringe musculosa; cecos intestinais irregulares terminando na extremidade posterior do corpo; útero intercecal; vitelárias se estendem da margem anterior do acetábulo até a margem anterior do testículo anterior; poro genital na margem anterior ao testículo anterior; gônadas (intercecais) localizadas na metade posterior do corpo próximo a extremidade posterior do corpo. A morfologia dos espécimes quando comparadas aos adultos apresentam menor tamanho dos testículos, glândulas ováricas e vitelinas reduzidas e ausência de óvulos.

Espécies de *Brachylaima* parasitam o trato alimentar de aves, mamíferos e raramente anfíbios (POJMAVSKA, 2002). No Brasil, quatro espécies de *Brachylaima* foram registradas em mamíferos (Muridae, Cricetidae; Didelphidae) e aves (Columbidae, Odontophoridae, Tinamidae) (TRAVASSOS; TEIXEIRA DE FEITAS; KOHN, 1969).

Neste estudo, a prevalência, abundância e intensidade média de infecção encontradas para *Brachylaima* sp. em *S. merianae* foram baixas corroborando com os dados registrados em outras espécies de lagartos (Squamata) que também apresentaram formas imaturas do parasito.

Formas imaturas de *Brachylaima* sp. foram encontradas em *Podarcis bocagei* (Seoane, 1884) (Lacertidae) (P=0,9%) na Espanha (ROCA; LÓPEZ-BALAGUER; HORNERO, 1989). Em *Podarcis pityusensis* (Boscá, 1883) (P=0,2%) (n=564) e *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874) (P=0,8%; AM=0,01; IM=1,3) (n=386) nas Ilhas Baleares (ROCA, 1996).

Em *P. bocagei* (P=0,4%) (n=249) e *Podarcis carbonelli* Pérez Mellado, 1981 (Lacertidae) (P=1,2%; AM=4,7; IM=0,05) (n=257) em Portugal (GALDÓN; ROCA; BARBOSA; CARRETERO, 2006). E em *Lacerta trilineata* Bedriaga, 1886 (Lacertidae) (P=9%; AM=0,4; IM=5) (n=38) e *Chalcides ocellatus* (Forskal, 1775) (Scincidae) (P=2,2%; AM=0,02; IM=12) (n=45) na Turquia (INCEDOGAN; YILDIRIMHAN; BURSEY, 2014; YILDIRIMHAN; BURSEY; ALTUNEL, 2011).

Segundo Galdón *et al.* (2006) esses parasitos são considerados atípicos em lagartos.

O ciclo de vida de *Brachylaima* inclui dois gastrópodes terrestres como hospedeiros intermediários e, como hospedeiro definitivo, aves, mamíferos e menos frequentemente anfíbios e répteis (BUTCHER; GROVE, 2001). É provável que a infecção por *Brachylaima* sp. em *S. merinae* ocorreu através da alimentação, uma vez que gastrópodes fazem parte da dieta do hospedeiro (KIEFER; SAZIMA, 2002) e foram encontrados no conteúdo estomacal do teiú durante as necrópsias.

Dois casos de infecção por *Brachylaima* em humanos foram registrados no sul da Austrália e estão associados à ingestão de gastrópodes de forma acidental juntamente com vegetais crus (BUTCHER; GROVE, 2001; BUTCHER, 2016). Embora no Brasil não haja casos de infecção em humanos, a ocorrência de *Brachylaima* em *S. meriana* serve como alerta para possíveis infecções em outros animais que são predadores naturais do lagarto, tais como os mamíferos carnívoros: *Procyon cancrivorus* (Cuvier, 1789) e *Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758 (QUINTELA; LOB; ARTIOLI, 2014; RANGEL; NEIVA, 2013), uma vez que o digenético tem potencial zoonótico, e os predadores podem manter sua dispersão.

Registros de Trematoda para *S. meriana* ainda não haviam sido feitos, e uma nota de ocorrência da espécie foi publicada (Apêndice B).

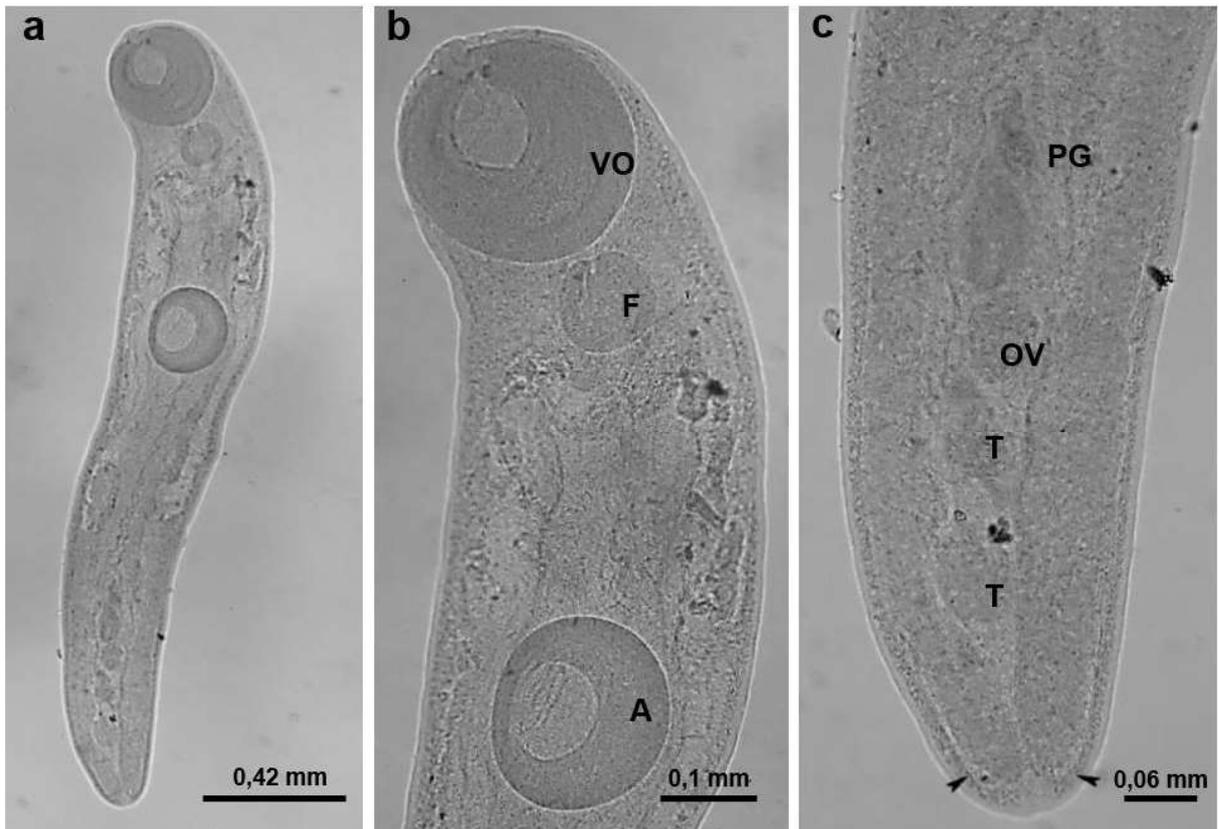


Figura 7 – *Brachylaima* sp. (Brachylaimidae) (forma imatura) encontrado no intestino delgado e grosso de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** espécime de *Brachylaima* sp.; **b)** primeiro terço do corpo, ventosa oral (VO), faringe (F) e acetábulo (A); **c)** último terço do corpo, poro genital (PG), testículos (T), ovário (OV), setas indicam os cecos.

3.1.3 Filo Acanthocephala

***Centrorhynchus* sp.** (Centrorhynchidae) (Figura 8)

Foram encontrados 70 espécimes de *Centrorhynchus* sp. em sete lagartos P=14,9%, AM=1,5, IM=10 com amplitude de infecção de 1 a 45 parasitos por hospedeiro. Os acantocéfalos foram encontrados livres no intestino delgado e grosso dos hospedeiros. Entretanto a identificação da espécie não foi possível, todos os espécimes eram formas imaturas e não apresentavam os órgãos reprodutores desenvolvidos, características morfológicas que auxiliam em sua taxonomia de acordo com Yamaguti, (1963) e Petrochenko, (1971).

Para a identificação genérica, características da armadura da probóscide tais como: o número de linhas longitudinais de ganchos, o número de ganchos por linha, o tamanho dos ganchos, a morfologia e o tamanho de suas raízes são as que apresentam maior valor taxonômico segundo Golvan (1956).

Os acantocéfalos são considerados parasitos com ciclos biológicos complexos e heteróxenos (BAUER *et al.*, 2005). Espécies de *Centrorhynchus* Lühe, 1911 possuem ampla distribuição geográfica e apresentam comumente pássaros e mamíferos como hospedeiros definitivos, artrópodes terrestres como hospedeiros intermediários e anfíbios, répteis ou mamíferos insetívoros como hospedeiros paratênicos (CROMPTON; NICKOL, 1985). Segundo Tarello (2009) quando os acantocéfalos penetram e se fixam com a probóscide na mucosa do intestino do hospedeiro, podem causar inflamações e nódulos.

Atualmente *Centrorhynchus* é composto por 104 espécies (AMIN, 2013; SMALES, 2013; AMIN *et al.*, 2015; SMALES *et al.*, 2017; STEINAUER *et al.*, 2019). Para o Brasil, são listadas apenas cinco espécies: *Centrorhynchus tumidulus* (Rudolphi, 1819); *Centrorhynchus giganteus* Travassos, 1921; *Centrorhynchus opimus* Travassos, 1925, que posteriormente foi transferido para *Sphaerirostris*; *Centrorhynchus polymorphus* Travassos, 1925 e *Centrorhynchus* sp. (TRAVASSOS, 1926; YAMAGUTI, 1963).

Autores registraram diversos hospedeiros paratênicos no ciclo biológico das espécies de *Centrorhynchus*, tais como: anfíbios, cobras aquáticas e outros répteis (KENNEDY, 2006; TRAVASSOS, 1926; CROMPTON; NICKOL 1985). No Brasil, os registros de répteis atuando como hospedeiros paratênicos de *Centrorhynchus*

(presença de cistacantos/parasito encistado) constam de *C.tumidulus* encontrado na cavidade corporal de *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758), *Tupinambis teguixin* (Linnaeus, 1758) (Squamata: Teiidae) e *Tropidurus torquatus* (Wied-Neuwied) (Squamata: Tropiduridae) (ÁVILA; SILVA, 2010).

A presença de *Centrorhynchus* em hospedeiros paratênicos e/ou acidentais pode ser resultado da ingestão de artrópodes, isópodos terrestres e coleópteros (AMATO *et al.*, 2003; HAMANN *et al.*, 2006). Segundo Brooks e Hoberg (2000) os parasitos podem indicar as preferências alimentares e modo de forrageamento dos hospedeiros.

S. merianae é onívoro e possui uma dieta muito variada. Durante as necrópsias observou-se a presença de artrópodes (insetos, aranhas, crustáceos), outros invertebrados (ex: moluscos) e ocasionalmente pequenas aves, anuros e mamíferos como item alimentar consumido pelo lagarto.

Esta é a primeira vez que se registram parasitos do Filo Acanthocephala em *S. merianae*.

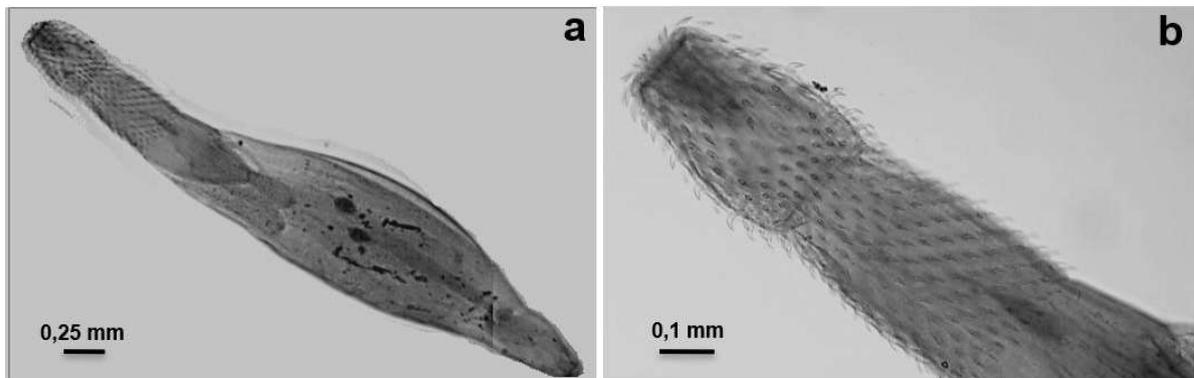


Figura 8 - *Centrorhynchus* sp. (Centrorhynchidae) (forma imatura) encontrado no intestino delgado e grosso de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil. **a)** espécime de *Centrorhynchus* sp.; **b)** região anterior com detalhe da probóscide e dos ganchos.

4 Conclusões

Salvator merianae apresentou uma fauna parasitária composta por seis *taxa* de helmintos.

Pela primeira vez registra-se *Cruzia bralisiensis*, *Dioctophyme renale* (larvas de terceiro estágio), e formas imaturas de *Brachylaima* sp. e *Centrorhynchus* sp. para o hospedeiro. Os demais parasitos encontrados não haviam sido descritos para a região sul do Brasil.

O presente estudo contribui para o conhecimento parasitológico associado à *S. merianae* e estende a distribuição geográfica dos parasitos encontrados para o Sul do Brasil e Bioma Pampa, além de apresentar seus índices parasitológicos de infecção.

Capítulo 2:

Caracterização molecular e análises filogenéticas de *Diaphanocephalus galeatus*, *Physaloptera tupinambae* e *Cruzia brasiliensis* (Nematoda) parasitos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil

1 Introdução

O conhecimento da diversidade de parasitos que acometem animais silvestres pode ser considerado um bom indicador de saúde dos ecossistemas, uma vez que reflete a filogenia e as condições que permitem a simbiose entre eles e, portanto, as pressões evolutivas sobre ambos (BRANDÃO *et al.*, 2009).

O estudo da fauna parasitária de répteis pode contribuir para o entendimento da biologia dos seus hospedeiros, fornecendo informações que poderão ser utilizadas em estudos de conservação das populações, uma vez que os aspectos da ecologia populacional dos parasitos podem ter implicações diretas na biologia das populações hospedeiras (MCCOY *et al.*, 2003; WICKSTRÖM *et al.*, 2003).

A taxonomia clássica de helmintos é fundamentada em características morfológicas e anatômicas, baseando-se em medições e comparação de estruturas (MOURA, 2006). Entretanto essa forma muitas vezes é inconclusa, e a utilização de outros métodos de análise que auxiliem a identificação de espécies, como a biologia molecular, se torna cada vez mais necessária. A biologia molecular é uma ferramenta que tem possibilitado o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (FREELAND, 2005; TENEVA, 2009), e a associação entre métodos morfológicos e moleculares tem se tornado uma alternativa mais efetiva para identificação de parasitos (PIRES; MARINONI, 2010; WILL *et al.*, 2005).

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular dos helmintos parasitos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil, recorrendo a técnicas de biologia molecular, complementares às clássicas técnicas morfológicas. Além disso, inferir as relações filogenéticas dos parasitos estudados em seus respectivos *taxa* (ou táxons) com base em sequências de DNA ribossômico.

2 Material e métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPASIL), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e em laboratório anexo a este para a realização das técnicas moleculares. Uma parte dos procedimentos e análises moleculares foi realizada na Universidade do Porto (UPorto), Faculdade de Ciências (FCUP), Laboratório de Patologia Animal, durante o período de mobilidade (PDSE).

2.1 Coleta e caracterização molecular dos hospedeiros

Foram examinados 47 espécimes de *S. merianae* (21 machos e 26 fêmeas) para busca de helmintos, oriundos dos municípios de Pelotas (31°46'19"S 52°20'33"W), Capão do Leão (31°46'3"S 52°26'55"W), Morro Redondo (31°35'18"S 52°37'47"W) e Rio Grande (32°1'60"S 52°5'55"W) Rio Grande do Sul, Brasil. Trinta e oito vítimas de atropelamentos e coletados em rodovias (licença para coleta: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade/ICMBIO-SISBIO 38913-1/38913-5 e aprovação do estudo: Comissão de Ética em Experimentação Animal CEEA/UFPel nº 8876), e nove exemplares doados pelo Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre e Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Pelotas (NURFS-CETAS/UFPel) após o óbito durante processo de reabilitação.

Oito lagartos foram examinados ainda frescos, e os outros 39 foram armazenados a -20° para análise posterior. Os nematoides encontrados foram preparados e identificados segundo bibliografia específica (COSTA, 1965; FREITAS; LENT, 1938; LICHTENFELS, 1980; PEREIRA *et al.*, 2012). Exemplares de *Diaphanocephalus galeatus*, *Physaloptera tupinambae* e *Cruzia brasiliensis* foram preservados em etanol 70%. Todos foram lavados em solução fisiológica antes de cada extração.

Os nematoides tiveram sua porção intermediária utilizada para a extração de DNA e suas porções anteriores e posteriores preparadas entre lâmina e lamínula, e

clarificadas com lactofenol de Aman e/ou glicerina para registro fotográfico e testemunho morfológico.

2.1.1 Extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a extração do DNA genômico, fragmentos do nematoide *P. tupinambae* foram macerados em tubos com uma solução de 70µL de SDS 10% e 6µL de proteinase K 33%, e mantidos em banho-maria a 55°C por aproximadamente 48 horas. As etapas posteriores foram executadas conforme o protocolo do fenol-clorofórmio estabelecido por Sambrook *et al.* (1989). Todas as amostras de DNA extraído foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare) utilizando-se 2µL do DNA.

O gene 18S do cluster do DNA ribossômico (DNAr) nuclear foi amplificado utilizando os primers Nem18SF, 5'-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC-3' e Nem18SR, 5'-GGGCGGTATCTGATCGCC-3' (FLOYD *et al.*, 2005).

A reação consistiu de uma alíquota de 150-200ng de DNA genômico, 0,5µM de cada primer, 12,5µL de mix de PCR 2X (GoTaq® Green Master Mix – Promega) e água ultrapura para completar o volume final de 25µL.

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5min, 35 ciclos a 95°C por 1min, 50°C por 1min, 72°C por 1min e uma extensão final a 72°C por 8min, seguido de resfriamento a 4°C. Em cada PCR realizada foram utilizados controles negativos (mix e água).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,2% corado com Blue Green Loading Dye I (LGC) em solução de TBE 0,5X (Tris-base 0,4M; ácido bórico 0,20M, solução de EDTA 0,5M, pH 8,0). O marcador de peso molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Promega). Os géis foram observados e fotografados em um transiluminador (L-Pix EXSystem Loccus Biotecnologia).

Os amplicons foram purificados utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), e submetidos ao sequenciamento automático pela

empresa MacroGen Advancing through Genomics (Coréia do Sul) (<http://www.macrogen.com/>).

A identificação preliminar das sequências obtidas foi feita por comparação com as disponíveis na base de dados do GenBank através de pesquisa por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool-BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.1.2 Extração de DNA com kit comercial e PCR

O DNA genômico dos parasitos *D. galeatus*, *P. tupinambae* e *C. brasiliensis* foi extraído utilizando o kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. Para facilitar a digestão do tecido, os nematoides foram cortados e macerados, individualmente.

As regiões alvo do estudo, gene 18S e 28S do cluster do DNA ribossômico (DNAr), e a região do ITS (compreendida pelos dois espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S DNAr) foram amplificadas por PCR utilizando-se os *primers* representados na Figura 1 e apresentados na Tabela 1.

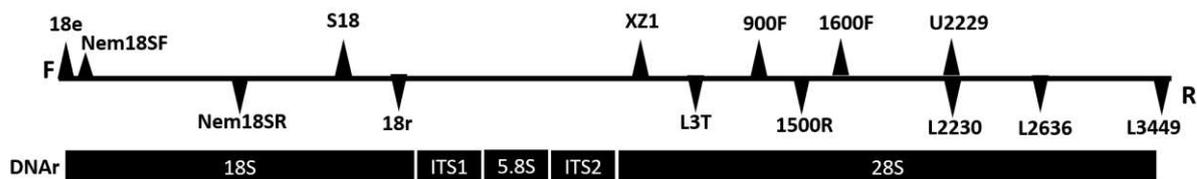


Figura 1: Diagrama esquemático dos primers utilizados para amplificar cada região do cluster do DNA ribossômico (DNAr).

A reação consistiu de uma alíquota de 2µL de DNA genômico, 0,2 µM de cada primer, 1x de tampão de reação da Taq polimerase (5U/µl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPmix (NZYTech, Lisboa Portugal), 1,25 unidades de Taq DNA polimerase recombinante (NZYTech), e 17,5 µL de H₂O ultrapura para completar o volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min., 35 ciclos a 95°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 2 min. e uma extensão final a 72°C por 7 min., seguido de resfriamento a 4°C. Controles negativos (mix e água) foram utilizados em cada PCR.

Tabela 1 - Primers utilizados para realização da PCR.

Região alvo / Primer	Sequência dos primers no sentido 5'-3'	Pareado com	Referência
28S DNAr			
XZ1F	ACCCGCTGAATTTAAGCATAT	1500R	PALM <i>et al.</i> (2009)
900F	CCGTCTGAAACACGGACCAAG	L2230R	WAESCHENBACH <i>et al.</i> (2007)
1600F	GCAGGACGGTGGCCATGGAAG	L2630R	WAESCHENBACH <i>et al.</i> (2007)
U2229F	TACCCATATCCGCAGCAGGTCT	L3449R	WAESCHENBACH <i>et al.</i> (2007)
1500R	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG	XZ1F	WAESCHENBACH <i>et al.</i> (2007)
L2230R	AGACCTGCTGCGGATATGGGT	900F	LOCKYER <i>et al.</i> (2003)
L2630R	GGGAATCTCGTTAATCCATTCA	1600F	WAESCHENBACH <i>et al.</i> (2007)
L3449R	ATTCTGACTTAGAGGCGTTCA	U2229F	LOCKYER <i>et al.</i> (2003)
ITS DNAr			
S18F	TAACAGGTCTGTGATGCC	L3TR	JOUSSON <i>et al.</i> (1999)
L3TR	CAACTTCCCTCACGGTACTTG	S18F	JOUSSON <i>et al.</i> (1999)
18S DNAr			
Nem18SF	CGCGAATRGCTCATTACAA CAGC	Nem18SR	FLOYD <i>et al.</i> , 2005
Nem18SR	GGGCGGTATCTGATCGCC	Nem18SF	FLOYD <i>et al.</i> , 2005
18rR	CTACGGAAACCTTGTTACG	Nem18SF	WHIPPS <i>et al.</i> , 2003

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese através de um gel de 1% de agarose 1X Tris-acetato-EDTA (TAE) corado com GreenSafe Premium (NZYTech). Os amplicons foram submetidos ao sequenciamento pela STAB VIDA (Caparica, Portugal).

A identificação preliminar das sequências de DNA obtidas foi feita por comparação com as disponíveis na base de dados do GenBank através de pesquisa por BLAST para busca de sequências similares de cada espécie. Os fragmentos de DNA foram editados e agrupadas sequências consensos das regiões de interesse.

2.2 Edição das sequências e análises filogenéticas

As análises filogenéticas das espécies de helmintos estudadas foram trabalhadas em níveis taxonômicos distintos devido à escassez de informações moleculares disponíveis. Para o nematoide *D. galeatus* sequências de 28S e ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) DNAr foram alinhadas usando o MAFFT v7.429 (KATO; HASEGAWA; YANO; & NISHIMOTO, 2002).

STANDLEY, 2013), com a estratégia de alinhamento múltiplo L-INS-i e parâmetros padrões. As análises filogenéticas foram realizadas separadamente para cada região do DNAr utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML) no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), e Inferência Bayesiana (BI) em MrBayes v3.2.6 (RONQUIST *et al.*, 2012). As análises foram realizadas a nível de Superfamília utilizando representantes de Strongylida. *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) e *Heterorhabditis zealandica* (Poinar, 1990) (Nematoda: Rhabditidae) foram utilizados como grupo externo.

Para as análises de ML, o melhor modelo evolutivo foi escolhido utilizando a opção “Find Best DNA/Protein Models (ML)” no software MEGA X, foi utilizado o modelo geral reversível no tempo (GTR) com distribuição Gamma (G) e sítios invariáveis (I), com 1000 repetições de bootstrap e, para a BI, as probabilidades posteriores foram estimadas pelo método de Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC), de 10.000.000 gerações com 4 cadeias MCMC simultâneas e 2 corridas independentes, amostradas em intervalos de 100 árvores e 25% de burn-in. As árvores foram editadas e anotadas no FigTreev1.4.4. (RAMBAUT; DRUMMOND, 2016) e Inkscapev0.92.4. (<https://inkscape.org/>).

Para *C. brasiliensis* as sequências de 18S, 28S e ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) foram editadas e concatenadas no Mega X e alinhadas pelo software *Clustal W* (THOMPSON *et al.*, 1994) com as sequências dos representantes próximos obtidas do GenBank. *Strongyluris calotis* Baylis & Daubney 1923 (Nematoda: Heterakidae) foi utilizado como grupo externo. As análises filogenéticas foram realizadas através da ML também no MEGAX e BI no MrBayes v3.2.6.

O software PartitionFinder (LANFEAR *et al.*, 2017) foi utilizado para selecionar o melhor esquema de particionamento e o modelo de evolução molecular para análises filogenéticas. Para as análises de ML, foi utilizado modelo GTR+I com 1000 repetições de bootstrap e, para a BI, as probabilidades posteriores foram estimadas pelo método de MCMC, de 15.000.000 gerações com 4 cadeias MCMC simultâneas, 2 corridas independentes e 25% de burn-in. As árvores foram editadas e anotadas no FigTreev1.4.4. As análises foram realizadas a nível de Superfamília utilizando representantes de Ascaridida.

Physaloptera tupinambae teve as sequências do cluster ITS1-5.8S-ITS2 tratadas e alinhadas no Mega X e *ClustalW* para a realização das análises filogenéticas. As análises foram realizadas a nível de Família utilizando representantes de Physalopteridae. *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902

(Nematoda: Gnathostomatidae) foi utilizado como grupo externo. O melhor modelo evolucionário foi escolhido utilizando o software PartitionFinder. Para as análises de ML, foi utilizado modelo de Kimura-2-parâmetros (K2P) com distribuição Gamma e 1000 repetições de bootstrap e, para a BI, o método utilizado foi GTR+I+G sendo as probabilidades posteriores estimadas pelo método MCMC, de 20.000.000 gerações com 4 cadeias MCMC simultâneas, 2 corridas independentes e 25% de burn-in. As árvores foram editadas e anotadas no FigTree v1.4.4.

Todas as sequências obtidas no presente estudo foram depositadas no banco de dados GenBank. Através do BLAST os representantes próximos de cada espécie tiveram suas sequências baixadas do mesmo banco de dados para a montagem das árvores filogenéticas.

3 Resultados e discussão

3.1 *Diaphanocephalus galeatus*

Foram obtidas sequências do gene 28S e da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNAr. A amplificação por PCR do gene 18S DNAr não teve êxito. Os fragmentos de PCR da região ITS DNAr resultaram em uma sequência de 1.409pb (GenBank: MN592675), incluindo uma porção final do gene 18S e uma porção inicial do 28S DNAr. Para a região 28S DNAr foi obtida uma sequência de 3.153pb (GenBank: MN589648).

A única sequência disponível no GenBank para a espécie é oriunda de *Dracaena paraguayensis* Amaral, 1950 (Squamata: Teiidae) proveniente do estado do Mato Grosso do Sul no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2019), e corresponde apenas à região D2-D3 do gene 28S DNAr. Essa sequência quando comparada à de *D. galeatus* do presente estudo, apresentou oito sítios variáveis. A fim de confirmar a identificação, uma nova sequência do mesmo gene com 593pb (GenBank: MH134561), foi obtida de um segundo espécime de *S. merianae*, e permaneceu idêntica, apresentando os mesmos 8 polimorfismos.

Diaphanocephalus galeatus do presente estudo é morfologicamente idêntica à registrada por Pereira *et al.* (2019). Entretanto, essa variação genética deve-se ao fato

de que a região D2-D3 do 28S DNAr geralmente apresenta alta divergência sequencial, mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (DE LEY *et al.*, 2005).

De acordo com as chaves taxonômicas de Anderson *et al.* (2009) Strongylida consiste de cinco superfamílias: Ancylostomatoidea, Diaphanocephaloidea, Strongyloidea, Metastrongyloidea and Trichostrongyloidea.

Diaphanocephalidae Travassos, 1920 engloba dois gêneros, *Diaphanocephalus* Diesing, 1851 registrado comumente parasitando o intestino delgado de lagartos na América do Sul e *Kalicephalus* Molin, 1861 que tem distribuição cosmopolita e é registrado parasitando serpentes e, raramente, lagartos (LICHTENFELS, 1980).

A topologia de ambas as árvores (Figura 2a-b) foi similar, e mostram as mesmas relações entre as espécies de Diaphanocephalidae com as demais superfamílias de Strongylida. A posição de Diaphanocephaloidea, mais próxima de Strongyloidea e Ancylostomatoidea e mais distante de Trichostrongyloidea e Metastrongyloidea, corrobora com os resultados de Chilton *et al.* (2006) e Pereira *et al.* (2019).

Chilton *et al.* (2006) sugeriram que o uso de uma região mais variável, como o primeiro e o segundo espaçadores internos transcritos ribossômicos, juntamente com os dados do gene 28S DNAr, poderiam fornecer caracteres mais informativos para examinar as relações desses *taxa*.

Pela primeira vez uma sequência da região ITS do DNAr de *D. galeatus* foi obtida. A sequência de ITS DNAr utilizada neste estudo nos permitiu reafirmar a posição filogenética de *D. galeatus* em Diaphanocephaloidea e complementar os dados existentes com a inclusão de sequências de novas regiões da espécie.

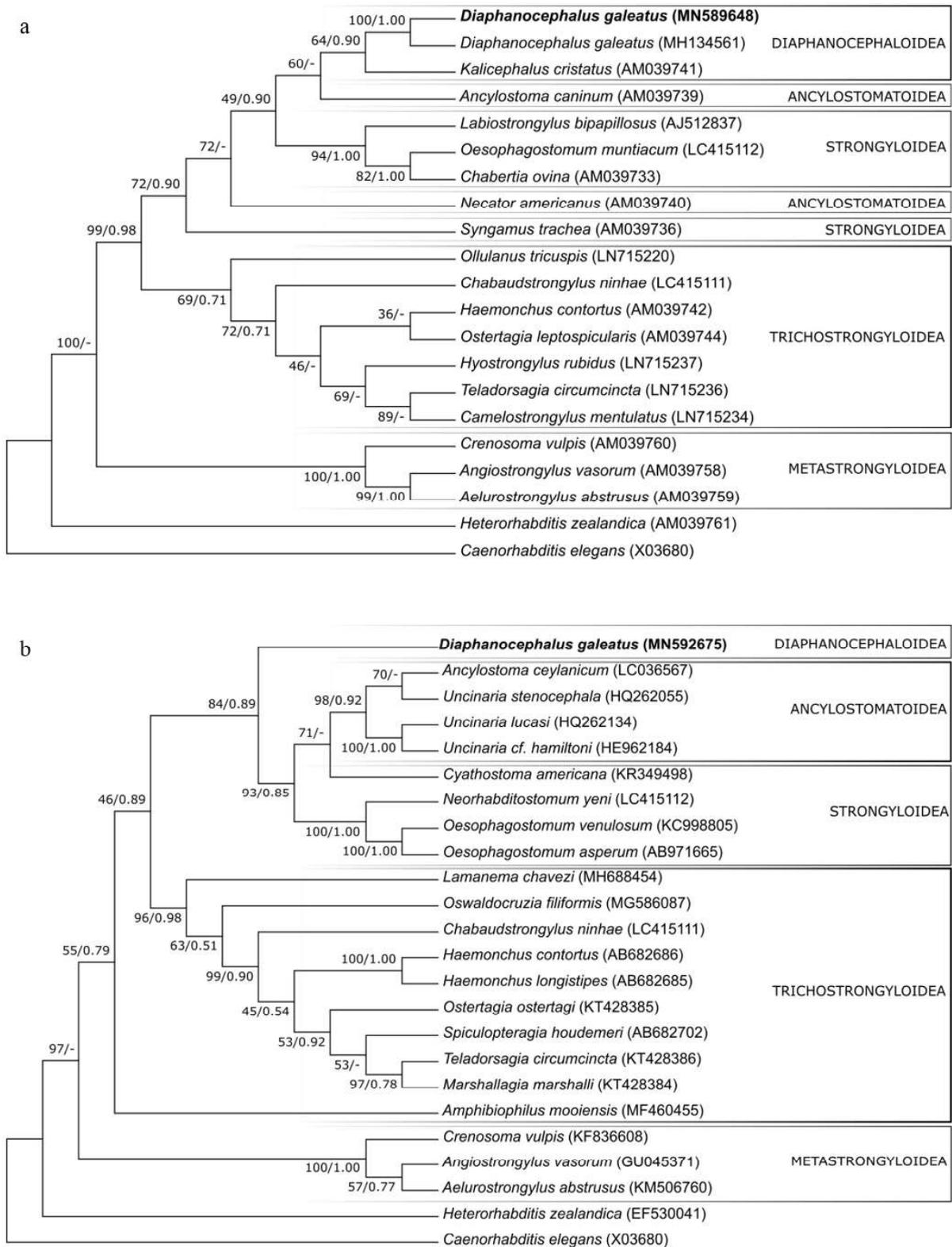


Figura 2 - (a) Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança com base na região 28S DNAr de *Diaphanocephalus galeatus* e outras espécies de Strongylida; **(b)** Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima verossimilhança com base na região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) de *D. galeatus* e outras espécies de Strongylida. Os valores nos nós representam os valores de bootstrap e as probabilidades Bayesianas posteriores, respectivamente. Traços indicam nós não presentes nas árvores de Inferência Bayesianas.

3.2 *Cruzia brasiliensis*

Para *C. brasiliensis* foram obtidas sequências do gene 18S e da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNAr. A amplificação e montagem dos fragmentos de PCR do gene 18S resultou numa sequência de 1.636bp (GenBank: MT809126), e para a região ITS numa sequência de 1.447bp, incluindo uma porção final do gene 18S (\approx 334bp) e uma porção inicial do gene 28S DNAr (\approx 307bp), ficando a região do ITS com cerca de 806bp. As sequências foram concatenadas gerando uma sequência consenso com 2806pb (GenBank: MT809125).

Duas sequências de *Cruzia americana* (Maplestone, 1930) parasito de *Didelphis virginiana* (Kerr, 1792) (Mammalia: Masupialia) de Hammond, Luisiana, USA estão disponíveis no GenBank, (18S e 28S DNAr) (NADLER; HUDSPETH, 1998; 2000). Ambas foram concatenadas e alinhadas à consenso do presente estudo, juntamente com os representantes mais próximos de Ascaridida.

Nenhum estudo filogenético foi realizado anteriormente sobre espécies de *Cruzia*. Para as análises do presente estudo, ao realizar o BLAST, foram escolhidos apenas representantes de Ascaridida, devido à escassez de dados para Kathlanidae e espécies de *Cruzia*. Estudos anteriores foram realizados para Ascaridoidea e utilizaram *C. americana* apenas como grupo externo (NADLER; HUDSPETH, 1998; 2000).

Árvores estimadas por ML e BI com todos os representantes de Ascaridida próximos geneticamente de *C. brasiliensis* foram geradas, e a topologia e agrupamento das famílias foi idêntica à apresentada nas figuras 3 e 4. Portanto optamos por apresentar uma análise mais enxuta, utilizando apenas os representantes que tiveram até 96% de semelhança ao BLAST.

A topologia das árvores estimadas por ML e BI foi muito similar (Figura 3 e 4). Segundo o BLAST, a sequência de *C. brasiliensis* do presente estudo tem uma semelhança de 99,7% com *C. americana* (U94371), na realidade essa similaridade corresponde a apenas 59% de cobertura, ou seja, à porção do 18S DNAr da sequência do presente estudo. Essa proximidade pode ser observada no clado formado entre as espécies, no entanto *C. americana* parece ter sua linhagem independente.

Representantes das superfamílias formaram grupos distintos em ambas as árvores com suportes fortes, enquanto que entre as famílias de Ascaridoidea as relações não foram bem resolvidas apresentando valores de suporte mais fracos.

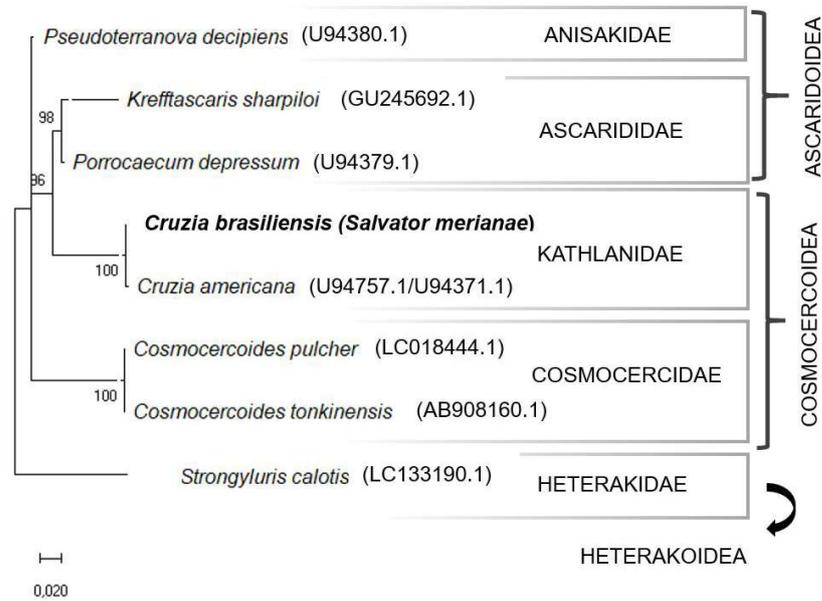


Figura 3 - Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança com base na região 18S e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNAr *Cruzia brasiliensis* e outros representantes de Ascaridida. Os valores nos nós representam os valores de bootstrap.

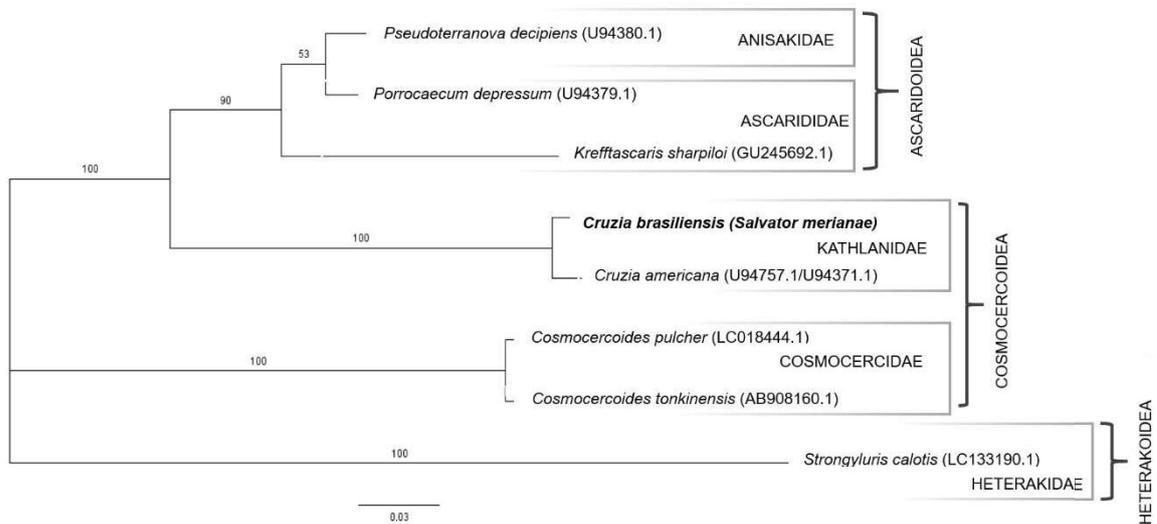


Figura 4 - Relações filogenéticas estimadas por Inferência Bayesiana com base na região 18S e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNAr de *Cruzia brasiliensis* e representantes de Ascaridida. Os valores nos nós representam os valores das probabilidades Bayesianas.

3.3 *Physaloptera tupinambae*

Foram obtidas sequências do gene 18S e da região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) DNAr de *P. tupinambae*. Os fragmentos de PCR resultaram em uma sequência de 1.081bp (GenBank: MT809124), incluindo uma porção inicial do gene 28S DNAr (≈314 bp), ficando a região do ITS com cerca de 767bp (podendo faltar o início do ITS1 pois o fragmento 'forward' não amplificou por completo). Para a região 18S DNAr foram obtidas sequências de cinco espécimes diferentes que se apresentaram idênticas. A montagem dos fragmentos de PCR resultou em uma sequência consenso de 931pb (GenBank: MT810006).

Não existem sequências de *P. tupinambae* depositadas no GenBank, assim como não existem dados disponíveis para a região ITS DNAr de *Physaloptera*. Estudos realizados para o grupo utilizam frequentemente a região 18S DNAr ou a subunidade 1 do citocromo c oxidase mitocondrial (COI). Dessa forma optou-se por realizar as análises filogenéticas com base apenas no gene 18S DNAr.

A topologia das árvores filogenéticas (Figuras 5 e 6) construídas pela análise de ML e BI foi similar, e alguns grupos tiveram sua posição mantida em ambas com alto suporte de bootstrap, a exemplo das espécies que parasitam aves.

Physaloptera tupinambae e *P. amazonica* apresentam linhagens independentes, separadas das outras espécies, corroborando com sua especiação mais recente. E assim como observado nos estudos de Maldonado *et al.*, (2020) os dados moleculares apontam uma relação mais próxima com outras espécies neotropicais.

Physaloptera thalacomys, *P. rara* e *Physaloptera* sp. (EF180065.1) todas oriundas de mamíferos dos EUA foram recuperadas em uma posição mais próxima à raiz da árvore, provavelmente tenham derivado de uma linhagem mais antiga ou diversificado antes, conforme apresentado também nas filogenias realizadas por Barros (2015) e Maldonado *et al.* (2019).

As relações dentro do gênero não foram bem resolvidas e revelaram uma fraca resolução para espécies representativas. Conforme observado por Barros (2015) as espécies de *Physaloptera* apresentam diversificação quase que simultânea, podendo ser atribuído a hipótese de filogenia estrelada ou não resolvida, em que não é possível definir a ordem de ramificação das linhagens. Além disso, estudos de inferência filogenética para Physalopteridae tem revelado inconsistência quando da utilização do

grupo de hospedeiro e a distribuição geográfica dos parasitos como parâmetros auxiliares para a classificação das espécies.

Com a presente análise foi possível propor o posicionamento *P. tupinambae* dentro do gênero, porém mais estudos são necessários para esclarecimentos sobre a história evolutiva das espécies.

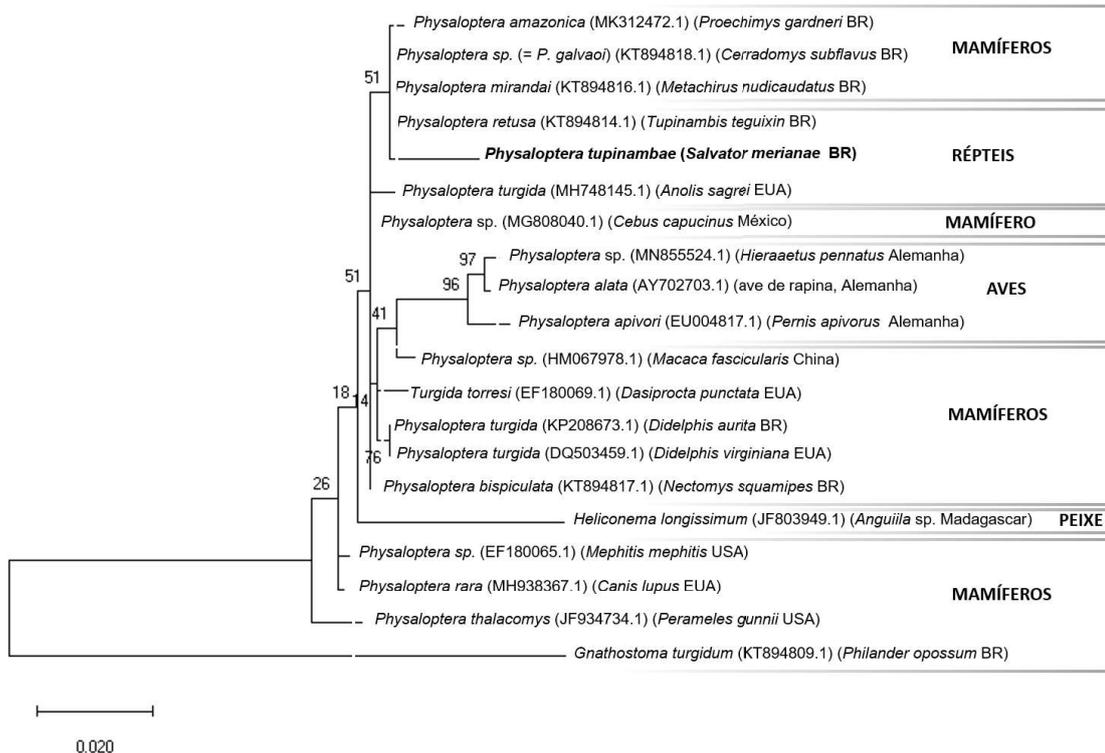


Figura 5 - Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança com base na região 18S DNAr de *Physaloptera tupinambae* e outros representantes de Physalopteridae. *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 (Gnathostomatidae) foi utilizado como grupo externo. Os valores nos nós representam os valores de bootstrap.

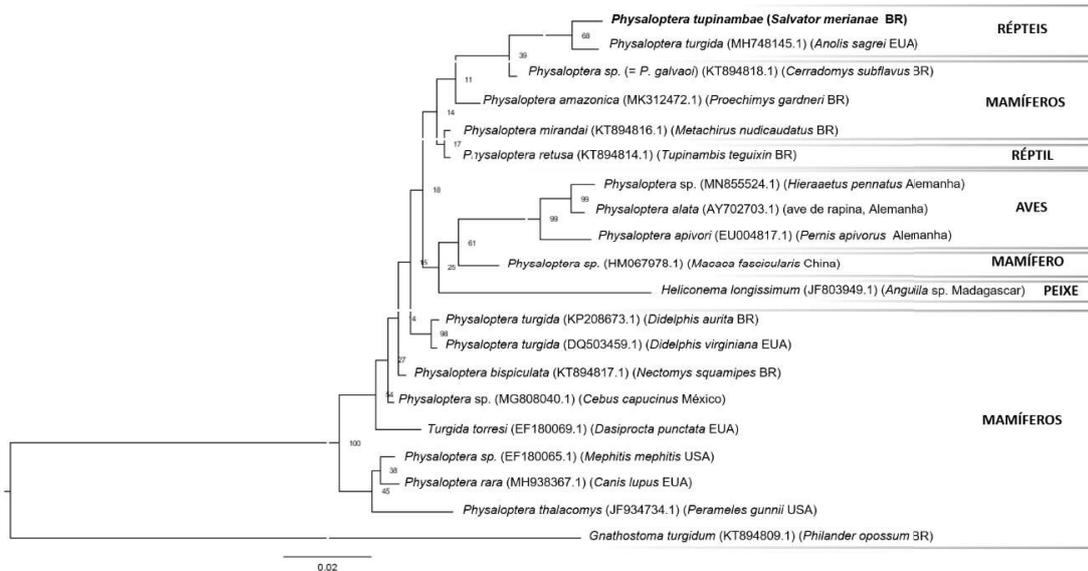


Figura 6 - Relações filogenéticas estimadas por Inferência Bayesiana com base na região 18S DNAr de *Physaloptera tupinambae* e outros representantes de Physalopteridae. *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 (Gnathostomatidae) foi utilizado como grupo externo. Os valores nos nós representam os valores das probabilidades Bayesianas.

4 Conclusões

Pela primeira vez foram obtidas sequências de DNAr de *D. galeatus*, *C. brasiliensis* e *P. tubinambae* provenientes de *S. merianae*.

Diaphanocephalus galeatus teve sua posição taxonômica reafirmada em Diaphanocephaloidea com base na análise do gene 18S e região ITS do DNAr.

Cruzia brasiliensis é congênera de *C. americana*, e sua posição em Ascaridida foi reafirmada com base em sequências do gene 18S e região ITS DNAr.

As relações dentro do gênero *Physaloptera* não foram bem resolvidas, no entanto, com base nas análises do gene 18S DNAr foi possível propor o posicionamento taxonômico de *P. tupinambae* dentro do gênero.

Com a realização deste estudo dados genéticos são fornecidos para as espécies parasitas de *S. merianae*. Esses dados complementam os já existentes e ampliam o conhecimento genético das espécies, disponibilizando novas sequências de diferentes regiões do DNAr.

Conclusões gerais

A diversidade de helmintos associada a *Salvator merianae* foi composta principalmente por nematoides (*Diaphanocephalus galeatus*, *Physaloptera tupinambae*, *Cruzia brasiliensis* e *Diectophyme renale*), sendo *D. galeatus*, *P. tupinambae* e *C. brasiliensis* os helmintos mais prevalentes da helmintofauna.

A diversidade foi composta ainda por *Centrorhynchus* sp (Acanthocephala) e *Brachylaima* sp (Trematoda), os quais são registrados pela primeira vez em *S. merianae*, assim como *D. renale* e *C. brasiliensis* (Nematoda).

Amplia-se para o sul do Brasil e Bioma Pampa o conhecimento sobre a ocorrência e distribuição geográfica dos parasitos *D. galeatus* e *P. tupinambae* encontrados no lagarto.

O estudo fornece pela primeira vez dados moleculares de *C. brasiliensis* e *P. tupinambae*, bem como fornece dados da região ITS do DNAr de *D. galeatus*.

Com base em regiões de 18S, 28S e ITS do DNAr foi possível inferir a posição filogenética e taxonômica de *D. galeatus*, *C. brasiliensis* e *P. tupinambae* em seus respectivos taxa.

Os dados morfológicos em conjunto com os moleculares forneceram maior suporte para confirmação e identificação das espécies encontradas.

Considerações finais

Esforços no intuito de complementar alguns pontos do estudo deverão ser realizados. Neste sentido, pretende-se:

- ✓ Realizar novas tentativas de microscopia eletrônica de varredura dos espécimes de *C. brasiliensis* para melhor visualização das estruturas. Duas tentativas foram realizadas, porém sem sucesso. Alguns espécimes já foram fixados seguindo uma nova metodologia que será testada;
- ✓ Depositar vouchers dos helmintos encontrados na Coleção Helmintológica do Laboratório (CHLAPASIL) e também em outras coleções de referência;
- ✓ Concluir as técnicas moleculares e as análises filogenéticas para as larvas de terceiro estágio de *Diotophyme renale*. Tentativas de extração de DNA e amplificação da região 18S do DNAr foram realizadas com diferentes *primers* e metodologias, todas sem sucesso;
- ✓ Publicar os resultados, apresentados nos capítulos, em periódicos de referência para a área ampliando o conhecimento da diversidade dos parasitos de *Salvator merianae* e fornecendo dados morfológicos e moleculares sobre os mesmos.

Além disso, amostras de tecidos (fígado, baço, cérebro, coração, pulmão, rins e músculo) foram coletadas e armazenadas a -20°C para investigação de protozoários, possibilitando a realização de estudos futuros com o hospedeiro.

Referências

- ABDALLAH, V. D.; DE AZEVEDO, R. K.; CARVALHO, E. D.; DA SILVA, R. J. New host and distribution records for nematode parasites of Freshwater fishes from Sao Paulo State, Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 6, n. 1, p. 43-57, 2012.
- ACHAVAL E.; OLMOS, A. J. B. **Anfibios y reptiles del Uruguay**. n. 597.6+ 598.1. 2003.
- ADNET, F. A. O.; ANJOS, D. H. S.; MENEZES-OLIVEIRA, A.; LANFREDI, R. M. Further description of *Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1917 (Nematoda: Cruzidae) by light and scanning electron microscopy. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1207-1211, 2009.
- AHO, J. M. Helminth communities of amphibians and reptiles: comparative approaches to understanding patterns and processes. In: **Parasite communities: patterns and processes**. Springer, Dordrecht, 1990.
- ALDEN, K. J. Helminths of the Opossum, *Didelphis virginiana*, in Southern Illinois, with a Compilation of all helminths reported from this host in North America. **Journal the Helminthological Society Washington**, v. 62, p. 197-208, 1995.
- ALHO, C.J. Sobre uma espécie nova do gênero *Diaphanocephalus* Diesing, 1851, parasita de lagarto da Amazônia (*Dracaena guianensis* Daudin) (Nematoda, Strongyloidea). **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi: Zoologia**, v. 59, 1965.
- AMATO, J. F.; AMATO, S. B.; ARAUJO, P. B.; QUADROS, A. F. First report of pigmentation dystrophy in terrestrial isopods, *Atlantoscia floridana* (van Name) (Isopoda, Oniscidea), induced by larval acanthocephalans. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 4, p. 711-716, 2003.
- AMATO, J. F. R.; AMATO, S. B. Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: **Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010.
- AMIN, O. M. Classification of the Acanthocephala. **Folia Parasitologica**, v. 60, n. 4, p. 273-305, 2013.
- AMIN, O. M.; HECKMANN, R. A.; WILSON, E.; KEELE, B.; KHAN, A. The description of *Centrorhynchus globirostris* n. sp. (Acanthocephala: Centrorhynchidae) from the pheasant crow, *Centropus sinensis* (Stephens) in Pakistan, with gene sequence analysis and emendation of the family diagnosis. **Parasitology Research**, v. 114, n. 6, p. 2291-2299, 2015.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Cabi, 2000.
- ANDERSON, R. C.; CHABAUD, A. G.; WILLMOTT, S. **Keys to the nematode parasites of vertebrates**: Archival Volume. London: UK: Ed. CABI, 2009.

ANDRADE, D. V.; SANDERS, C. O. L. I. N.; MILSOM, W. K.; ABE, A. S. Overwintering in tegu lizards. **Life in the cold: evolution, mechanisms, adaptation, and application**, p. 339-348, 2004.

ARCGIS. **Software Profissional de Mapeamento GIS 2D & 3D**. Disponível em: <<https://www.arcgis.com/index.html>> Acesso em: 05 out. 2019.

AVILA, L. J.; MARTÍNEZ, L. E.; MORANDO, M. Checklist of lizards and amphisbaenians of Argentina: an update. **Zootaxa**, p. 201-238, 2013.

ÁVILA, R. W. **Padrões de infecção por helmintos em comunidades de lagartos do Brasil central**. 2009. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2009.

ÁVILA, R. W.; ANJOS, L. A.; RIBEIRO, S. C.; MORAIS, D. H.; DA SILVA, R. J.; ALMEIDA, W. O. Nematodes of lizards (Reptilia: Squamata) from Caatinga biome, northeastern Brazil. **Comparative Parasitology**, v. 79, n. 1, p. 56-63, 2012.

ÁVILA, R. W.; CÁCERES, N. C.; FERREIRA, V. L.; SILVA, R. J. *Hoplocercus spinosus* (NCN). Endoparasites. **Herpetology Review**, v. 39, n. 1, p. 88-89, 2008.

ÁVILA, R. W.; CARDOSO, M. W.; ODA, F. H.; DA SILVA, R. J. Helminths from lizards (Reptilia: Squamata) at the Cerrado of Goiás state, Brazil. **Comparative Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 120-128, 2011.

ÁVILA, R. W.; SILVA, J. R. Checklist of helminths from lizards and amphisbaenians (Reptilia: Squamata) of South America. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p. 543–572, 2010.

ÁVILA, R. W.; SILVA, J. R. Helminths of lizards (Reptilia: Squamata) from Mato Grosso State, Brazil. **Comparative Parasitology**, v. 78, p. 129–139, 2011.

BARROS, D. M.; LORINI, M. L.; PERSSON, V. G. Dioctophymosis in the little grison (*Galictis cuja*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 4, p. 538-539, 1990.

BARROS, J. S. L. **Taxonomia morfológica e filogenia molecular de *Physaloptera* (Nematoda: Spirurida)**. 2015. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Saúde), Departamento de Ensino do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2015.

BAUER, A.; HAINE, E. R.; PERROT-MINNOT, M. J.; RIGAUD, T. The acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* alters the geotactic and clinging behaviours of two sympatric amphipod hosts: the native *Gammarus pulex* and the invasive *Gammarus roeseli*. **Journal of Zoology**, v. 267, n. 1, p. 39-43, 2005.

BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J. R.; MACKAY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSE,

L. M.;VIDA, J. T.; THOMAS, W. K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 71-75, 1998.

BLOUIN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcript spacer. **International Journal Parasitology**, v. 32, p. 527–531, 2002.

BORGES-MARTINS, M.; ALVES, M. L. M.; ARAUJO, M. D.; OLIVEIRA, R. D.; ANÉS, A. C. (2007). In BECKER, F.G.; ARANHA, R.A; MOURA, L.A (orgs). **Répteis**. Biodiversidade. Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul. Brasília, v. 25, p. 292-315, 2007.

BRANDÃO, M. L.; CHAME, M.; CORDEIRO, J. L. P.; CHAVES, S. A. M. Diversidade de helmintos intestinais em mamíferos silvestres e domésticos na Caatinga do Parque Nacional Serra da Capivara, Sudeste do Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 19-28, 2009.

BRITO, S. V.; CORSO, G.; ALMEIDA, A. M.; FERREIRA, F. S.; ALMEIDA, W. O.; NAJOS, L. A.; MESQUITA, D. O.; VASCONCELLOS, A. Phylogeny and microhabitats utilized by lizards determine the composition of their endoparasites in the semiarid Caatinga of Northeast Brazil. **Parasitology Research**, v. 113, n. 11, p. 3963-3972, 2014.

BROOKS, D. R.; HOBERG, E. P. Parasite systematics in the 21st century: opportunities and obstacles. **TRENDS in Parasitology**, v. 17, n. 6, p. 273-275, 2001.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575-583, 1997.

BUTCHER, A. R. Children, snails and worms: the *Brachylaima cribbi* story. **Microbiology Australia**, v. 37, p. 30–33, 2016.

BUTCHER, A. R.; GROVE, D. I. Description of the life-cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. **Systematic Parasitology**, v. 49, p. 211–221, 2001.

CASTRO, E. R; GALETTI, M. Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú *Tupinambis merianae* (REPTILIA: TEIIDAE). **Papéis Avulsos de Zoologia** v. 44, n. 6, p. 91-97, 2004.

CECHIN, S. Z.; WINCK, G. R.; BLANCO, C. C. Population ecology of *Tupinambis merianae* (Squamata, Teiidae): home-range, activity and space use. **Animal Biology**, v. 61, n. 4, p. 493-510, 2011.

CHILTON, N. B.; HUBY-CHILTON, F.; GASSER, R. B.; BEVERIDGE, I. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 40, n. 1, p.118-128, 2006.

COSTA, H. M. A. *Cruzia brasiliensis* n. sp. (Nematoda-Cruziidae) parasite de *Sus domesticus*. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da UFMG**, v. 17, p. 61-69, 1965.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v.7, n.1, p.11-57, 2018.

CRITES, J. L. A redescription of *Cruzia americana*, a nematode parasitic in the opossum, *Didelphis marsupialis virginiana*. **The Journal of Parasitology**, v. 42, n. 1, p. 68-72, 1956a.

CRITES, J. L. **Studies on the morphology, taxonomy, and life history of *Cruzia americana* Maplestone, 1930, a parasitic nematode of *Didelphis marsupialis virginiana***. Tese (Doutorado em Filosofia). The Ohio State University, Ohio, EUA, 1956b.

CROMPTON, D. W. T.; NICKOL, B. B. (Ed.). **Biology of the Acanthocephala**. Cambridge University Press, 1985.

DA SILVA, C. C.; DE OLIVEIRA CAVALCANTI, G. A.; BRAGA, F. D. V. A.; GUIM, T. N.; GOMES, L. G. S.; DA SILVA RAPPETI, J. C. *Dioctophyme renale* parasitism in domestic cat in Rio Grande do Sul, Brazil-first reported case. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2215-2220, 2017.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407-417, 2005.

DE ALBUQUERQUE, S.; ÁVILA, R. W.; BERNARDE, P. S. Occurrence of helminths in lizards (Reptilia: Squamata) at lower Moa river forest, Cruzeiro do Sul, Acre, Brazil. **Comparative parasitology**, v. 79, n. 1, p. 64-67, 2012.

DE LEY P.; DE LEY I. T.; MORRIS, K.; ABEBE, E.; MUNDO-OCAMPO, M.; YODER, M.; HERAS, J.; WAUMANN, D.; ROCHA-OLIVARES, A.; BURR, A. H. J.; BALDWIN, J. G.; THOMAS, W. K. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1945-1958, 2005.

DUARTE, J.; COSTA, A. M. B.; KATAGIRI, S.; MARTINS, J. A.; OLIVEIRA, M. E.; RIBEIRO, C. M. Parasitism by *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) in maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), Brazil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 1, p. 52-56, 2013.

ECHENIQUE, J. V.; SOARES, M. P.; MASCARENHAS, C. S.; BANDARRA, P. M.; QUADROS, P.; DRIEMEIER, D.; SCHILD, A. L. *Lontra longicaudis* infected with canine parvovirus and parasitized by *Dioctophyma renale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1844-1848, 2018.

ENGE, K. M. FWC Bioprofile for the argentine black and white tegu (*Tupinambis merianae*). **Florida Fish and Wildlife Conservations Commission**, 2006.

FEDATTO-BERNARDON, F.; DUTRA-VIEIRA, T.; MÜLLER, G. Primer registro de *Brachylaima* (Trematoda: Brachylaimidae) en *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae). **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 88, n. 3, p. 765-768, 2017.

FLOYD, R. M.; ROGERS, A. D.; LAMBSHEAD, P.; SMITH, C. R. Nematode-specific PCR primers for the 18S small subunit rRNA gene. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 3, p. 611-612, 2005.

FREELAND, J. The evolution of population biology: past, present and future. **Journal of Biogeography**, v. 32, n. 11, p. 2039-2040, 2005

FREITAS, J. F. T.; LENT, H. Pesquisas helmintológicas realizadas no Estado do Pará, V. gênero *Diaphanocephalus* Diesing, 1851 Nematoda:Strongyloidea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 423–432, 1938.

GALDÓN, M. A.; ROCA, V.; BARBOSA, D.; CARRETERO, M. A. Intestinal helminth communities of *Podarcis bocagei* and *Podarcis carbonelli* (Sauria: Lacertidae) in NW Portugal. **Helminthologia**, v. 43, p. 37–41, 2006.

GASSER, R. B. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. **Veterinary parasitology**, v. 136, n. 2, p. 69-89, 2006.

GOLVAN, Y. J. Le genre *Centrorhynchus* Lühe, 1911 (Acanthocephala-Polymorphidae). Révision des espèces européennes et description d'une nouvelle espèce africaine parasite de rapace diurne. **Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire**, p. 732-785, 1956.

GOOGLE EARTH-MAPAS. Disponível em: <https://www.google.com.br/intl/pt-BR_ALL/earth/versions/> Acesso em 11 dez. 2019.

GRAY, J. B.; ANDERSON, R. C. Development of *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) in the common field cricket (*Acheta pennsylvanicus* Burmeister). **Canadian Journal of Zoology**, v. 60, n. 9, p. 2134-2142, 1982.

HAMANN, M. I.; GONZÁLEZ, C. E.; KEHR, A. I. Helminth community structure of the oven frog *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae) from Corrientes, Argentina. **Acta Parasitologica**, v. 51, n. 4, p. 294-299, 2006.

HANDOO, Z. A.; CARTA, L. K.; SKANTAR, A. M. Taxonomy, Morphology and Phylogenetics of Coffee-Associated Root-Lesion Nematodes, *Pratylenchus* spp. **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**, Springer Netherlands, p. 29-50, 2008.

HATCHER, M. J.; DICK, J. T. A; DUNN, A. M. How parasites affect interactions between competitors and predators. **Ecology Letters**, v. 9, n. 11, p. 1253-1271, 2006.

- HIBBETT, D. S. Ribosomal RNA and fungal systematics. **Nippon Kingakkai Kaiho**, v. 44, n. 4, p. 533-556, 1992.
- HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, p. 411–453, 1991.
- HUANG, S.Y.; ZHAO, G. H.; FU, B. Q.; XU, M. J.; WANG, C. R.; WU, S. M.; ZOU, F.C.; ZHU, X. Q. Genomics and molecular genetics of *Clonorchis sinensis*: current status and perspectives. **Parasitology International**, v. 61, p. 71–7, 2012.
- HUDSON, P.J.; RIZZOLI, A.P.; GRENFELL, B.T.; HEESTERBEEK, H.; DOBSON, A.P. **The Ecology of Wildlife Diseases**. Oxford University Press, Oxford, 2002.
- INATURALIST. **Iniciativa conjunta da Academia de Ciências da Califórnia e da National Geographic Society**. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/33906070>> Acesso em: 10 out. 2019.
- INCEDOGAN, S.; YILDIRIMHAN, H. S.; BURSEY, C. R. Helminth parasites of the ocellated skink *Chalcides ocellatus* (Forsk., 1775) (Scincidae) from Turkey. **Comparative Parasitology**, v. 81, p. 260–269, 2014.
- ISHIZAKI, M. N.; IMBELONI, A. A.; MUNIZ, J. A. P. C.; DE AZEVEDO SCALERCIO, S. R. R.; BENIGNO, R. N. M.; PEREIRA, W. L. A.; JUNIOR, A. C. C. L. *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) in the abdominal cavity of a capuchin monkey (*Cebus apella*), Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 173, n. 3-4, p. 340-343, 2010.
- JOUSSON, O.; BARTOLI, P.; PAWLOWSKI, J. Molecular identification of developmental stages in Opecoelidae (Digenea). **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 11, p. 1853-1858, 1999.
- KATAFIGIOTIS, I.; FRAGKIADIS, E.; POURNARAS, C.; NONNI, A.; STRAVODIMOS, K. G. A rare case of a 39 year old male with a parasite called *Dioctophyma renale* mimicking renal cancer at the computed tomography of the right kidney. A case report. **Parasitology International**, v. 62, n. 5, p. 459-460, 2013.
- KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.
- KENNEDY, C. R. **Ecology of the Acanthocephala**. Cambridge University Press, 2006.
- KIEFER, M.C.; SAZIMA, I. Diet of juvenile tegu lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae) in southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 105-108, 2002.
- KONG, Q.; FAN, L.; ZHANG, J.; AKAO, N.; DONG, K.; LOU, D.; DING, J.; TONG, Q.; ZHENG, B.; CHEN, R.; OHTA, N.; LU, S. Molecular identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium larvae* in marine fishes from the East China Sea and the Pacific coast of central Japan. **International Journal of Food Microbiology** v. 199, p. 1–7, 2015.

- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.
- LANFEAR, R.; FRANDBSEN, P. B.; WRIGHT, A. M.; SENFELD, T.; CALCOTT, B. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 772-773, 2017.
- LEE, D. L. (Ed.). **The biology of nematodes**. London: CRC Press, 2002.
- LEFOULON, E.; BAIN, O.; BOURRET, J.; JUNKER, K.; GUERRERO, R.; CAÑIZALES, I.; KUZMIN, Y.; BASKORO T.; SATOTO, T.; CARDENAS-CALLIRGOS, J. M.; LIMA, S. S.; RACCURT, C.; MUTAFCHIEV, Y.; GAVOTTE, L.; MARTIN, C. Shaking the tree: multi-*locus* sequence typing usurps current onchocercid (filarial nematode) phylogeny. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, 2015.
- LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A. M. **The Phylogenetic Handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing** (2nd ed.). New York: Cambridge University Press, 2009.
- LI, L. Redescription of *Cruzia americana* Maplestone, 1930 (Nematoda: Kathlaniidae) a parasite of *Didelphis virginiana* (Kerr) (Mammalia: Didelphidae) in the USA. **Systematic Parasitology**, v. 96, n. 4-5, p. 433-440, 2019.
- LICHTENFELS, J. R. Keys to genera of the Superfamilies Ancylostomatoidea and Diaphanocephaloidea. In: ANDERSON, R.C.; CHABAUD, A.G.; WILLMOTT, S. (eds) **CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates**. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, 1980.
- LOCKYER, A.E.; OLSON, P.D.; LITTLEWOOD, D.T.J. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 78, p. 155–171, 2003.
- MACE, T. F.; ANDERSON, R. C. Development of the giant kidney worm, *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Diectophymatoidea). **Canadian Journal of Zoology**, v. 53, n. 11, p. 1552-1568, 1975.
- MACHADO, R. A. *Tupinambis merianae* (Tiú, Teiú, Tegu, or Teju). Diet. **Herpetological Review**, v. 38, n. 1, p. 84–84, 2007.
- MALDONADO, A.; SIMÕES, R. O.; SÃO LUIZ, J.; COSTA-NETO, S. F.; VILELA, R. V. A new species of *Physaloptera* (Nematoda: Spirurida) from *Proechimys gardneri* (Rodentia: Echimyidae) from the Amazon rainforest and molecular phylogenetic analyses of the genus. **Journal of Helminthology**, v. 94, 2020.

MARCHESE, M. R.; Santos, M. R.; Lima, J. D. S.; Pamplin, P. A. Z. First record of introduced species *Lumbriculus variegatus* Müller, 1774 (Lumbriculidae, Clitellata) in Brazil. **BioInvasions Records**, v. 4, n. 2, p. 81-85, 2015.

MARSHALL, J. W. The first records of *Stygodrilus heringianus* (Oligochaeta: Lumbriculidae) from the southern hemisphere. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 5, n. 4, p. 781-782, 1978.

MASCARENHAS, C. S.; MÜLLER, G. Third-stage larvae of the enoplid nematode *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) in the freshwater turtle *Trachemys dorbigni* from southern Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 89, n. 5, p. 630-635, 2015.

MASCARENHAS, C. S.; HENZEL, A. B. D.; CORRÊA, F.; ROBALDO, R. B.; MULLER, G. Third-stage larvae of *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Enoplida) in *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae) from Southern Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 10, n. 1, p. 135-138, 2016.

MASCARENHAS, C. S.; HENZEL, A. B. D.; MÜLLER, G. Larvae of *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Enoplida) and *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in freshwater turtles (Testudines: Chelidae) from southern Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 11, n. 1, p. 61-67, 2017.

MASCARENHAS, C. S., MÜLLER, G., DE MACEDO, M. R. P., HENZEL, A. B. D., ROBALDO, R. B., CORRÊA, F. The role of freshwater fish in the life cycle of *Dioctophyme renale* in Southern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 16, p. 100274, 2019.

MCCOY, K. D.; BOULINIER, T.; TIRARD, C.; MICHALAKIS, Y. Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. **Evolution**, v. 57, p. 288-296, 2003.

MEASURES, L. N.; ANDERSON, R. C. Centrarchid fish as paratenic hosts of the giant kidney worm, *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782), in Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 21, n. 1, p. 11-19, 1985.

MELO, V.; OLIVEIRA, J. B.; FARIA, R. G.; MOURA, G. J. B. Gastrointestinal parasites of *Salvator merianae* Duméril & Bibron, 1839 (Squamata, Teiidae) in the States of Ceará and Sergipe, Northeastern of Brazil. **Herpetology Notes**, v. 12, p. 457-460, 2019.

MILANELO, L.; MOREIRA, M. B.; FITORRA, L. S.; PETRI, B. S.; ALVES, M.; SANTOS, A. D. C. D. Occurrence of parasitism by *Dioctophyma renale* in ring-tailed coatis (*Nasua nasua*) of the Tiete Ecological Park, São Paulo, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 959-962, 2009.

MISERENDINO, M. L. Macroinvertebrate functional organization and water quality in a large arid river from Patagonia (Argentina). In: **Annales de Limnologie-International Journal of Limnology**. EDP Sciences, 2007. p. 133-145.

MOTA, M. Extração de nematódeos do solo e de tecidos vegetais. Relatório para a aula prática de Biologia do Solo, Universidade de Évora. 1989.

MOURA, R. M. Histórico da taxonomia dos nematoides. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 3, p.139-169, 2006.

NADLER, S. A.; HUDSPETH, D. S. S. Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 221-236, 1998.

NADLER, S. A.; HUDSPETH, D. S. S. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. **The Journal of parasitology**, p. 380-393, 2000.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 13^{ed}, Editora Atheneu, 2016.

NOLAN, M. J.; CRIBB, T. H. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. **Advances in Parasitology**, v. 60, p. 101-163, 2005.

OLIVEIRA, C. M. G.; MACHADO, A. C.; KUBO, R. K.; HARAKAVA, R. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 218-225, 2009.

PALM, H.W.; WAESCHENBACH, A.; OLSON, P.D.; LITTLEWOOD, D.T.J. Molecular phylogeny and evolution of the *Trypanorhyncha* Diesing, 1863 (Platyhelminthes: Cestoda). **Molecular and Phylogenetic Evolution**, v. 52, p. 351–367, 2009.

PEDRASSANI, D.; HOPPE, E. G. L.; TEBALDI, J. H.; DO NASCIMENTO, A. A. *Chaunus ictericus* (Spix, 1824) as paratenic host of the giant kidney worm *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Enoplida) in São Cristóvão district, Três Barras county, Santa Catarina state, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 74-77, 2009.

PEDRASSANI, D., WENDT, H., RENNAU, E. A., PEREIRA, S. T., & WENDT, S. B. T. *Dioctophyme renale* Goeze, 1782 in a cat with a supernumerary kidney. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 109-111, 2014.

PEREIRA, F. B.; ALVES, V. P.; ROCHA, B. M.; LIMA, S. S.; LUQUE, J. L. A new *Physaloptera* (Nematoda: Physalopteridae) parasite of *Tupinambis merianae* (Squamata: Teiidae) from southeastern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, p. 1227–1235, 2012.

PEREIRA, F. B.; ALVES, V. P.; ROCHA, B. M.; LIMA, S. S.; LUQUE, J. L. *Physaloptera baina* n. sp. (Nematoda: Physalopteridae) parasitic in *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae), with a key to *Physaloptera* species parasitizing reptiles from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 100, p. 221–227, 2014.

- PEREIRA, F.B.; FERREIRA, V.L.; TOMAS, W.M.; ELISEI, C.; PAIVA, F.; TAVARES, L.E.R. *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda: Diaphanocephalidae), a poorly known parasite of lizards: redescription, first genetic characterization and a revision of its congeners from Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 93, p. 629-635, 2019.
- PEREIRA JUNIOR, R. A. Fauna helmintológica de catetos (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) procedentes da Amazônia Brasileira e suas implicações para a criação comercial. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1109-1115, 2016.
- PERERA, S. C.; RAPPETI, J. C. S.; MILECH, V.; BRAGA, F. A.; CAVALCANTI, G. A. O.; NAKASU, C. C.; DURANTE, L.; VIVES, P.; CLEFF, M. B. Eliminação de *Diectophyme renale* pela urina em canino com dioctofimatose em rim esquerdo e cavidade abdominal-Primeiro relato no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 3, p. 618-622, 2017.
- PESENTI, T. C.; MASCARENHAS, C. S.; KRÜGER, C.; SINKOC, A. L.; ALBANO, A. P. N.; COIMBRA, M. A. A.; MÜLLER, G. *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) Collet-Meygret, 1802 (*Diectophymatidae*) in *Galictis cuja* (Molina, 1782) (*Mustelidae*) in Rio Grande do Sul, Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 6, n. 2, p. 301-305, 2012.
- PETROCHENKO, V. I. **Acanthocephala of Domestic and Wild Animals**: Vol. 1-2. Israel Program for Scientific Translations, 1971.
- PIANKA, E. R.; VITT, L. J. **Lizards: windows to the evolution of diversity**. Univ of California Press, 2003.
- PIRES, A.C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropical**, v. 10, n. 2, p. 339-346, 2010.
- POJMAVSKA, T. Superfamily Brachylaimoidea Joyeux & Foley, 1930. In: GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A.(eds) **Keys to the Trematoda**. London: CABI International. The Natural History Museum, v. 1, p. 31- 36, 2002.
- PORINI, G. M. **Proyecto Tupinambis**. Una propuesta para el manejo de *Tupinambis rufescens* y *T. merianae* en la Argentina. Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de Uso Sustentable (ed. por ML Bolkovic y D. Ramadori), 2006.
- POULIN, R.; MORAND, S. The diversity of parasites. **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 3, p. 277-293, 2000.
- POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 367-383, 2004.
- PROENÇA, A. C. Sobre dois casos de *Diectophyme renale* em cão no Rio de Janeiro. **Boletim Veterinário do Exército**, v. 2, p. 50-51, 1935.
- QUINTELA, F. M.; LOEBMANN, D. (2009). **Guia ilustrado dos répteis da região costeira do extremo sul do Brasil**. Rio Grande do Sul: USEB: Pelotas, 2009.

- QUINTELA, F. M.; LOB, G.; ARTIOLI, L. G. S. Diet of *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) in restinga and estuarine environments of southern Brazil. **Iheringia Série Zoologia**, v. 104, p. 143–149, 2014.
- RAMALHO, A. C. O.; SILVA, R. J.; SCHWARTZ, H. O.; PÉRES, A. K. Helminths from an introduced species (*Tupinambis merianae*), and two endemic species (*Trachylepis atlantica* and *Amphisbaena ridleyi*) from Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 95, p.1026–1028, 2009.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. FigTree v1. 4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2016.
- RANGEL, C. H.; NEIVA, C. H. M. B. Predação de vertebrados por cães *Canis lupus* F Familiaris (Mammalia: Carnivora) no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, p. 261–269, 2013.
- RAPPETI, J. C. S.; MASCARENHAS, C. S.; PERERA, S.C.; MÜLLER, G.; GRECCO, F. B.; SILVA, L. M. C.; SAPIN, C. F.; RAUSCH, S. F.; CLEFF, M. B. *Dioctophyme renale* (Nematoda: Enoplida) in domestic dogs and cats in the extreme south of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 119-121, 2017.
- RESEARCHGATE. Discover the world's scientific knowledge. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/search?q=salvator%20merianae>> Acesso em: 20 fev. 2020.
- RIBEIRO, C. T.; VEROCAI, G. G.; TAVARES, L. E. R. *Dioctophyme renale* (Nematoda, Dioctophymatidae) infection in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Brazil. **Journal of wildlife diseases**, v. 45, n. 1, p. 248-250, 2009.
- ROCA, V.; LÓPEZ-BALAGUER, E.; HORNERO, M. J. Helminthofauna de *Podarcis hispanica* (Steindachner, 1870) y *Podarcis bocagei* (Seoane, 1884) (Reptilia: Lacertidae) em el Cuadrante Noroccidental de la Península Ibérica. **Revista Ibérica de Parasitología**, v. 49, p. 127–135, 1989.
- ROCHA, U. F.; SERRA, R. G.; GRECHI, R. Parasitismo por *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) em “preguica,” *Choloepus didactylus* Linnaeus, 1758. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica de São Paulo**, v. 3, p. 325-334, 1965.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012.
- SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. B. **Répteis da Serra do Japi: notas sobre a história natural**. Campinas, Editora da Unicamp/FAPESP, 1992.

SAZIMA, I.; D'ANGELO, G. B. Range of animal food types recorded for the tegu lizard (*Salvator merianae*) at an urban park in South-eastern Brazil. **Herpetology Notes**, v. 6, p. 427-430, 2013.

SCOTT, N.; PELEGRIN, N.; MONTERO, R.; KACOLIRIS, F.; FITZGERALD, L.; CARREIRA, S.; CACCIALI, P.; MORAVEC, J.; CISNEROS-HEREDIA, D.F.; APARICIO, J.; AVILA-PIRES, T.C.S. *Salvator merianae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T178340A61322552>> Acesso em 14 dez. 2019.

SILVA, J.S.B.; HILLESHEIM, R. *Tupinambis merianae* (Tegu) Diet. **Herpetological Review**, v. 35, n. 4, p. 399, 2004.

SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; TOCHETTO, C.; OLIVEIRA, C. B.; SOARES, J. F.; OTTO, M. A. Parasitismo por *Physaloptera* sp., *Kalicephalus* sp. e *Cryptosporidium* sp. em lagarto (*Tupinambis teguixin*) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zociências**, v. 10, p. 269–272, 2008.

SMALES, L. R. Acanthocephala including the descriptions of new species of *Centrorhynchus* (Centrorhynchidae) and the redescription of *Lueheia inscripta* (Westrumb, 1821) (Plagiorhynchidae) from birds from Paraguay South America. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 120, n. 2, p. 175-202, 2013.

SMALES, L. R.; HALAJIAN, A.; MOKGAWA, M. P.; LUUS-POWELL, W. J. A new species of *Centrorhynchus* Lühe, 1911 (Acanthocephala: Centrorhynchidae) from the lizard buzzard *Kaupifalco monogrammicus* (Temminck) (Aves: Accipitridae) in South Africa. **Systematic Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 423-430, 2017.

SPINELLI, C. M.; FIORITO, L. E.; STIEBEL, C. Alteraciones histológicas em el intestino delgado em *Tupinambis rufescens* (Sauria, Teiidae) causadas por *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda, Diaphanocephalidae). **Cuaderno de Herpetología**, v. 7, p. 38–40, 1992.

STEINAUER, M.; FLORES, V.; RAUQUE, C. *Centrorhynchus nahuelhuapensis* n. sp. (Acanthocephala: Centrorhynchidae) from rufous-legged owl (*Strix rufipes* King) in Patagonia. **Journal of Helminthology**, v. 94, 2020.

STUNKARD, H. W. Life histories and systematics of parasitic worms. **Systematic Zoology**, v. 2, n. 1, p. 7-18, 1953.

SUMMERS, K.; MCKEON, S.; SELLARS, J.; KEUSENKOTHEN, M.; MORRIS, J.; GLOECKNER, D.; PRESSLEY, C.; PRICE, B.; SNOW, H. Parasitic exploitation as an engine of diversity. **Biological Reviews**, v. 78, n. 4, p. 639-675, 2003.

TARELLO, W. Prevalence of acanthocephalans in birds of prey from the middle east and report of two clinical cases. **Parasite**, v. 16, n. 1, p. 73-74, 2009.

TEIXEIRA, A. A. M.; BRITO, S. V.; TELES, D. A. S. C. RIBEIRO, S. C.; ARAUJO-FILHO, J. A.; LIMA, V. F.; PEREIRA, A. M. A.; ALMEIDA, W. O. Helminths of the

lizard *Salvator merianae* (Squamata, Teiidae) in the caatinga, northeastern Brazil. **Brazilian Journal Biology**, v.77, n.2, p.312-317, 2017.

TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 25, n. 5-6, p. 1267-1284, 2009.

THOMAS, F.; GUÉGAN, J.F.; RENAUD, F. (Ed.). **Ecology and evolution of parasitism**. OUP Oxford, 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRAVASSOS, L. Contribuições para o conhecimento da fauna helminthologica brasileira: XX. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 19, n. 1, p. 31-125, 1926.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. T. D.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 67, n. 1, p. 1-886, 1969.

TRINDADE, M. A. C.; MACEDO, M. R. P.; MULLER, G. *Dioctophyme renale* (Nematoda: Dioctophymatidae) in *Leopardus geoffroyi* (Carnivora: Felidae) in the Neotropical region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 223-225, 2018.

UNEP-WCMC (Comps). **The Checklist of CITES Species Website**. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland. Compiled by UNEP-WCMC, Cambridge, UK. Disponível em: <http://checklist.cites.org>. Acesso em 16 jan.2020.

URANO, Z.; HASEGAWA, H.; KATSUMATA, T.; TORIYAMA, K.; AOKI, Y. Dioctophymatid nematode larva found from human skin with creeping eruption. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 462-465, 2001.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J., DUNCAN, J.; JENNINGS, F. Helminthologia veterinária. **Parasitologia Veterinária**, v. 2, p. 84-85, 1998.

VALENTE, R.; DIAZ, J. I.; SALOMÓN, O. D.; NAVONE, G. T. The role of *Phyllocaulis variegatus* (Mollusca: Veronicellidae) on the transmission of digenean parasites. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 87, p. 255–257, 2016.

VAN-SLUYS, M.; ROCHA, C.F.D. *Tupinambis merianae* (Common Tegu) Activity. **Herpetologica Review**, v. 30, n. 1, p. 42–43, 1999.

VARZONE, J. R. M.; DE AQUINO, L. P. C. T.; RODOVALHO, M.V. T. Achados macroscópicos de lesões resultantes do parasitismo por *Dioctophyma renale* em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) relato de caso. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 171-178, 2008.

VIEIRA, R. C. **História natural, ecologia populacional e genética de *Salvator merianae* (DUMÉRIL & BIBRON, 1839) (SQUAMATA, TEIIDAE) no sul do Brasil.**

Tese (Doutorado em Biologia Animal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

VIEIRA, T.D.; FEDATTO-BERNARDON, F.; MÜLLER, G. *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda: Diaphanocephalidae), parasite of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae) in southern Brazil. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 87, n. 2, p. 512-515, 2016.

VIEIRA, F. M.; GONÇALVES, P. A.; LIMA, S. D. S.; SOUSA, B. M. D.; MUNIZ-PEREIRA, L. C. A new species of *Cruzia* (Ascaridida; Kathlanidae) parasitizing *Salvator merianae* (Squamata, Teiidae) from the Atlantic forest in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 1, 2020.

VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R. M. Nematóides do Brasil, Parte III: Nematoides de répteis. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 10, p. 19–168, 1993.

VULCANI, V. A. S.; FRANZO, V. S.; ARAÚJO, D. P. D.; VICENTIM, F. R.; COSTA, O. M. D.; RANGEL, A. S.; GOMES, L. A. *Diocotophyma renale* em Lobo-Guará na região geoeconômica de Jataí, GO, Brasil-relato de caso. 2015.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**. Acanthocephala, v. 5, 1963.

YANOSKY, A. A.; MERCOLLI, C. Preliminary observations on the reproductive cycle of female Tegu Lizards (*Tupinambis teguixin*). **Cuadernos de Herpetologia**, v. 6, n. 5, p. 27–30, 1991.

YILDIRIMHAN, H. S.; BURSEY, C. R.; ALTUNEL, F. N. Helminth parasites of the Balkan green lizard, *Lacerta trilineata* Bedriaga 1886, from Bursa, Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, v. 35, p. 519–535, 2011.

WAESCHENBACH, A.; WEBSTER, B.L.; BRAY, R.A.; LITTLEWOOD, D.T.J. Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 45, p. 311–325, 2007.

WICKSTRÖM, L. M.; HAUKISALMI, V.; VARIS, S.; HANTULA, J.; FEDOROV, V. B.; HENTTONEN, H. Phylogeography of the circumpolar *Paranoplocephala arctica* species complex (Cestoda: Anoplocephalidae) parasitizing collared lemmings (*Dicrostonyx* spp.). **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3359-3371, 2003.

WILL, K. W.; MISHLER, B. D.; WHEELER, Q. D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 844-851, 2005.

WINCK, G.R., CECHIN, S.Z. Hibernation and emergence pattern of *Tupinambis merianae* (Squamata: Teiidae) in the Taim Ecological Station, southern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 42, n. 3-4, p. 239-247, 2008.

WINDSOR, D. A. Equal rights for parasites. **Conservation Biology**, v. 9, n. 1, p. 1-2, 1995.

WHIPPS, C. M.; ADLARD, R. D.; BRYANT, M. S.; LESTER, R. J. G.; FINDLAV, V.; KENT, M. L. First report of three *Kudoa* species from Eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from *Mahi mahi* (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 215–219, 2003.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

ZABOTT, M. V.; PINTO, S. B.; VIOTT, A. M.; TOSTES, R. A.; BITTENCOURT, L. H.; KONELL, A. L.; GRUCHOUSKEI, L. Ocorrência de *Diectophyma renale* em *Galictis cuja*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 786-788, 2012.

Apêndices

Apêndice A - *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda: Diaphanocephalidae),
parasite of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae) in southern Brazil



Research note

Diaphanocephalus galeatus (Nematoda: Diaphanocephalidae), parasite of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae) in southern Brazil

Diaphanocephalus galeatus (Nematoda: Diaphanocephalidae), parásito de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae) en el sur del Brasil

Thainá Dutra Vieira*, Fabiana Fedatto-Bernardon, Gertrud Müller

Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Received 4 August 2015; accepted 22 January 2016
Available online 24 May 2016

Abstract

The gastrointestinal tract of 20 Argentine black and white tegu *Salvator merianae*, was examined in search of nematodes. The diaphanocephalid nematode *Diaphanocephalus galeatus* was identified with a prevalence of 80%. This work contributes to the knowledge of the host's helminth diversity, being the first record in southern Brazil, and presents unpublished photographic records of the species. All Rights Reserved © 2016 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. This is an open access item distributed under the Creative Commons CC License BY-NC-ND 4.0.

Keywords: Argentine Black and White tegu; Reptiles; Nematodes; Parasitological indexes

Resumen

Se revisó el tubo gastrointestinal de 20 tegus argentinos *Salvator merianae* en busca de nematodos. Se encontró el diafanocefálico *Diaphanocephalus galeatus* con una prevalencia del 80%. Este trabajo contribuye al conocimiento de la diversidad de helmintos del huésped, siendo el primer registro de la especie en el sur de Brasil y presenta registros fotográficos inéditos de la especie. Derechos Reservados © 2016 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0.

Palabras clave: Tegu argentino; Reptiles; Nematodos; Índices parasitológicos

Parasites are among the most diverse and highly specialized organisms; they act as regulators of host populations, maintaining the integrity and stability of ecosystems (Brooks & Hoberg, 2001; Windsor, 1995). Knowledge of endoparasites of wildlife is important for understanding the ecology, natural history, life cycle, and evolution of both parasite and host species (Silva et al., 2008). Studies on lizards in South America demonstrate

that these reptiles act as definitive hosts for several helminth species, mainly nematodes (Ávila & Silva, 2010).

Salvator merianae (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae), known as the Argentine black and white tegu or teiú, is considered one of the largest South American lizards. It is found in eastern Bolivia, Argentina, Uruguay, and Brazil (Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Goiás, Pará, Pernambuco, Amazonas, Maranhão, and introduced in the Fernando de Noronha archipelago) (Embert, Fitzgerald, & Waldez, 2010; Loebmann & Quintela, 2009).

This lizard species has a diurnal habit, living in fields, rocky areas, and forests near watercourses. It is omnivorous, with a

* Corresponding author.

E-mail address: thainadutravieira@hotmail.com (T.D. Vieira).

Peer Review under the responsibility of Universidad Nacional Autónoma de México.

varied diet consisting of fruits, insects, snails, fish, amphibians, reptiles, rodents, adult birds, nestlings, and eggs (Achaval & Olmos, 2003).

Regarding the helminths parasites of *S. merianae* in South America, until now 6 nematodes species have been recorded: *Cruzia travassosi* Kalil & Vogelsangi, 1932 (Kathlaniidae); *Physaloptera retusa* Rudolphi, 1819 (Physalopteridae); *Diaphanocephalus galeatus* (Rudolphi, 1819) (Diaphanocephalidae); *Spinicauda spinicauda* Olfers, 1819 (Heterakidae); *Physaloptera tupinambae* Pereira, Alves, Rocha, Lima, & Luque, 2012 (Physalopteridae); *Physaloptera bainae* Pereira, Alves, Rocha, Lima, & Luque, 2014 (Physalopteridae); and the cestode *Oochoristica* sp. (Cyclophyllidae) (Ávila & Silva, 2010, 2011; Pereira, Alves, Rocha, Lima, & Luque, 2012, 2014).

In southern Brazil there is no helminthological information related to *S. merianae*. Therefore, the aim of this study is to identify gastrointestinal nematodes inhabiting the intestinal tract of this lizard from municipalities of Rio Grande do Sul State, recording their parasitological indexes: prevalence, abundance and mean intensity of infection.

Twenty *S. merianae* were necropsied, 17 collected (already dead) on highways of southern Brazil from the municipalities of Pelotas (31°46'19" S, 52°20'33" W), Capão do Leão (31°46'3" S 52°26'55" W), and Morro Redondo (31°35'18" S, 52°37'47" W) under permission ICMBio N° 38913-1 issued to Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (N° 38913-1); the remaining 3 animals were donated by Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre and Centro de Triagem de Animais Silvestres of Universidade Federal de Pelotas (NURFS-CETAS/UFPel).

The gastrointestinal tracts were sectioned into esophagus, stomach, and small and large intestines. These were opened and washed with a water jet through a 150 µm sieve, and the resulting contents and mucous were examined under an Olympus SZ stereomicroscope. The nematodes were removed, quantified, fixed in AFA, and stored in alcohol 70° GL. They were then mounted on semi-permanent slides with Aman's lactophenol, and viewed on an Olympus CX21 microscope for morphological and morphometric identification according to Freitas and Lent (1938) and Anderson, Chabaud, and Willmott (2009).

The measurements were expressed in millimeters (the mean and standard deviation shown in parentheses) and the photographs taken on an Olympus BX 41 microscope with attached camera system. The parameters calculated were prevalence, abundance, and mean intensity of infection according to Bush, Lafferty, Lotz, and Shostak (1997).

Voucher specimens were deposited in Coleção de Helminthos do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (CHLAPASIL/UFPel) (N° 605-611), Rio Grande do Sul, Brazil; Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) (N° 6735-6737), Rio de Janeiro, Brazil; and Coleção de Invertebrados Museo de La Plata (MLP-He) (N° 6843), La Plata, Argentina.

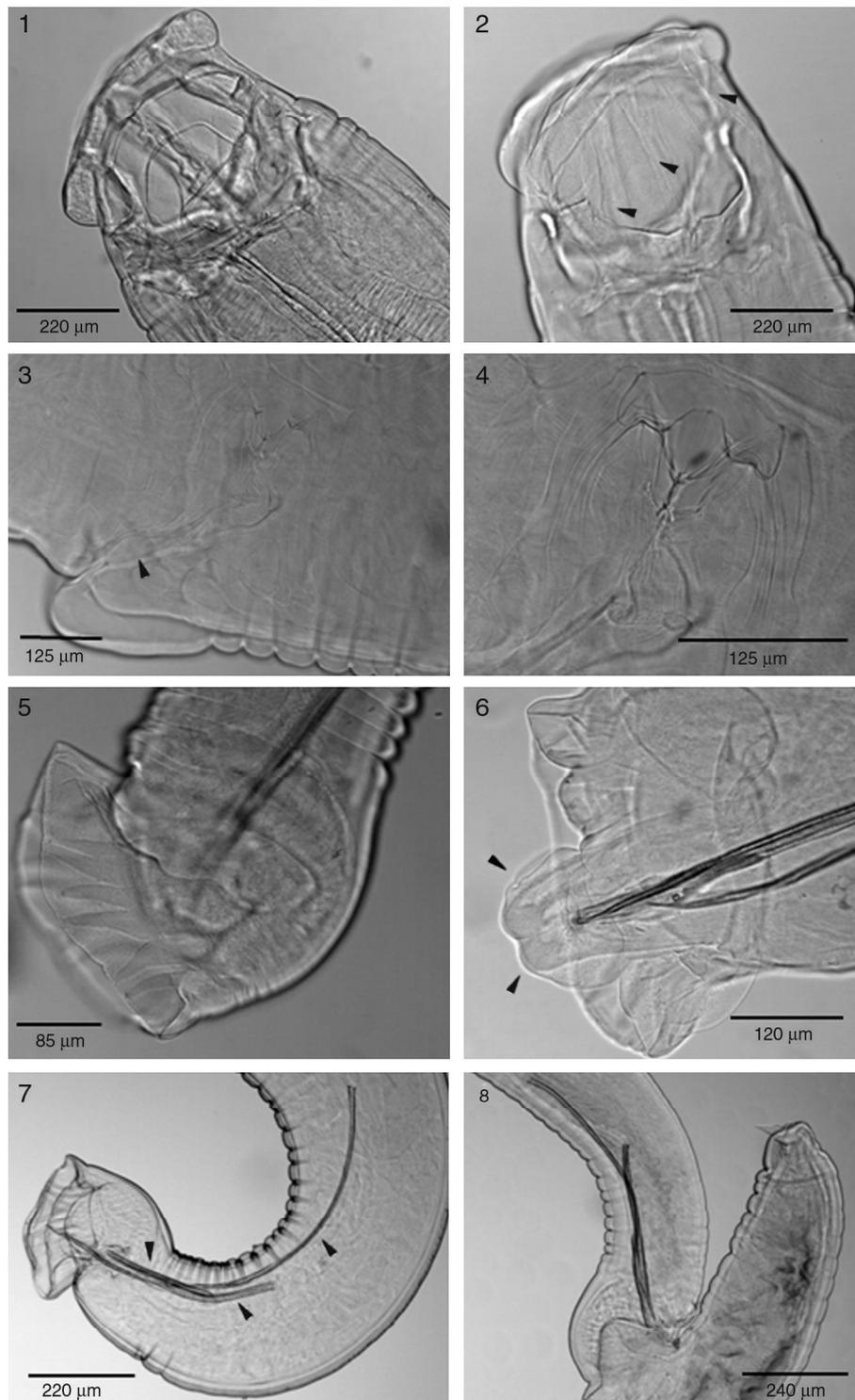
Diaphanocephalus galeatus (Rudolphi, 1819) Railliet & Henry, 1909 (Fig. 1).

Characterization. Based on 96 specimens (10 males and 10 adult females were measured). Male: total body length 2.69 – 4.5 (3.48 ± 0.58); width (in the half of body) 0.3 – 0.46 (0.39 ± 0.056); length of oral capsule 0.24 – 0.28 (0.26 ± 0.01); width of oral capsule 0.24 – 0.32 (0.28 ± 0.02); esophagus length 0.39 – 0.48 (0.41 ± 0.02); esophagus width (maximum width) 0.17 – 0.27 (0.21 ± 0.02); nervous ring not visible; distance from the excretory pore to cephalic end 0.31 – 0.48 (0.38 ± 0.05); length of the largest spicule 0.58 – 0.84 (0.68 ± 0.08); length of the smaller spicule 0.4 – 0.49 (0.44 ± 0.03); length gubernaculum 0.18 – 0.51 (0.28 ± 0.12); length genital cone 0.29 – 0.3 (0.29 ± 0.007) (visualized in only 2 specimens). Female: total body length 2.19 – 5.62 (4.28 ± 1.01); width (in the half of body) 0.31 – 0.51 (0.44 ± 0.06); length of oral capsule 0.29 – 0.38 (0.32 ± 0.03); width of oral capsule 0.3 – 0.39 (0.34 ± 0.03); esophagus length 0.42 – 0.57 (0.49 ± 0.04); esophagus width (maximum width) 0.19 – 0.30 (0.23 ± 0.03); nervous ring not visible; distance from the excretory pore to cephalic end 0.4 – 0.62 (0.5 ± 0.09); distance from vulvar lip until the rear end 0.52 – 1.2 (0.89 ± 0.24); length of the vagina 0.37 – 1.1 (0.70 ± 0.28); length of ovejector 0.3 – 0.43 (0.36 ± 0.04); distance from the anus to end of tail 0.085 – 0.18 (0.12 ± 0.02); length of eggs 0.06 – 0.087 (0.083 ± 0.10); width of eggs 0.03 – 0.055 (0.041 ± 0.005) (50 eggs were measured).

Diaphanocephalus galeatus was found parasitizing the stomach, small, and large intestine of *S. merianae*. Three hundred forty-six specimens were collected (195 females and 151 males) with a prevalence of 80%, mean abundance 17.3, and mean intensity of infection 21.6 per host. The presented photographic records are unpublished, so they are of important scientific value, considering that Freitas and Lent (1938) presented only illustrations in the description of the parasite.

In Brazil, the nematode was registered previously parasitizing *S. merianae* and *Tupinambis teguixin* (Linnaeus, 1758). In *S. merianae* this nematode species was reported in the states of Mato Grosso (Cuiabá, Chapada dos Guimarães, Poconé), Mato Grosso do Sul (Aquidauana, Serra da Bodoquena, Corumbá and its Nhecolândia district), and Pernambuco (specifically, Fernando de Noronha archipelago where the species was introduced) (Ávila & Silva, 2011). In *T. teguixin*, *D. galeatus* have been collected in the states of Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, and Rio Grande do Sul, as well as in Argentina and Bolivia (Freitas & Lent, 1938; Vicente, Rodrigues, Gomes, & Pinto, 1993). An additional host species *Tupinambis rufescens* (Günther, 1871) was recorded in Argentina (Spinelli, Fiorito, & Stiebel, 1992).

The morphology and morphometry of males of *D. galeatus* found in this study agree with those described by Freitas and Lent (1938) in *T. teguixin*; however, females studied herein had slightly larger measurements (length and width of the esophagus, distance from the excretory pore to cephalic end, distance from vulvar lip until the rear end, and vaginal length) compared to those presented by the authors (length and width of the esophagus [0.368–0.400 and 0.216–0.240], distance from the excretory pore to cephalic end [0.368–0.416], distance from vulvar lip until the rear end and [0.520–0.872] and vaginal length [0.192–0.304]).



Figures 1-8. *Diaphanocephalus galeatus* (Rudolphi, 1819) parasite of *Salvator merianae* (Duméril and Bibron, 1839) of Southern Brazil. 1, Oral capsule; 2, arrows point the 3 pillars supporting both oral valves; 3, arrow indicates the egg, vulvar lip of the female; 4, ovejector of the female; 5, male with closed copulatory bursa and apparent lateral rays; 6, arrow indicates the genital cone of the male; 7, arrows point gubernaculum, larger and smaller male spicules; 8, posterior region of male and female copulating.

Previous records of *D. galeatus* in Brazil were made by [Ávila \(2009\)](#), who analyzed 18 specimens of *S. merianae* in several locations belonging to the Cerrado biomes and Pantanal: Cuiabá, MT [$P = 100\%$ and $I = 20$ ($n = 2$)]; Poconé, MT [$P = 100\%$ and $I = 2$ ($n = 1$)]; Chapada dos Guimarães, MT [$P = 50\%$ and $I = 8$

($n = 2$); Serra da Bodoquena, MS [$P = 50\%$ and $I = 18$ ($n = 2$)]; Corumbá, MS [$P = 83.3\%$ and $I = 20.8$ ($n = 6$)]; Nhecolândia, MS [$P = 100\%$ and $I = 13.7$ ($n = 3$)]; and Aquidauana, MS [$P = 100\%$ and $I = 13$ ($n = 2$)]. On the other hand, [Ramalho, Silva, Schwartz, and Péres \(2009\)](#) analyzed 25 *S. merianae* lizards from the

Fernando de Noronha archipelago, PE, finding *D. galeatus* with a prevalence of 96% and mean intensity of 20.5, similar to those obtained in this work.

According to Spinelli et al. (1992), who studied *D. galeatus* from *Tupinambis teguixin*, this nematode parasite feeds on host tissue, resulting in lesions caused by the destruction of the intestinal mucosa through the mechanical action of their oral capsule, without causing ulcers in the affected area, only loss of tissue (i.e., an entry route for infection).

Studies on helminths associated with wild animals are important because they generate relevant information on the diversity of parasites, aiming to help understand the biology and ecology of their hosts. In this sense, the present study contributes to the knowledge of gastrointestinal nematodes of *Salvator merianae* and their parasitological indexes. This finding represents the first record of *Diaphanocephalus galeatus* in the Pampa biome, extending their geographic distribution to southern Brazil.

We thank the ICMBio for authorization, the NURFS-CETAS/UFPEL for donating dead lizards, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for scholarships and financial support through edict 2010/032.

References

- Achaval, F., & Olmos, A. (2003). *Anfibios y reptiles del Uruguay* (2ª ed.). Montevideo: Montevideo, Graphis.
- Anderson, R. C., Chabaud, A. G., & Willmott, S. (2009). *Keys to the nematode parasites of vertebrates*. London: UK: Ed. CABI.
- Ávila, W. R. (2009). *Padrões de infecção por helmintos em comunidades de lagartos do Brasil central*. Thesis. Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Ávila, W. R., & Silva, J. R. (2010). Checklist of helminths from lizards and amphisbaenians (Reptilia: Squamata) of South America. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16, 543–572.
- Ávila, W. R., & Silva, J. R. (2011). Helminths of lizards (Reptilia: Squamata) from Mato Grosso State, Brazil. *Comparative Parasitology*, 78, 129–139.
- Brooks, R. D., & Hoberg, E. P. (2001). Parasites systematics in the 21st century: opportunities and obstacles. *Trends in Parasitology*, 17, 273–275.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575–583.
- Embert, D., Fitzgerald, L., & Waldez, F. (2010). *Salvator merianae*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Retrieved on April 1, 2015 from: www.iucnredlist.org.
- Freitas, J. F. T., & Lent, H. (1938). Pesquisas helmintológicas realizadas no Estado do Pará, V. gênero *Diaphanocephalus* Diesing, 1851 (Nematoda: Strongyloidea). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 33, 423–432.
- Loebmann, D., & Quintela, F. M. (2009). *Guia ilustrado-os répteis da região costeira do extremo sul do Brasil*. Rio Grande do Sul: USEB: Pelotas.
- Pereira, F. B., Alves, V. P., Rocha, B. M., Lima, S. S., & Luque, J. L. (2012). A new *Physaloptera* (Nematoda: Physalopteridae) parasite of *Tupinambis merianae* (Squamata: Teiidae) from southeastern Brazil. *Journal of Parasitology*, 98, 1227–1235.
- Pereira, F. B., Alves, V. P., Rocha, B. M., Lima, S. S., & Luque, J. L. (2014). *Physaloptera baina* n. sp. (Nematoda: Physalopteridae) parasitic in *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae), with a key to *Physaloptera* species parasitizing reptiles from Brazil. *Journal of Parasitology*, 100, 221–227.
- Ramalho, A. C. O., Silva, R. J., Schwartz, H. O., & Péres, A. K. (2009). Helminths from an introduced species (*Tupinambis merianae*), and two endemic species (*Trachylepis atlantica* and *Amphisbaena ridleyi*) from Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Journal of Parasitology*, 95, 1026–1028.
- Silva, A. S., Zanette, R. A., Tochetto, C., Oliveira, C. B., Soares, J. F., Otto, M. A., et al. (2008). Parasitismo por *Physaloptera* sp., *Kalicephalus* sp. e *Cryptosporidium* sp. em lagarto (*Tupinambis teguixin*) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências*, 10, 269–272.
- Spinelli, C. M., Fiorito, L. E., & Stiebel, C. (1992). Alteraciones histológicas em el intestino delgado em *Tupinambis rufescens* (Sauria, Teiidae) causadas por *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda, Diaphanocephalidae). *Cuaderno de Herpetología*, 7, 38–40.
- Vicente, J. J., Rodrigues, H. O., Gomes, D. C., & Pinto, R. M. (1993). Nematóides do Brasil, Parte III: Nematóides de répteis. *Revista Brasileira de Zoologia*, 10, 19–168.
- Windsor, D. A. (1995). Editorial: Equal rights for parasites. *Conservation Biology*, 9, 1–2.

Apêndice B - First record of *Brachylaima* (Trematoda: Brachylaimidae) in *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae)



Research note

First record of *Brachylaima* (Trematoda: Brachylaimidae) in *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae)

Primer registro de *Brachylaima* (Trematoda: Brachylaimidae) en *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae)

Fabiana Fedatto-Bernardon*, Thainá Dutra-Vieira, Gertrud Müller

Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, caixa postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Received 5 September 2016; accepted 9 March 2017

Available online 9 August 2017

Abstract

Twenty-four gastrointestinal tracts of *Salvator merianae* were examined for helminths research. Immature forms of *Brachylaima* sp. were identified with a prevalence of 4.16%. This is the first occurrence the Brachylaimidae for this host species in Brazil and in South America since the previous records of *Brachylaima* sp. in lizards were known only from Europe and Eurasia.

© 2017 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: Argentine black and white tegu; Trematoda; Parasites

Resumen

Se revisó el tubo gastrointestinal de 24 tegus argentinos *Salvator merianae* en busca de helmintos. Se encontraron formas inmaduras de *Brachylaima* sp. con una prevalencia del 4.16%. Este es el primer registro de Brachylaimidae en esta especie de hospedero en Brasil y en América del Sur, ya que los registros previos de *Brachylaima* sp. en lagartos se tenían solo de Europa y Eurasia.

© 2017 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Palabras clave: Tegu blanquinegro argentino; Trematoda; Parásitos

The geographical distribution of *Salvator merianae* (Duméril and Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae), Argentine black and white tegu comprises eastern Bolivia, Argentina, Uruguay and Brazil (Embert, Fitzgerald, & Waldez, 2010; Loebmann & Quintela, 2009). The lizard is omnivorous, feeding on fruits, insects, snails, fish, amphibians, reptiles, rodents, adult birds, nestlings and eggs (Achaval & Olmos, 2003).

Regarding the helminths of *S. merianae*, the diversity is composed of 6 species of Nematoda: *Cruzia travassosi*

Kalil and Vogelsangi, 1932 (Kathlaniidae); *Physaloptera retusa* Rudolphi, 1819 (Physalopteridae); *Diaphanocephalus galeatus* (Rudolphi, 1819) (Diaphanocephalidae); *Spinicauda spinicauda* Olfers, 1819 (Heterakidae); *Physaloptera tupinambae* Pereira, Alves, Rocha, Lima, and Luque, 2012 (Physalopteridae); *Physaloptera binae* Pereira, Alves, Rocha, Lima, and Luque, 2014 (Physalopteridae) and 1 species of Cestoda, *Oochoristica* sp. (Cyclophyllidae) (Ávila & Silva, 2010, 2011; Pereira, Alves, Rocha, Lima, & Luque, 2012, 2014; Vieira, Bernardon, & Müller, 2016). In this context, the present study had the aim to report the occurrence of Brachylaimidae (Trematoda) and their parasitological indexes in *S. merianae*.

Twenty-four *S. merianae* were necropsied (collected in the period of 2007–2015), 20 collected on highways of southern

* Corresponding author.

E-mail address: fabifedatto@gmail.com (F. Fedatto-Bernardon).

Peer Review under the responsibility of Universidad Nacional Autónoma de México.

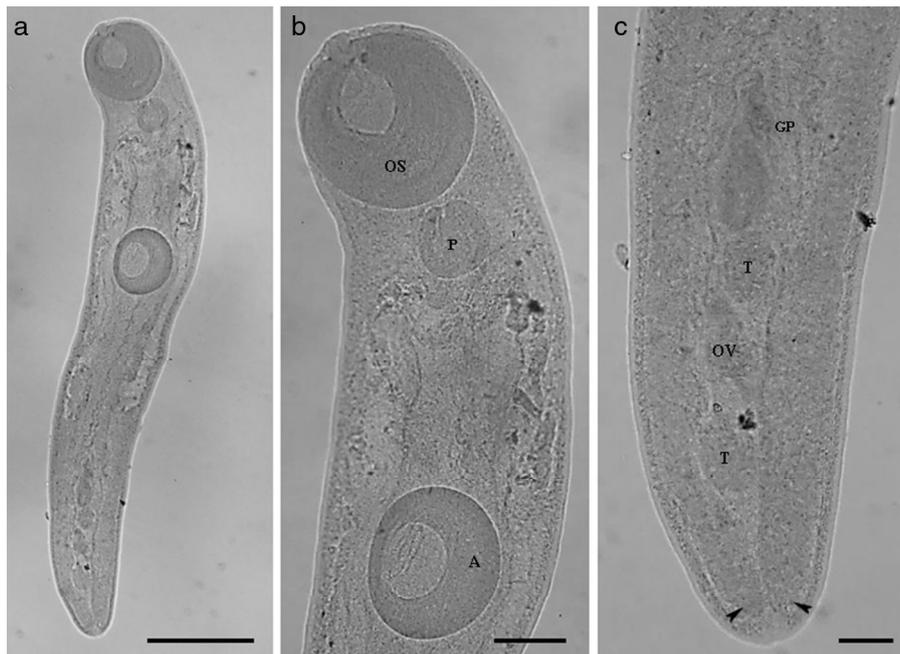


Figure 1. (a–c) *Brachylaima* Dujardin, 1843 (Trematoda: Brachylaimidae) parasite of *Salvator merianae* (Duméril and Bibron, 1839) from southern of Brazil. (a) Body of *Brachylaima* (bar = 0.42 mm); (b) OS = oral sucker; P = pharynx; A = acetabulum (bar = 0.1 mm); (c) GP = genital pore; OV = ovary; T = testes; arrow heads indicate the cecum (bar = 0.06 mm).

Brazil (in Rio Grande do Sul State) under the authorization “Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (ICMBIO-SISBIO 38913-1) from municipalities of Pelotas (31°46′19″ S, 52°20′33″ W) ($n = 13$), Capão do Leão (31°46′3″ S, 52°26′55″ W) ($n = 10$), and Morro Redondo (31°35′18″ S, 52°37′47″ W) ($n = 1$), and 4 were donated by the “Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre e Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Pelotas” (NURFS-CETAS/UFPel).

The gastrointestinal tracts were sectioned into esophagus, stomach, small intestine and large intestine. These were dissected and washed with a water jet through a sieve (150 μ m) and the resulting contents and mucous were examined under an Olympus SZ 51 stereomicroscope. The trematodes were quantified, fixed in AFA, stored in alcohol 70% and dyed with Carmin’s Langeron and mounted on slides with Canada’s balsam. These were viewed with an Olympus CX21 microscope for morphological and morphometric identification according to Gibson, Jones, and Bray (2002) and Valente, Diaz, Salomón, and Navone (2016).

Voucher specimens are deposited in “Coleção de Helmintos do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (CHLA-PASIL/UFPel)” (Nos. 637 and 638).

Measurements are expressed in millimeters (the mean shown in parentheses) and the photographs were taken with an Olympus BX 41 microscope with attached camera system. The parameters calculated were prevalence (P), mean abundance (MA) and mean intensity of infection (MI) according to Bush, Lafferty, Lotz, and Shostak (1997).

Class Trematoda Rudolphi, 1808

Subclass Digenea Carus, 1863

Family Brachylaimidae Joyeux & Foley, 1930

Genus *Brachylaima* Dujardin, 1843: (immature forms)

(Fig. 1a–c):

Characterization: based on 8 specimens (5 were measured). Length of body 1.66–2.35 (2.04 ± 0.34); width of body (level of acetabulum) 0.3–0.6 (0.43 ± 0.12); length of oral sucker 0.25–0.36 (0.31 ± 0.02); width of oral sucker 0.25–0.35 (0.31 ± 0.02); length of pharynx 0.1–0.18 (0.13 ± 0.03); width of pharynx 0.12–0.16 (0.14 ± 0.01); length of acetabulum 0.23–0.28 (0.26 ± 0.02); width of acetabulum 0.18–0.27 (0.23 ± 0.04); length of ovary 0.04–0.1 (0.07 ± 0.02); width of ovary 0.04–0.08 (0.05 ± 0.02); length of the anterior testicle 0.05–0.1 (0.08 ± 0.02) and width of anterior testicle 0.04–0.09 (0.06 ± 0.02); length of the posterior testicle 0.05–0.1 (0.08 ± 0.02) and width of the posterior testicle 0.03–0.08 (0.06 ± 0.02). The specimens do not present eggs.

Although the specimens found are immature forms, the following morphological characteristics allowed us to assign them to the genus *Brachylaima*: body elongated; acetabulum located in the anterior half of the body; presence of muscular pharynx; caeca long slightly sinuous, extending to the posterior extremity of the body; uterus intercaecal; vitelline fields extending between the posterior margin of the acetabulum to the anterior margin of the anterior testis; genital pore located in the anterior margin of anterior testis; gonads located in the posterior half of the body near the posterior extremity of the body.

Eight trematodes were found parasitizing the small intestine of only 1 *S. merianae* (P = 4.16%; MA = 0.33; MI = 8) from

Pelotas. The specimens when compared to adults are smaller in size with respect to morphology, exhibit testis, ovary and vitelline glands reduced, and the absence of eggs.

The history of *Brachylaima* Dujardin, 1843 is confusing at first, because some authors, generating various synonyms, used different spelling. *Brachylaima* Dujardin, 1843 (Syns *Brachylaime* Dujardin, 1843; *Brachylaimus* Dujardin, 1845; *Brachylaemus* Blanchard, 1847; *Harmostomum* Braun, 1899; *Heterolope* Looss, 1899; *Entosiphonus* Sinitsin, 1931; *Centrodes* Travassos & Kohn, 1964; *Mazzantia* Travassos & Kohn, 1964; *Rallitrema* Travassos & Kohn, 1964) (Gibson et al., 2002). According to Pojmanska (2002), Brachylaimidae Joyeux and Foley, 1930 is composed of Brachylaiminae Joyeux and Foley, 1930 and Ityogoniminae Yamaguti, 1958. Brachylaiminae includes *Brachylaima*; *Glaphyrostomum* Braun, 1901; *Parabrachylaima* Lotz and Corkum, 1975; *Postharmostomum* Witenberg, 1923 and *Ectosiphonus* Sinitsin, 1931 (Gibson et al., 2002).

In Brazil, 4 species of *Brachylaima*, *Brachylaima advena* Dujardin, 1843; *Brachylaima centrodes* (Braun, 1901); *Brachylaima marsupium* (Braun, 1901) and *Brachylaima mazzantii* (Travassos, 1927) have been registered in mammals (Muridae, Cricetidae; Didelphidae) and birds (Columbidae, Odontophoridae, Tinamidae) (Travassos, Teixeira-de Freitas, & Kohn, 1969). Although there are no reports of *Brachylaima* sp. parasiting *S. merianae*, other digeneans were found parasitizing Teiidae, in *Tupinambis teguixin* Linnaeus, 1758: *Pulchrosomoides elegans* Freitas and Lent, 1937 (Cathaemasiidae); *Paradistomum parvissimum* (Travassos, 1918) (Pronocephalidae); *Dasymetra tupinambis* Nasir and Diaz, 1971 (Plagiorchiidae) and in *Tupinambis rufescens* (Günther, 1871): *Styphlodora condita* Faria, 1911 (Plagiorchiidae) (Ávila & Silva, 2010).

Brachylaima species are generally found in the alimentary tract of birds, mammals and rarely in amphibians (Gibson et al., 2002). For lizards, (Squamata) immature forms were registered in the Spain by Roca, López-Balaguer, and Hornero (1989) in *Podarcis bocagei* (Seoane, 1884) (Lacertidae) (P=0.9%). For the islands (Balearic Archipelago) in *Podarcis pityusensis* (Boscá, 1883) [P=0.2% (n=564)] and in *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874) [P=0.8%; MA=0.01; MI=1.3 (n=386)] (Roca, 1996).

In Portugal, Galdón, Roca, Barbosa and Carretero (2006) recorded in *P. bocagei* [P=0.4% (n=249)] and *Podarcis carbonelli* Pérez Mellado, 1981 (Lacertidae [P=1.2%; MA=4.7; MI=0.05] (n=257)]. In Turkey, Yildirimhan, Bursey, and Altunel (2011) in *Lacerta trilineata* Bedriaga, 1886 (Lacertidae) [P=9%; MA=0.4; MI=5 (n=38)] and Incedogan, Yildirimhan, and Bursey (2014) in *Chalcides ocellatus* (Forsk., 1775) (Scincidae) [P=2.2%; MA=0.02; MI=12 (n=45)]. In Poland, registered in *Anguis fragilis* Linnaeus, 1758 (Anguidae) and *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758 (Lacertidae) (Lewin, 1990, 1992 apud Incedogan, Yildirimhan, & Bursey, 2014).

In this study, the prevalence, mean abundance and mean intensity values of infection found for *Brachylaima* sp. in *S. merianae* were low (P=4.16%; MA=0.33; MI=8), corroborating with previous studies which indicate that this is a parasite atypical in lizards (Galdón, Roca, Barbosa, & Carretero, 2006;

Incedogan et al., 2014; Roca et al., 1989; Yildirimhan, Bursey, & Altunel, 2011).

The life cycle of *Brachylaima* spp. has 2 terrestrial gastropods as intermediate hosts and birds, mammals and less frequently amphibians and reptiles as definitive hosts (Butcher & Grove, 2001). It is probable that the infestation of *Brachylaima* sp. in *S. merianae* occurred through the feeding cycle (Kiefer & Sazima, 2002).

Cases of infection *Brachylaima* spp. in humans were recorded in South Australia (Butcher, 2016; Butcher & Grove, 2001). The patients (2 children and 1 adult) had gastrointestinal symptoms such as abdominal pain and chronic diarrhea. After treatment, adults and eggs of the trematodes were obtained and through experimental infection were identified as *Brachylaima cribbi* Butcher and Groove, 2001 (Butcher, 2016). Both patients lived in rural areas, with plenty of snails, which after analysis of these cases were confirmed as the source of infection in children and adults, the ingestion of raw snails and vegetables contaminated respectively (Butcher, 2016). Although in Brazil there are no cases of infection in humans, the occurrence of *Brachylaima* sp. in *S. merianae* serves as an alert for possible infections, and in other animals that are natural predators such as the carnivorous mammals: *Procyon cancrivorus* (Cuvier, 1789), and *Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758 (Quintela, Lob, & Artioli, 2014; Rangel & Neiva, 2013), once the digenetic has zoonotic potential, and the predators may hold their dispersion.

For the first time in Brazil and the South American continent, immature forms of *Brachylaima* sp. were registered in *S. merianae* presenting the morphological characterization, parasitological indexes and photographs.

We thank the ICMBio for authorization, the NURFS-CETAS/UFPEL for donating dead lizards, and Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior by financial support through the edict 2010/032.

References

- Achaval, F., & Olmos, A. (2003). *Anfibios y reptiles del Uruguay* (2^a ed.). Montevideo: Montevideo Graphis.
- Ávila, W. R., & Silva, J. R. (2010). Checklist of helminths from lizards and amphisbaenians (Reptilia: Squamata) of South America. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16, 543–572.
- Ávila, W. R., & Silva, J. R. (2011). Helminths of lizards (Reptilia: Squamata) from Mato Grosso State, Brazil. *Comparative Parasitology*, 78, 129–139.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575–583.
- Butcher, A. R. (2016). Children, snails and worms: the *Brachylaima cribbi* story. *Microbiology Australia*, 37, 30–33.
- Butcher, A. R., & Grove, D. I. (2001). Description of the life-cycle stages of *Brachylaima cribbi* n. sp. (Digenea: Brachylaimidae) derived from eggs recovered from human faeces in Australia. *Systematic Parasitology*, 49, 211–221.
- Embert, D., Fitzgerald, L., & Waldez, F. (2010). *Salvator merianae*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3.. Retrieved from www.iucnredlist.org
- Galdón, M. A., Roca, V., Barbosa, D., & Carretero, M. A. (2006). Intestinal helminth communities of *Podarcis bocagei* and *Podarcis carbonelli* (Sauria: Lacertidae) in NW Portugal. *Helminthologia*, 43, 37–41.
- Gibson, D. I., Jones, A., & Bray, R. A. (2002). *Keys to the Trematoda*. London: Ed. CABI.

- Incedogan, S., Yildirimhan, H. S., & Bursey, C. R. (2014). Helminth parasites of the ocellated skink *Chalcides ocellatus* (Forsk., 1775) (Scincidae) from Turkey. *Comparative Parasitology*, 81, 260–269.
- Kiefer, M. C., & Sazima, I. (2002). Diet of juvenile tegu lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae) in southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 23, 105–108.
- Lewin, J. (1990). Parasitic worms in a slowworm (*Anguis fragilis* L.) population from the Bieszczady Mountains (Poland). *Acta Parasitologica Polonica*, 35, 207–215.
- Lewin, J. (1992). Parasites of the sand lizard (*Lacerta agilis* L.) in Poland. *Acta Parasitologica*, 37, 19–24.
- Loebmann, D., & Quintela, F. M. (2009). *Guia Ilustrado – Os Répteis da Região Costeira do Extremo Sul do Brasil*. Rio Grande do Sul: USEB, Pelotas.
- Pereira, F. B., Alves, V. P., Rocha, B. M., Lima, S. S., & Luque, J. L. (2012). A new *Physaloptera* (Nematoda: Physalopteridae) parasite of *Tupinambis merianae* (Squamata: Teiidae) from Southeastern Brazil. *Journal of Parasitology*, 98, 1227–1235.
- Pereira, F. B., Alves, V. P., Rocha, B. M., Lima, S. S., & Luque, J. L. (2014). *Physaloptera baina* n. sp. (Nematoda: Physalopteridae) parasitic in *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae), with a key to *Physaloptera* species parasitizing reptiles from Brazil. *Journal of Parasitology*, 100, 221–227.
- Pojmanska, T. (2002). Family Brachylaimidae Joyeux & Foley 1930. In D. I. Gibson, A. Jones, & R. A. Bray (Eds.), *Keys to the Trematoda* (pp. 37–43). London: Ed. CABI.
- Quintela, F. M., Lob, G., & Artioli, L. G. S. (2014). Diet of *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) in restinga and estuarine environments of southern Brazil. *Iheringia Série Zoologia*, 104, 143–149.
- Rangel, C. H., & Neiva, C. H. M. B. (2013). Predação de vertebrados por cães *Canis lupus* F Familiaris (Mammalia: Carnivora) no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *Biodiversidade Brasileira*, 2, 261–269.
- Roca, V. (1996). The effect of some factors on the helminth parasite infracommunities of *Podarcis lizards* in the Balearic Islands (Western Mediterranean). *Bolleti de la Societat d'Historia Natural de les Balears*, 39, 65–76.
- Roca, V., López-Balaguer, E., & Hornero, M. J. (1989). Helminthofauna de *Podarcis hispanica* (Steindachner, 1870) y *Podarcis bocagei* (Seoane, 1884) (Reptilia: Lacertidae) em el Cuadrante Noroccidental de la Península Ibérica. *Revista Ibérica de Parasitología*, 49, 127–135.
- Travassos, L., Teixeira de Feitas, J. F., & Kohn, A. (1969). Trematódeos do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 67, 1–886.
- Valente, R., Diaz, J. I., Salomón, O. D., & Navone, G. T. (2016). The role of *Phyllocaulis variegatus* (Mollusca: Veronicellidae) on the transmission of digenean parasites. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, 255–257.
- Vieira, T. D., Bernardon, F. F., & Müller, G. (2016). *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda: Diaphanocephalidae), parasite of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae) in southern Brazil. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, 512–515.
- Yildirimhan, H. S., Bursey, C. R., & Altunel, F. N. (2011). Helminth parasites of the Balkan green lizard, *Lacerta trilineata* Bedriaga 1886, from Bursa, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 35, 519–535.

Apêndice C – Número dos vouchers de helmintos depositados em coleções

Apêndice C - Número dos vouchers de helmintos parasitos de *Salvator merianae* (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata: Teiidae) do sul do Brasil depositados em coleções .

Espécie/ n ° Voucher	Coleção	Localidade
<i>Diaphanocephalus galeatus</i> N° 605-611 <i>Brachylaima</i> sp. N° 637-638	Coleção de Helmintos do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Universidade Federal de Pelotas (CHLAPASIL/UFPel)	Rio Grande do Sul, Brasil
<i>Diaphanocephalus galeatus</i> N° 6735-6737	Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC)	Rio de Janeiro, Brasil
<i>Diaphanocephalus galeatus</i> N° 6843	Coleção de Invertebrados Museo de La Plata (MLP-He)	La Plata, Argentina
<i>Diaphanocephalus galeatus</i> N° 2020.56	Coleção de Parasitologia do Centro de Investigação Marinha (CIIMAR) da Universidade do Porto	Porto, Portugal

Apêndice D - Morphological, molecular and phylogenetic analyses of *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda: Diaphanocephalidae). Artigo formatado e submetido à revista Parasitology International

Morphological, molecular and phylogenetic analyses of *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda: Diaphanocephalidae)

Thainá Dutra Vieira^{a,b,c}, Luís Filipe Rangel^{a,b}, Fabiana Fedatto Bernardon^c, Gertrud Müller^c, Maria João Santos^{a,b}

^a Laboratório de Patologia Animal, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal¹

^b Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Porto, Portugal¹

^c Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil

Corresponding author: Thainá Dutra Vieira; “Permanent address”: Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa postal: 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: thainadutravieira@hotmail.com; Tel: +55 53 32757635; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5396-5007>

Luís Filipe Rangel: luisfiliperangel@sapo.pt

Fabiana Fedatto Bernardon: fabifedatto@gmail.com

Gertrud Müller: gertrudmuller40@gmail.com

Maria João Santos: mjsantos@fc.up.pt

¹This study was carried out by the first author in partnership with the other authors, part of which was carried out in Brazil where the author resides, and another part carried out in Portugal during the period of mobility at the mentioned addresses above.

Short communication

Abstract

Molecular studies of Diaphanocephalidae are scarce, in this sense, this work presents for the first time the sequencing of the ITS and 28S region of the rDNA of *Diaphanocephalus galeatus* from *Salvator merianae* to establish its phylogenetic position among other species of Strongylida nematodes. In addition, it describes a detailed morphology of this species. Based on the phylogenetic analyzes of the two gene regions, Diaphanocephaloidea was systematically grouped with Strongyloidea and Ancylostomatoidea species, being more distant from the Trichostrongyloidea and Metastrongyloidea species. The genetic characterization of this study complements the information on the morphology and defines the position of *D. galeatus* in Strongylida.

Keywords: Helminths, parasites, *Salvator merianae*, *Diaphanocephalus*, phylogeny, Strongylida

The Strongylida order represents one of the major groups of Nematoda, with parasites distributed worldwide occurring widely in vertebrates [1]. According to Anderson *et al.*, [2] Strongylida consists of five well-defined superfamilies: Ancylostomatoidea, Diaphanocephaloidea, Strongyloidea, Metastrongyloidea and Trichostrongyloidea.

There are only two valid species for the genus *Diaphanocephalus* Diesing, 1851, *Diaphanocephalus galeatus* (Rudolphi, 1819) and *Diaphanocephalus diesingi* Freitas and Lent, 1938 [3]. Records of *D. galeatus* were performed only in South America. In *Salvator merianae* (Duméril and Bibron, 1839) was registered just in Brazil

[4, 5, 6]. Molecular studies the *D. galeatus* are scarce and included only a short DNA sequence of the large subunit ribosomal RNA (28S rRNA) gene [3].

The combined use of genetic and morphological data can contribute significantly to the identification of parasites in relation to the use of just one method [7]. Therefore, the aim of this study was to increase the morphological data of *D. galeatus*, as well as to sequence the 28S and ITS region of rDNA, and to confirm the phylogenetic position of the species among other Strongylida nematodes.

Forty-six *S. meriana* were necropsied, 37 of which were collected already dead on highways of southern Brazil, under permission issued to Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Nº38913-1); and the remaining 9 animals were donated by Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre and Centro de Triagem de Animais Silvestres of Universidade Federal de Pelotas. The lizards were collected in four cities from state of Rio Grande do Sul in Brazil: Pelotas, Capão do Leão, Morro Redondo and Rio Grande.

For the parasitological survey each host organ was examined individually, and was washed with water through an 150µm sieve. Parasites found were removed, quantified, washed in distilled water, and fixed in 70% ethanol.

For morphological analysis 20 worms were mounted on semi-permanent slides with glycerin, and were observed with the aid of a microscope. The morphological identification and the morphometric measurements were performed according to specific bibliography [2, 3, 8].

The worms measurements were expressed in millimeters (mean± standard deviation, range, n = number of specimens measured), and the photographs were taken with a digital camera using the software AxioVision Rel.4.6. The camera lucida of the microscope was used for building a schematic drawing of the nematode.

The determined ecological parameters were prevalence (P in %), mean abundance [(MA)± standard deviation (SD), range(R)] and mean intensity [(MI)±(SD), (R)] of infection according to Bush *et al.*, [9]. Voucher specimens were deposited in collections (supplementary material).

Genomic DNA was extracted from 2 specimen stored in 70% ethanol using the GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), following the manufacturer's instructions. The 28S rRNA gene and the ITS rRNA region were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers indicated in the literature [10, 11, 12, 13] (supplementary material).

The reaction consisted of an aliquot of 2µL of genomic DNA, 0.2µM of each oligonucleotide primer, 1x Taq polymerase reaction buffer, 2.5mM of MgCl₂, 0.2mM of dNTPmix (NZYTech, Lisbon Portugal), 1.25 units of Recombinant Taq DNA polymerase (NZYTech), and 17.5µL ultrapure H₂O to complete the final volume of 25µL.

Amplification was performed under the following conditions: an initial cycle of denaturation at 95 °C for 3min, 35 cycles 95 °C for 1min, 55 °C for 1min, 72 °C for 2min, and a final extension at 72 °C for 7min, followed by cooling to 4 °C. The amplicons were subjected to sequencing by STAB VIDA (Caparica, Portugal).

The DNA fragments were assembled into consensus DNA sequences for the 28S and ITS rDNA regions for *D. galeatus* and were submitted to BLAST in the GenBank to search for close relatives.

DNA sequences from close relatives species and other species representing the five superfamilies of Strongylida were downloaded from the GenBank database. *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) (X03680) and *Heterorhabditis zealandica* (Poinar, 1990) (AM039761) (Nematoda: Rhabditidae) were chosen as the outgroup.

The sequences were aligned using the MAFFT v7.429 [14], with the multiple alignment strategy L-INS-i, and default parameters.

Phylogenetic analyses for both 28S and ITS rRNA trees were conducted using maximum likelihood (ML) in MEGA7 [15] and Bayesian inference (BI) in MrBayes v3.2.6 [16]. For the ML, the general time reversible (GTR) model with a discrete Gamma distribution and invariant sites were used with the bootstrap estimation from 1000 replications and for the BI, the posterior probabilities were estimated using Markov chain Monte Carlo (MCMC) method, from 1000000 generations with 4 simultaneous MCMC chains, and 2 independent runs, sampled at intervals of 100 trees, with 25% burn-in. Trees were edited and annotated in FigTree v1.4.4 and Inkscape v0.92.4.

Thirty-nine *S. merianae* were found parasitized by *D. galeatus*, totalizing 1305 specimens of the nematode (727 ♀ and 578 ♂) recording P=84.8%, MA=28.4 ± 34.58, 0-159, MI=33.5 ± 35.24, 1–159 worms per host (Fig. 1). The nematodes were found in the stomach, small and large intestine.

Morphological description of D. galeatus (Fig. 1):

Small whitish nematodes with striated transverse cuticle. Bivalve oral aperture, with little orifice displaced to the back and small “membranous denticles” present, delimiting the inner dorsoventral margin of the oral aperture. Cephalic end with lip-like protrusion. Broad and complex buccal capsule, formed by a set of strongly sclerotized plates, being arranged seven (paired) on each side and a single basal support. Each side of the buccal capsule has a narrow plate articulated in the perio-oral region, two anterior oval plates, one dorsal and one ventral, supported by two adjacent and long lateral plates, a long lateral median plate supporting the mid-region of the buccal capsule and a rectangular plate that is hinged to the single basal support plate which supports the

base of the buccal capsule. There are also developed membranous cuticular processes in triangular shape located at the inner base of the buccal capsule. Claviform esophagus, strongly muscular. Around the esophagus there are two groups of esophageal gland cells, one dorsal and one ventral. Nerve ring surrounding the esophagus, situated at the level of a constriction (first third). Excretory pore located slightly below the esophageal constriction, at the same level are the small and pointed deirids. Large intestine of wavy walls. Sexual dimorphism evident, females with tapered tail and males with campanulate copulatory bursa.

Male (n=10): Body length 3.48 ± 0.59 (2.69–4.50, 10), width (half body) 0.39 ± 0.06 (0.30–0.46, 10). Buccal capsule 0.25 ± 0.03 (0.17–0.28, 10) long, 0.28 ± 0.03 (0.24–0.32, 10) width. Length of the esophagus 0.42 ± 0.03 (0.39–0.48, 10), and width (maximum width) 0.21 ± 0.03 (0.17–0.27, 10). Distance from the nervous ring to the cephalic end 0.35 ± 0.02 (0.34–0.38, 5), from the excretory pore to the cephalic end 0.39 ± 0.05 (0.31–0.48, 10) and from the deirid to the cephalic end 0.53 (n=1). Bell-shaped ventral closed copulatory bursa. Dorsal caudal gibbosity present. A pair of prebursal papillae present. Unequal and unsheathed spicules, the largest 0.68 ± 0.09 (0.58–0.84, 9) length, and the smallest 0.44 ± 0.03 (0.40–0.49, 9). Gubernaculum present 0.28 ± 0.12 (0.18–0.51, 9) in length. Protruding genital cone or not, in some specimens measuring 0.30 ± 0.01 (0.29–0.30, 2). Side-symmetrical copulatory bursa consisting of 6 pairs of robust bursal rays along the lateral border, and dorsal radius consisting of four segments, two outer single-branched and two inner branches ending in a bifid tip.

Female (n=10): Body length 4.30 ± 1.02 (2.19–5.62, 10), width (half body) 0.45 ± 0.07 (0.31–0.51, 10). Buccal capsule 0.32 ± 0.05 (0.23–0.38, 10) long, 0.34 ± 0.03 (0.30–0.39, 10) width. Esophagus length 0.49 ± 0.04 (0.42–0.57, 10) and width (maximum width) 0.24 ± 0.04 (0.19–0.30, 10). Distance from the nervous ring to the cephalic end

0.41±0.01 (0.41-0.42, 3), the excretory pore to the cephalic end 0.51±0.09 (0.40-0.62, 8) and from the deirid to the cephalic end 0.61 (n=1). Females with protruding lip vulva located in the posterior third of the body, 0.85±0.26 (0.52-1.20) away from the posterior extremity. Didelphic, amphidelphic uterus with few eggs. Thin and smooth shell ellipsoidal eggs 0.07±0.01 (0.06-0.09, 10) long, 0.04±0.01 (0.03-0.06, 10) width. Length of the ovejector 0.37±0.05 (0.30-0.43, 6). Anus situated at 0.12±0.03 (0.09-0.18, 10) from rear end. Tapered tail, ending in a tapered tip with a small phasmid located at 0.05±0.01 (0.04-0.05, 4) from the end.

Assembly of the PCR fragments of the ITS region (ITS1 and ITS2) and the 5.8S rRNA gene resulted in a sequence of 1409bp, which include a final portion of the 18S rRNA gene and an initial portion of the 28S rRNA gene (GenBank accession MN592675).

For the 28S rDNA region the assembly resulted in a sequence of 3153bp (GenBank accession MN589648). The D2-D3 region of this sequence showed some differences when compared to the sequence of *D. galeatus* deposited by Pereira *et al.*, [3] in GenBank (MH134561) because of this, the D2-D3 region of the 28S rRNA gene from a second sample was amplified to confirm that differences in the first sample were not due to sequencing errors. The DNA sequence of the D2-D3 regions of the second sample (GenBank accession MN589649) were 100% identical to the first sample.

The DNA sequences of the D2-D3 regions obtained in this study had 99.0% of similarity with *D. galeatus* (MH134561) from the GenBank.

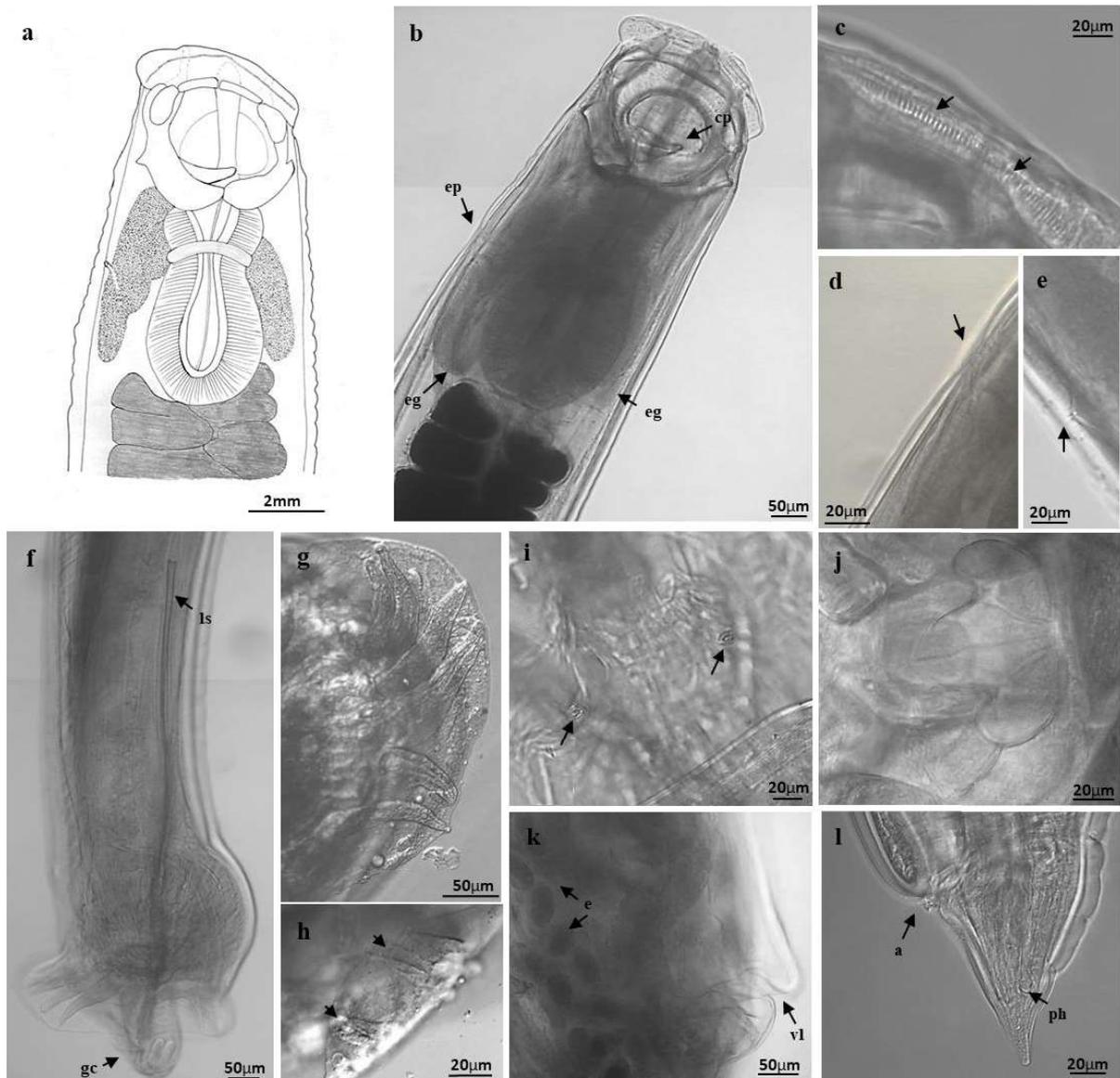


Figure 1 *Diaphanocephalus galeatus* (Rudolphi, 1819) parasite of *Salvator merianae* (Duméril and Bibron, 1839). **(a)** Anterior region, drawing made in camera lucida (side view); **(b)** buccal capsule in lateral view, arrows point to the excretory pore (ep), esophageal glands (eg) and membranous cuticular process (cp); **(c)** detail of the “denticles” that delimit the inner margin of the buccal capsule; **(d)** excretory pore (arrow) in lateral view; **(e)** deirid (arrow) at same height as excretory pore; **(f)** posterior region of male in lateral view, arrows point to larger spicule (ls) and genital cone (gc); **(g)** ventral view of one side of the male copulatory bursa, detail of the lateral bursal rays; **(h)** dorsal rays, arrows point to inner rays ending in bifid tip; **(i)** arrows point to the pair of pre-bursal papillae of the male, ventral view; **(j)** female ovejector; **(k)** arrows point to female eggs (e) and vulvar lip (vl); **(l)** posterior region of female, tail ends in tip, arrow points to anus(a) and phasmid (ph)

Morphologically the specimens of *D. galeatus* this study are identical to those published by Pereira *et al.*, [6] presenting the same structures and similar measurements. They differ from *D. diesing* by shorter length of the spicules and gubernaculum in males and by the vulvar region and aspect of the ovejector in

females [8]. However, in our study we could observe the presence of two groups of esophageal glandular cells around the esophagus, one dorsal and one ventral which were illustrated and photographed (Fig 1.a-b). This morphological feature was previously mentioned by Freitas and Lent [8], but poorly illustrated and was missing in the work of Pereira *et al.*, [3].

The sequences obtained from the specimens of the present study were identical between them, and showed some genetic differences when compared to *D. galeatus* available from GenBank. Thus, this genetic variation, could be explained because the amplified fragment corresponds to the 28S rDNA region D2 and D3, which generally presents high sequential divergence even between related species [17].

The tree topologies were similar among the evaluated regions, but with slight differences (Fig. 2). Diaphanocephaloidea systematically clustered with species of Strongyloidea and Ancylostomatoidea, been more distant to Trichostrongyloidea and Metastrongyloidea species. This position of Diaphanocephaloidea corroborate the results of Chilton *et al.*, [1] and Pereira *et al.*, [3].

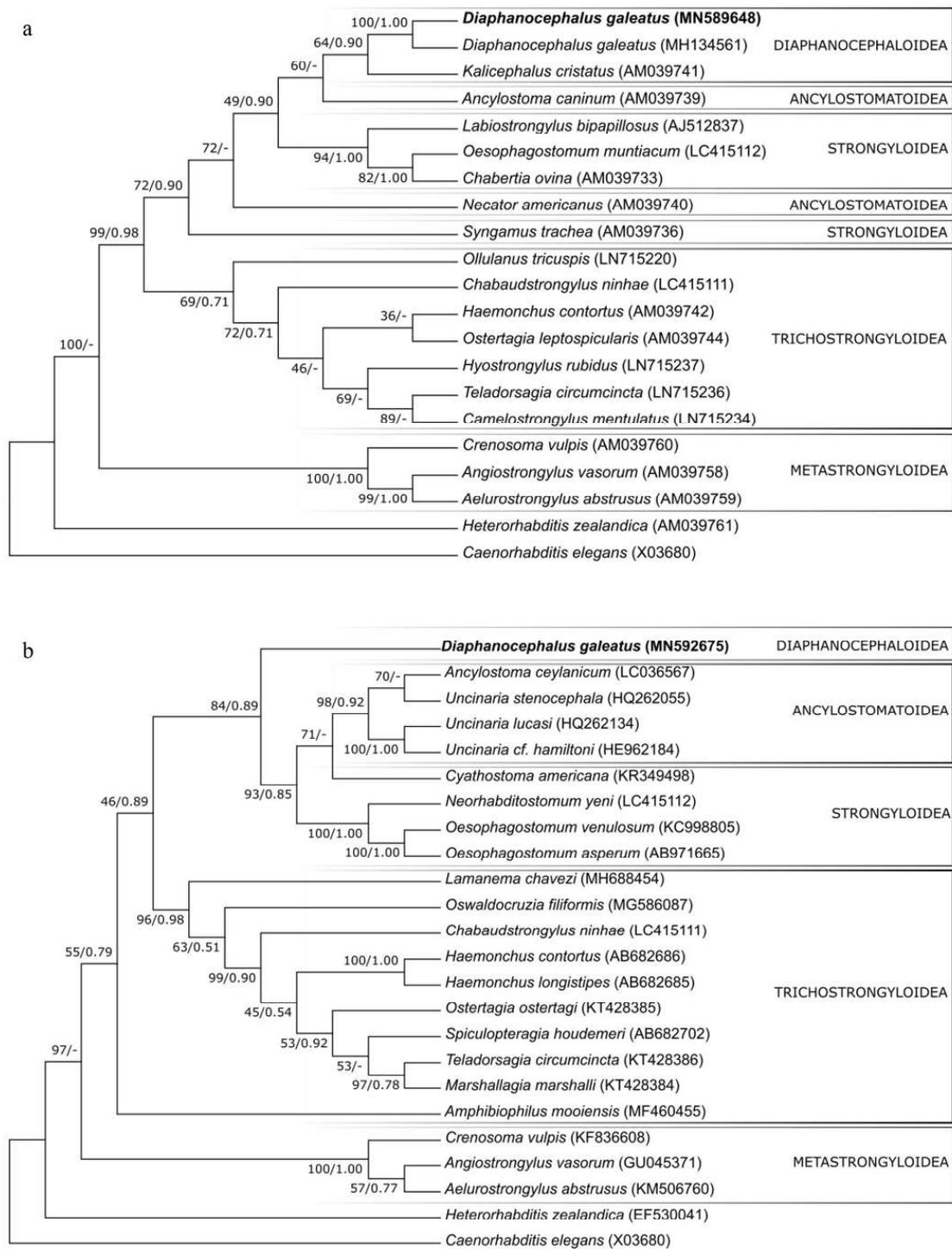
Chilton *et al.*, [1] suggested that the use of a more variable region, such as the first and second ribosomal internal transcribed spacers together with 28S rDNA sequence data, could provide more informative characters to examine the relationships of these taxa. The DNA sequence from the ITS rDNA region used in this study allowed us to reaffirm the phylogenetic position of Diaphanocephaloidea in Strongylida, and to complement existing results with the inclusion of sequences from new regions of representatives of Diaphanocephalidae. This study present the first DNA sequence for the ITS rDNA region for a *Diaphanocephalus* species.

The genetic characterization in this study complements the morphology previously performed by the authors and defines the positioning of the species within

Strongylida. Genetic data already available helped in the present study and the availability of genetic sequences from other regions of DNA are important to complement future studies with other populations of the same species from other hosts or localities.

The authors thank the ICMBio for authorization, the NURFS-CETAS/UFPel for donating dead lizards.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001, for the doctoral scholarship given to the first author and was supported by national funds through FCT - Foundation for Science and Technology within the scope of UIDB/04423/2020 and IDP/04423/2020.



References

- [1] N.B. Chilton, F. Huby-Chilton, R.B. Gasser, I. Beveridge. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40 (2006) 118-128. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.01.003>.
- [2] R.C. Anderson, A.G. Chabaud, S. Willmott, Keys to the nematode parasites of vertebrates. Ed., CABI, London, UK, 2009.
- [3] F.B. Pereira, V.L. Ferreira, W.M. Tomas, C. Elisei, F. Paiva, L.E.R. Tavares, *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda: Diaphanocephalidae), a poorly known parasite of lizards: redescription, first genetic characterization and a revision of its congeners from Brazil. *J. Helminthol.* 93 (2019) 629-635. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18000597>.
- [4] W.R. Ávila, J.R. Silva, Helminths of lizards (Reptilia: Squamata) from Mato Grosso State, Brazil. *Comp. Parasitol.* 78 (2011) 129–139. <https://doi.org/10.1654/4473.1>.
- [5] T.D. Vieira, F. Fedatto-Bernardon, G. Müller, 2016. *Diaphanocephalus galeatus* (Nematoda: Diaphanocephalidae), parasite of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae) in southern Brazil. *Rev. Mex. Biodivers.* 87(2), 512-515. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.04.010>.

- [6] A.A.M. Teixeira, S.V. Brito, D.A. Teles, S.C.Ribeiro, J.A. Araujo-Filho, V. F. Lima, A.M.A. Pereira, W.O. Almeida, 2017. Helminths of the lizard *Salvator merianae* (Squamata, Teiidae) in the caatinga, northeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 77(2), 312-317. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.13515>.
- [7] A.C. Pires, L. Marinoni, 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotrop.* 10(2), 339-346. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032010000200035>.
- [8] J.F.T. Freitas, H. Lent, Pesquisas helmintológicas realizadas no Estado do Pará, V. gênero *Diaphanocephalus* Diesing, 1851 (Nematoda: Strongyloidea). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 33 (1938) 423–432. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751993000100003>.
- [9] A.O. Bush, K.D. Lafferty, J.M. Lotz, A.W. Shostak, 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *J. Parasitol.* 83(4), 575–583. <https://doi.org/10.7939/R3J38KV04>.
- [10] H.W. Palm, A. Waeschenbach, P.D. Olson, D.T.J. Littlewood, Molecular phylogeny and evolution of the *Trypanorhyncha* Diesing, 1863 (Platyhelminthes: Cestoda). *Mol. Phylogenet. Evol.* 52 (2009) 351–367. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.01.019>.

[11] A. Waeschenbach, B.L. Webster, R.A. Bray, D.T.J. Littlewood, Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. *Mol. Phylogenetics Evol.* 45 (2007) 311–325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.019>.

[12] A.E. Lockyer, P.D. Olson, D.T.J. Littlewood, Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory. *Biol. J. Linn. Soc.* 78 (2003) 155–171. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00141.x>.

[13] O. Jousson, P. Bartoli, J. Pawlowski, Molecular identification of developmental stages in Opecoelidae (Digenea). *Int. J. Parasitol.* 29 (1999) 1853–1858. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00124-1).

[14] K. Katoh, D.M. Standley, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

[15] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

[16] F. Ronquist, M. Teslenko, P. Van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard, J.P. Huelsenbeck, MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian

phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Syst. Biol.* 61 (2012) 539–542.

[17] P. De Ley, I.T. De Ley, K. Morris, E. Abebe, M. Mundo-Ocampo, M. Yoder, J. Heras, D. Waumann, A. Rocha-Olivares, A.H.J. Burr, J.G. Baldwin, W.K. Thomas, 2005. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360(1462), 1945-1958. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1726>.

Supplementary material

Table 1: Primers used for PCR and sequencing the worms of *Diaphanocephalus galeatus*.

Primer	Sequence (5'-3')	Paired with	Source
28S rDNA			
XZ1	ACCCGCTGAATTTAAGCATAT	1500R	Palm <i>et al.</i> , [10]
900F	CCGTCTTGAAACACGGACCAAG	L2230	Waeschenbach <i>et al.</i> , [11]
1600F	GCAGGACGGTGGCCATGGAAG	L2630	Waeschenbach <i>et al.</i> , [11]
U2229	TACCCATATCCGCAGCAGGTCT	L3449	Waeschenbach <i>et al.</i> , [11]
1500R	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG	XZ1	Waeschenbach <i>et al.</i> , [11]
L2230	AGACCTGCTGCGGATATGGGT	900F	Lockyer <i>et al.</i> , [12]
L2630	GGGAATCTCGTTAATCCATTCA	1600F	Waeschenbach <i>et al.</i> , [11]
L3449	ATTCTGACTTAGAGGCGTTCA	U2229	Lockyer <i>et al.</i> , [12]
ITS rDNA			
S18	TACAGGTCTGTGATGCC	L3T	Jousson <i>et al.</i> , [13]
L3T	CAACTTCCCTCACGGTACTTG	S18	Jousson <i>et al.</i> , [13]

Table 2: Voucher specimens of *Diaphanocephalus galeatus* deposited in collections.

Voucher specimens (N°)	Collection	Locality
N° 605-611	Coleção de Helmintos do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Universidade Federal de Pelotas (CHLAPASIL/UFPel)	Rio Grande do Sul, Brazil
N° 6735-6737	Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC)	Rio de Janeiro, Brazil
N° 6843	Coleção de Invertebrados Museo de La Plata (MLP-He)	La Plata, Argentina
N° 2020.56	Coleção de Parasitologia do Centro de Investigação Marinha (CIIMAR) of Universidade do Porto	Porto, Portugal

Apêndice E – Artigo referente ao projeto desenvolvido durante Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (Edital nº47/2017 PDSE) na Universidade do Porto, Porto, Portugal escrito e formatado com a intenção de submissão à revista Parasitology Research

Metacercárias de *Macvicaria crassigula* e *Zoogonus rubellus* (Trematoda: Digenea) em *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Parechinidae) do Porto, Portugal

Thainá Dutra Vieira^{1,2,3}, Luís Filipe Rangel^{1,2}, Gertrud Müller³, Maria João Santos^{1,2}

¹ Laboratório de Patologia Animal, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências,
Universidade do Porto, Porto, Portugal

² Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Porto,
Portugal

³ Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, Departamento de Microbiologia e
Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil

Autor correspondente: Thainá Dutra Vieira; email: thainadutravieira@hotmail.com Tel: +55 53
32757635; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5396-5007>

Luís Filipe Rangel: <https://orcid.org/0000-0002-8503-7763>

Gertrud Müller: <https://orcid.org/0000-0002-2213-6721>

Maria João Santos: <https://orcid.org/0000-0001-6655-491X>

Submission guidelines: <https://www.springer.com/journal/436/submission-guidelines>

Resumo

Paracentrotus lividus é a espécie ouriço-do-mar mais abundante na região do Porto, e tem sido intensamente capturada, pois suas gônadas são apreciadas e comercializadas como fruto-do-mar. Estudos de busca e investigação dos parasitos que acometem a espécie tornam-se necessários uma vez que esses animais podem servir como hospedeiros para parasitos com potencial zoonótico. Foram encontradas duas espécies de metacercárias parasitando o ouriço, *Macvicaria crassigula* e *Zoogonus rubellus* que foram identificadas e caracterizadas molecularmente, e tiveram seus índices de prevalência e intensidade média de infecção calculados.

Palavras-chave: parasitos, helmintos, Opecoelidae, Zoogonidae, ouriço-do-mar-roxo

1 Introdução

Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Parechinidae) conhecido popularmente por ouriço-do-mar-roxo é a espécie mais abundante na região do Porto, Portugal. Tem uma ampla distribuição no Mar Mediterrâneo e ao longo da costa nordeste atlântica, desde a Escócia e Irlanda até ao sul de Marrocos, às ilhas Canárias incluindo os Açores (Boudouresque e Verlaque 2013).

É tipicamente subtidal, distribuindo-se em poças intertidais de até 10-20m de profundidade, sendo encontrada geralmente em substratos rochosos horizontais e alimentando-se preferencialmente de algas folhosas moles e partículas orgânicas em suspensão (Gianguzza et al. 2006).

As gônadas de *P. lividus* são apreciadas como marisco ou fruto-do-mar, constituindo um produto gourmet comparável ao caviar, e por isso este ouriço-do-mar tem sido intensamente capturado. Seu consumo é principalmente limitado à França e Espanha e, em menor grau, a Itália e Grécia (Boudouresque e Verlaque 2013).

Em Portugal, a espécie é abundante e as capturas atingem quase 3 toneladas ao ano, principalmente colhidas na região Norte. No entanto, estudos recentes sugerem que a colheita comercial pode ter um impacto sobre as populações selvagens desta espécie com possíveis implicações para sua conservação e para o manejo da pescaria local associada (Bertocci et al. 2014).

Neste contexto, a aquicultura pode ser uma solução potencial para preencher a lacuna entre a crescente demanda e a queda do abastecimento. Por isso, selecionando as condições de criação mais adequadas pode-se aumentar o cultivo de ouriços-do-mar, permitindo uma produção regular e sustentável de gônadas de alta qualidade para uma nova indústria de caviar, impulsionando esse nicho de mercado e a economia do país.

Embora o consumo de frutos do mar tenha muitas vantagens em termos de saúde humana, esses produtos podem representar alguns riscos para os consumidores se a segurança deles como alimento não for assegurada. A presença de parasitos pode causar danos extensivos em organismos aquáticos, tornando-os frequentemente não adequados como alimentos. Assim, para garantir a qualidade dos frutos do mar, essas questões devem ser abordadas e vinculadas às condições de produção.

Com relação aos endoparasitos de *P. lividus*, registrou-se até o momento metacercárias de *Macvicaria crassigula* (Linton, 1910) (Digenea: Opecoelidae) no sistema vascular da água, metacercárias de *Zoogonus rubellus* (= *Zoogonus mirus*) (Olsson, 1868) (Digenea: Zoogonidae) nos músculos da lanterna de Aristóteles (Timon-David 1934; Jangoux 1987), e metacercárias não identificadas de Opecoelidae (Digenea) (Jousson et al. 1999). Na Irlanda, Byrne (1990) encontrou parasitos vermiformes nas gônadas de *P. lividus*, com taxas de infecção de 4% em ouriços-do-mar que habitavam zonas intertidais e 38% para aqueles que habitavam zonas subtidais. Segundo o autor, nenhum efeito perceptível na reprodução do hospedeiro foi detectado.

Não existem estudos recentes de busca e investigação dos possíveis endoparasitos que acometem a espécie, sendo que estes tornam-se necessários frente ao aumento no consumo das gônadas cruas do ouriço-do-mar-roxo, uma vez que esses animais podem servir como hospedeiros para parasitos com potencial zoonótico.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo fazer a identificação morfológica e molecular das metacercárias (Trematoda: Digenea) presentes em *P. lividus* do Porto, Portugal, quantifica-los determinando os parâmetros ecológicos de prevalência (P), intensidade média (IM) \pm desvio padrão (DP) e amplitude de infecção, e detectar possíveis riscos aos consumidores em uma perspectiva de produção em sistema semi-intensivo.

2 Material e métodos

2.1 Coleta e identificação dos ouriços-do-mar-roxo

Trinta (n=30) espécimes de *P. lividus* (15 fêmeas e 15 machos) foram coletados manualmente da zona intertidal, durante a maré baixa nas praias da Foz do Porto, Portugal, durante os meses de março a abril de 2019 (inverno e primavera) (Fig.1). A identificação dos ouriços-do-mar foi realizada com auxílio de Campbell (2006).

Os ouriços-do-mar foram transportados até o Laboratório de Patologia Animal, na Universidade do Porto, e mantidos vivos em condições ideais em um tanque aerado, até serem examinados. Foram dissecados e examinados sob estereomicroscópio Leica KL 300 LED (ampliação de até 40X) para análise quanto à presença de parasitos.

Todas as partes internas do corpo dos ouriços-do-mar foram consideradas para análise, ou seja, gônadas, ampolas, lanterna de Aristóteles (músculos e faringe), esôfago, intestino, canal pétreo, seio axial e fluido perivisceral.



Figura 1 - *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Parechinidae) do Porto, Portugal. **a)** espécime de *P. lividus*; **b)** espécime de *P. lividus* aberto para retirada dos órgãos; **c)** placas de Petri contendo as partes internas do corpo do ouriço-do-mar.

2.2 Coleta e identificação dos parasitos

As metacercárias encontradas foram lavadas em placa de Petri contendo solução salina a 35% e, posteriormente, armazenadas em etanol a 99% para análises morfológicas e moleculares. Os parâmetros ecológicos de prevalência (P%) e intensidade média de infecção [IM \pm desvio padrão (DP) (amplitude de infecção)] foram calculados de acordo com Bush et al. (1997).

Para a identificação específica, foram submetidos à microscopia de luz e à análise molecular. A identificação foi de acordo com chaves de identificação e bibliografia específicas (Bartoli et al. 1989; Fernandes e Goulart 1992; Jangoux 1987; Jousson et al. 1999)

As observações de microscopia de luz (ampliação de até 1000X) foram realizadas utilizando microscópio óptico composto (Carl Zeiss Axiophot Photomicroscope) acoplado a

um computador equipado com a versão 4.6.3 do software de processamento de imagem digital Axiovision (Carl Zeiss Microimaging Inc., Thornwood, NY, EUA), as medidas foram estimadas em micrômetros (μm).

2.3 Análise molecular e filogenética

O DNA genômico das metacercárias foi extraído usando GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Reagente5, Porto, Portugal), seguindo as instruções do fabricante.

As regiões ITS1-5.8S-ITS2 do cluster do DNAr foram amplificadas utilizando os primers S18(Foward) 5'-TAACAGGTCTGTGATGCC-3' e L3T(Reverse) 5'-CAACTTTCCTCACGGTACTTG-3' (Jousson et al. 1999).

A PCR foi realizada em um volume de reação de 25 μL , utilizando 2 μL de DNA genômico, 0,5 μL de cada primer (foward e reverse) (10pmol/ μL), 2,5 μL de solução tampão MgCl₂ (10X), 1,25 μL MgCl₂ (50mM), 0,5 μL de dNTPmix (10mM), 0,25 μL de Taq DNA polimerase recombinante (5U/ μL) e 17,5 μL de água ultrapura para completar o volume final de 25 μL . As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3min, 35 ciclos – desnaturação 95°C por 1min, anelamento 55°C por 1min, extensão 72°C por 2min, seguido uma extensão final de 72°C por 7min. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X, corados com GreenSafe Premium (NZYTech) e os amplicons purificados e sequenciados por STAB VIDA (Caparica, Portugal).

A identificação preliminar das sequências obtidas foi feita por comparação com as disponíveis na base de dados do GenBank através de pesquisa por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool-BLAST). Os fragmentos de DNA foram editados e criadas sequências consenso de cada região de interesse. Tais sequências foram submetidas ao BLAST para busca de parentes próximos de cada espécie, de onde foram baixadas sequências do GenBank utilizadas para a montagem das análises.

As seqüências foram editadas utilizando o MEGA X (Kumar et al. 2018), e alinhadas com o *Clustal W* (Thompson et al. 1994) no mesmo software. As análises filogenéticas foram realizadas usando a máxima verossimilhança (ML) no MEGA X e inferência bayesiana (BI) em MrBayes v3.2.6 (Ronquist et al. 2012).

O melhor modelo evolutivo para as análises foi escolhido utilizando o software PartitionFinder (Lanfear et al 2017). Para as análises estimadas por ML, foi utilizado modelo

de tempo geral reversível com distribuição Gamma (GTR+G), e 1000 repetições de bootstrap e, para a BI, o modelo de substituição utilizado foi de Kimura com distribuição Gamma (K80+G) para a partição correspondente as regiões do ITS1 e ITS2 e GTR+G para a partição referente ao gene 5.8S DNAr, sendo as probabilidades posteriores estimadas pelo método Monte Carlo da cadeia de Markov (MCMC), de 10000000 gerações com 4 cadeias MCMC simultâneas, 2 corridas independentes e 25% de burn-in. As árvores foram editadas e anotadas no FigTree v1.4.4.

3 Resultados e discussão

Dos 30 ouriços-do-mar dissecados todos foram positivos para pelo menos uma espécie de parasito. Metacercárias de *Macvicaria crassigula* (Linton, 1910) (Digenea: Opecoelidae) e *Zoogonus rubellus* (Olsson, 1868) (Digenea: Zoogonidae) foram identificadas com base em características morfológicas (Figura 2) e confirmadas geneticamente.

Metacercárias de *M. crassigula* foram encontradas encistadas nas ampolas ambulacrárias, músculos da lanterna de Aristóteles e gônodas de *P. lividus*. Enquanto que as metacercárias de *Z. rubellus* encistadas apenas nos músculos da lanterna de Aristóteles e gônodas do hospedeiro.

Macvicaria crassigula (Linton, 1910) (Digenea: Opecoelidae) (Fig. 1 a, c, e):

Descrição (10 espécimes medidos): metacercárias esféricas e dobradas ventralmente, com ventosas e acetábulos bem desenvolvidos, faringe visível e vesícula excretora em formato de saco na região posterior do corpo. Membrana do cisto muito resistente e difícil de romper. Diâmetro do cisto 75,3 - 219,9µm, comprimento e largura quando estendidas fora do cisto 322 - 396,1µm e 124,1 - 158,9µm respectivamente. Apresentam cutícula lisa, ventosa oral com 39,7 - 98,83µm de diâmetro e acetábulo 83,28 - 114,62µm.

Zoogonus rubellus (Olsson, 1868) (Digenea: Zoogonidae) (Fig. 1 b, c, d):

Descrição (10 espécimes medidos): metacercárias com cutícula grossa e ornamentada com pequenos espinhos, sendo estes dobrados para trás, numerosos e bem desenvolvidos na parte anterior do corpo. Cistos transparentes e com parede muito resistente. Diâmetro do cisto 214,0 - 328,1µm, comprimento e largura quando estendidas fora do cisto 758,7 - 761,7µm e 185,5 -

187,7 μ m respectivamente, ventosa oral medindo 83,9 – 128,5 μ m de diâmetro e acetábulo 80,3 - 110,1 μ m. Pré-faringe é relativamente curta e a faringe fica na metade entre a ventosa oral e acetábulo.

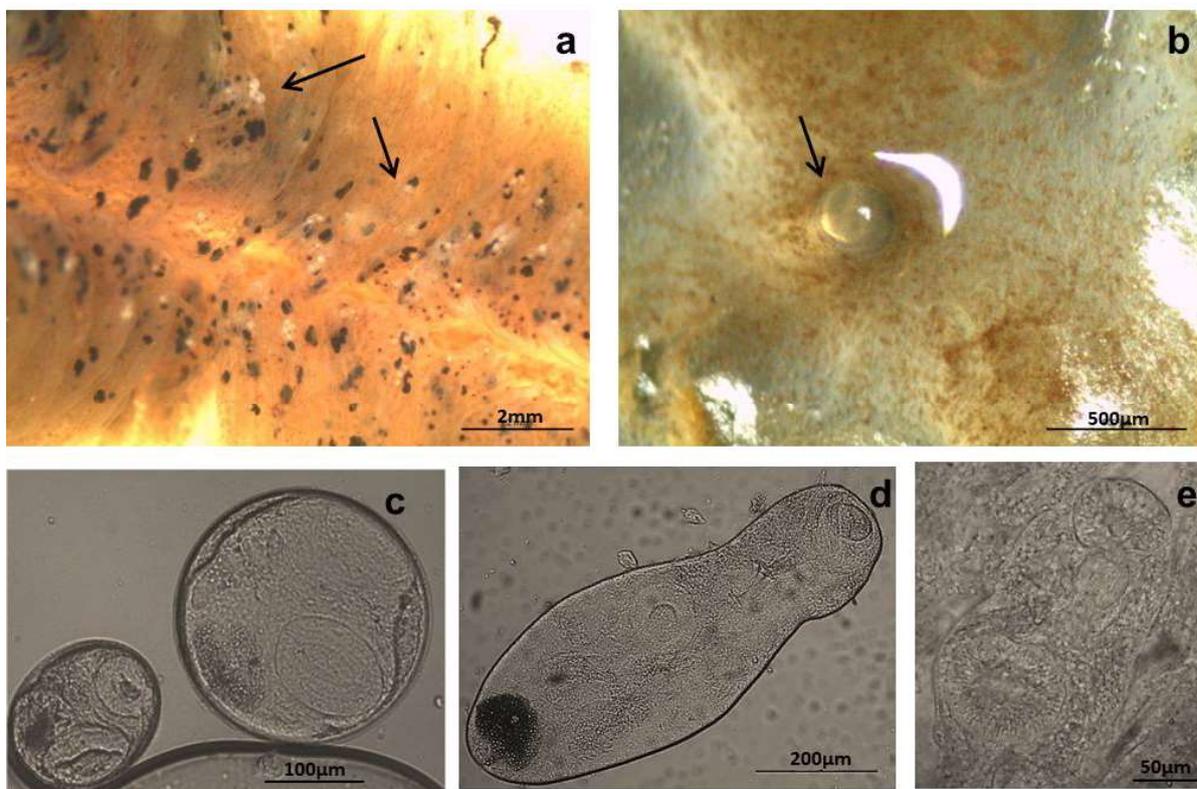


Figura 2 - Metacercárias parasitos de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Parechinidae) do Porto, Portugal. **a)** metacercárias de *Macvicaria crassigula* encistadas nas ampolas (pontos brancos na ponta das setas); **b)** cistos com metacercárias de *Zoogonus rubellus* nos tecidos das gônadas (ponta da seta); **c)** cistos com metacercárias de *M. crassigula* (esquerda) e *Z. rubellus* (direita); **d)** metacercárias de *Z. rubellus* fora do cisto; **e)** metacercárias de *M. crassigula* fora do cisto.

Zoogonus rubellus apresentou P=86,6%, e IM=11,03 \pm 14,1 (1-45) parasitos por hospedeiro, e *M. crassigula* P=96,6% e IM=949,5 \pm 602,6 (1-2210) parasitos por hospedeiro conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Metacercárias de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Parechinidae) do Porto, Portugal e seus respectivos sítios de infecção (SI), prevalência (P%), abundância média (AM), intensidade média de infecção (IM) \pm desvio padrão (DP) e amplitude de infecção/parasitos por hospedeiro.

Metacercárias	SI	P%(**NI)	IM \pm DP	Amplitude de infecção	Nº total
<i>Macvicaria crassigula</i>	AA, MLA, G	96,6 (29)	949,5 \pm 602,6	1-2210	27535
<i>Zoogonus rubellus</i>	MLA, G	86,6 (26)	11,03 \pm 14,1	1-45	287
Número total de hospedeiros infectados		30			

**NI=número total de hospedeiros infectados.

Ampolas ambulacrárias (AA), músculos da lanterna de Aristóteles (MLA), gônodas (G).

A prevalência das diferentes espécies de metacercárias variou também com relação aos sítios de infecção (Tabela 2). *M. crassigula* foi encontrada nas ampolas P=93,33%, e IM= 976 \pm 595,01 (6-2131) parasitos por hospedeiro, nos músculos da lanterna de Aristóteles P=46,66%, e IM=2,42 \pm 1,77 (1-6) parasitos por hospedeiro e nas gônodas P=56,66%, e IM=10,7 \pm 13,70 (1-73) parasitos por hospedeiro.

Enquanto que *Z. rubellus* foi encontrado nos músculos da lanterna de Aristóteles com P=70%, e IM=5,57 \pm 6,36 (1-30) parasitos por hospedeiro e nas gônodas P=66,66%, e IM=8,5 \pm 9,57 (1-40) parasitos por hospedeiro.

As espécies encontradas provavelmente não têm potencial zoonótico, uma vez que os trematodeos adultos parasitam peixes de várias espécies não havendo registros em seres humanos. *M. crassigula* e *Z. rubellus* foram registrados parasitando o trato digestivo de peixes *Diplodus* uma característica que é consistente com seu comportamento predatório sobre *P. lividus* (Bartoli et al. 1989; Jousson et al. 1999; Mamede 2014). Assim, a ingestão de gônodas infectadas com esses dois parasitos provavelmente não representa riscos para segurança alimentar.

Tabela 2 – Metacercárias de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Parechinidae) do Porto, Portugal com índices de prevalência (P%), intensidade média de infecção (IM) e amplitude de infecção/parasitos por hospedeiro calculados para os diferentes sítios de infecção (SI).

Metacercárias	SI	P%	AM	IM±DP	Amplitude de infecção	Nº total
<i>Macvicaria crassigula</i>	AA	93,3(28)	910,9	976±595	6-2131	27328
	MLA	46,7(14)	1,2	2,4±1,8	1-6	34
	G	56,7(17)	5,7	10,7±13,7	1-73	173
<i>Zoogonus rubellus</i>	MLA	70,0(21)	3,9	5,57±6,5	1-30	117
	G	66,7(20)	5,7	8,5±9,6	1-40	170
Número total de hospedeiros infectados		30				

Ampolas ambulacrárias (AA), músculos da lanterna de Aristóteles (MLA), gônadas (G).

Metacercárias de *Z. rubellus* foram registradas no ouriço-do-mar *Psammechinus miliaris* (Müller, 1771) na região Wimereux na França por Stunkard (1941). As metacercárias de *Z. rubellus* encontradas em *P. miliaris* assemelham-se morfológica e morfometricamente às encontradas em *P. lividus* do presente estudo.

A comparação entre as metacercárias de *Z. rubellus* de *P. lividus* e *P. miliaris* apresentaram pequenas variações nas dimensões, no entanto essa é uma observação bem detalhada por Stunkard (1941). O autor discute que a pressão existente durante a montagem das lâminas para visualização ao microscópio pode causar o achatamento do parasito influenciando em suas medidas, além disso, a falta de especificidade do parasito e ocorrência em hospedeiros diferentes pode acarretar em variações morfométricas e morfológicas.

Estudos com descrição de *M. crassigula* foram realizados apenas para parasitos adultos, e não há descrição morfológica das outras fases de desenvolvimento da espécie, dificultando comparações com a encontrada no presente estudo. Portanto, os dados moleculares foram imprescindíveis e utilizados como alternativa para a identificação de espécies, complementando morfologia.

Com relação às análises moleculares, para *M. crassigula* foi obtida uma sequência com 1.147pb (GenBank: MT809127), e para *Z. rubellus* uma sequência de 1.282pb (GenBank: MT809128) da região ITS DNAr. As árvores filogenéticas apresentaram topologia muito similar (Fig. 3 e 4), as sequências do presente estudo agruparam com representantes da mesma espécie com suportes altos.

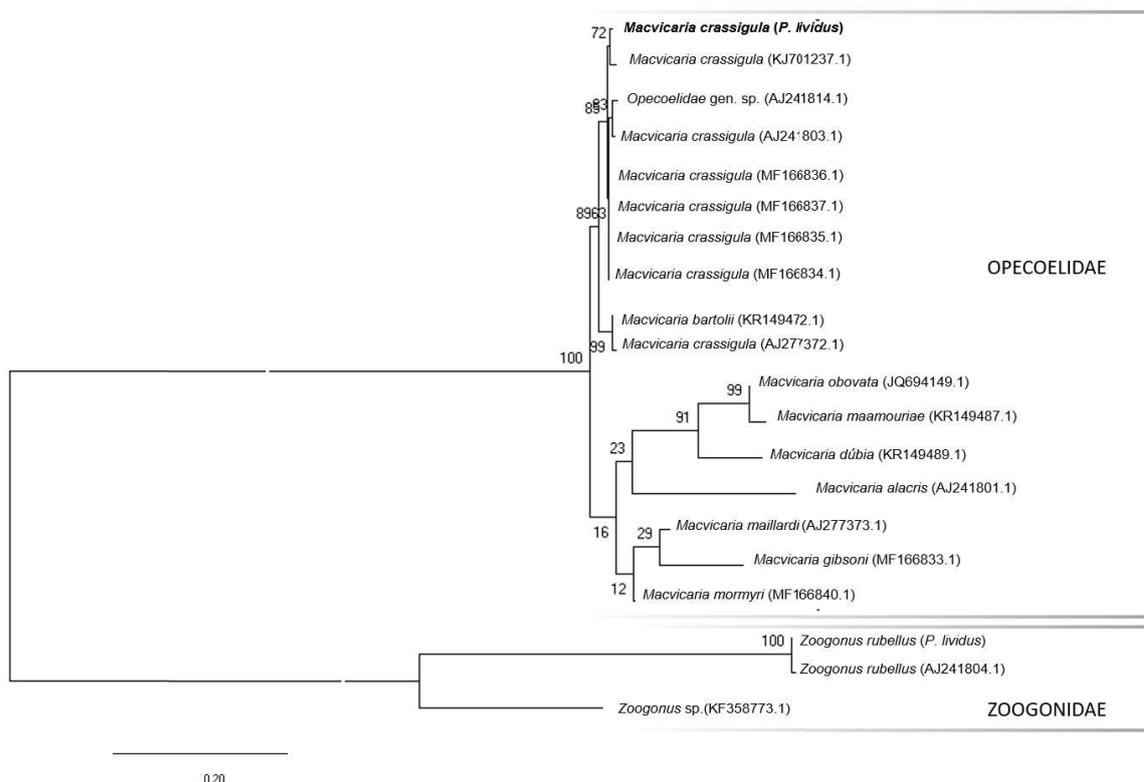


Figura 3 - Relações filogenéticas inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança com base na região ITS DNAr das metacercárias obtidas no presente estudo e representantes de Opecoelidae e Zoogonidae. Os valores nos nós representam os valores de bootstrap. Número de acesso no GenBank entre parênteses.

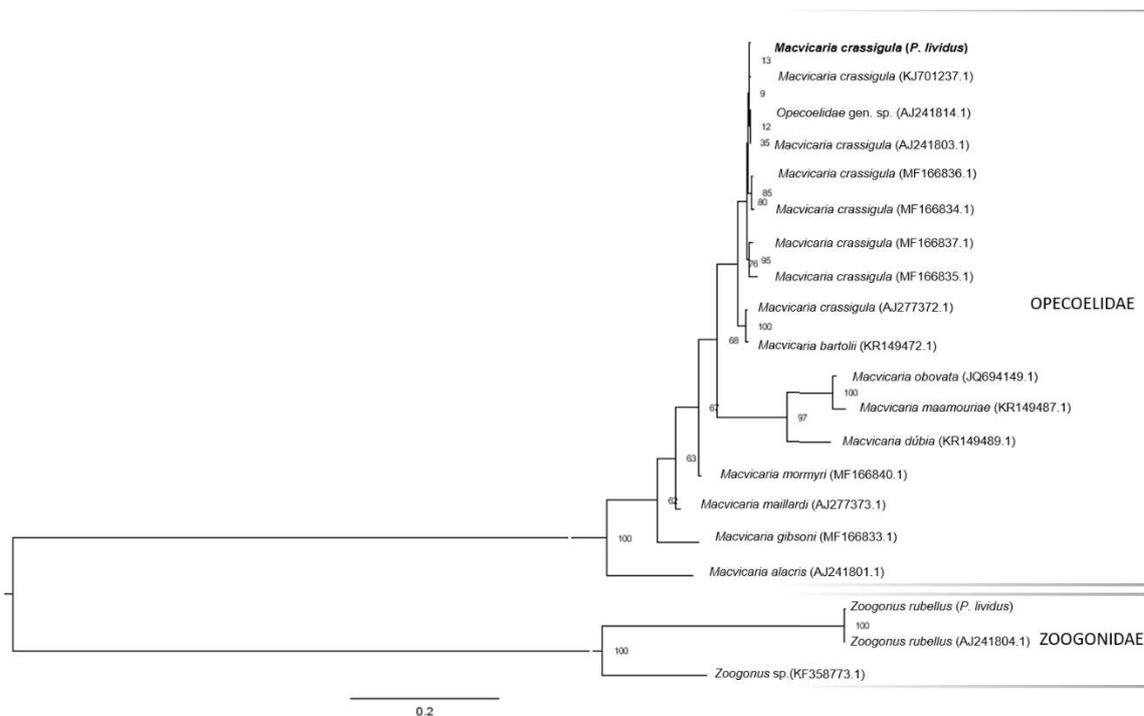


Figura 4 - Relações filogenéticas estimadas por Inferência Bayesiana com base na região ITS DNAr das metacercárias obtidas no presente estudo e representantes de Opecoelidae e Zoogonidae. Os valores nos nós representam os valores das probabilidades Bayesianas. Número de acesso no GenBank entre parênteses.

Z. rubellus do presente estudo agrupou com *Z. rubellus* (AJ241804) (adulto) proveniente de *Diplodus sargus* Geoffroy Saint-Hilaire, 1817 de Córsega, França com valores de bootstrap e probabilidades bayesianas de 100%.

Para *Macvicaria* as análises de ML mostraram a formação de dois grupos distintos, um formado por espécies de *M. crassigula*, Opecoelidae gen. sp. (identificada como metacercária de *M. crassigula*) e *M. bartolii* que agruparam entre si com 100% de bootstrap, e outro formando por outras sete espécies do gênero. Enquanto que, para a BI as relações não foram tão bem resolvidas, no entanto as sequências de *M. crassigula* permanecem agrupadas entre si com valor de confiança de 73%.

Os resultados apresentados, corroboram com os divulgados por Jousson et al (1999). Os autores utilizaram a região ITS DNAr para identificar cercárias e metacercárias de Opecoelidae através da similaridade entre sequências de parasitos adultos previamente identificados. Dentre outras espécies, os autores coletaram metacercárias de *M. crassigula* em *P. lividus* e os adultos em *D. vulgaris* da Córsega, França.

Através das análises moleculares e pela proximidade nos ramos gerados, puderam confirmar a identidade das metacercárias, sendo o primeiro estudo de caracterização genética de estágios de desenvolvimento de Opecoelidae (Jousson et al. 1999).

Uma sequência de *Z. rubellus* (adulto) foi disponibilizada pelos autores que a utilizaram como grupo externo em seus estudos. A topologia das árvores do presente estudo é semelhante à mostrada por Jousson et al. 1999, os representantes de Opecoelidae parecem ser monofiléticos quando *Z. rubellus* é utilizado como grupo externo.

Born-Torrijos et al. (2012) identificaram larvas de Opecoelidae parasitos de gastrópodes marinhos, com base em análises da região ITS DNAr. Por ser uma região altamente variável, tem demonstrado grande capacidade de distinguir entre espécies estreitamente relacionadas, auxiliando na resolução taxonômica e identificação dessas espécies.

Recentemente, estudos com identificação e caracterização de novas *Macvicaria* spp. e têm sido realizados e buscam esclarecer as relações entre as espécies sugerindo que *M. crassigula* pode representar um complexo de espécies (Antar et al 2015; Rima et al 2017).

No presente estudo a identificação das espécies de metacercárias encontrados em *P. lividus* pôde ser suportada com base na análise das sequências da região ITS DNAr geradas. Uma vantagem desses estudos é que as sequências de DNA podem ser utilizadas para identificar espécies em todos os estágios de desenvolvimento (Criscione et al. 2005). A utilização das técnicas moleculares no presente estudo foi imprescindível, e auxiliou na confirmação da identidade das espécies.

5 Conclusão

Este é o primeiro registro de metacercárias presentes nas gônadas de *P. lividus*, bem como o primeiro estudo a apresentar parâmetros ecológicos de infecção para o hospedeiro. Metacercárias de *Z. rubellus* provenientes de *P. lividus* são caracterizados molecularmente pela primeira vez e com base na comparação de sequências da região ITS do DNAr foi possível confirmar a identificação das espécies encontradas.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 (PDSE/EditalNº 47 - 2017) e por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do UIDB/04423/2020 e UIDP/04423/2020 - Portugal.

Referências

- Antar R, Georgieva S, Gargouri L, Kostadinova A (2015) Molecular evidence for the existence of species complexes within *Macvicaria* Gibson & Bray, 1982 (Digenea: Opecoelidae) in the western Mediterranean, with descriptions of two new species. *Syst Parasitol* 91(3):211-229. <https://doi.org/10.1007/s11230-015-9577-9>
- Bartoli P, Bray RA, Gibson DI (1989) The Opecoelidae (Digenea) of sparid fishes of the western Mediterranean. III. *Macvicaria* Gibson & Bray, 1982. *Syst Parasitol* 13(3):167-192. <https://doi.org/10.1007/BF00009743>
- Bertocci I, Dominguez R, Machado I, Freitas C, Godino JD, Sousa-Pinto I, Gonçalves M, Gaspar MB (2014) Multiple effects of harvesting on populations of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* in north Portugal. *Fish Res* 150:60-65. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.10.010>
- Born-Torrijos A, Kostadinova A, Raga JA, Holzer AS (2012) Molecular and morphological identification of larval opecoelids (Digenea: Opecoelidae) parasitising prosobranch snails in a Western Mediterranean lagoon. *Parasitol Int* 61(3):450-460. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.03.002>

Boudouresque CF, Verlaque M (2013) *Paracentrotus lividus*. Dev Aquacult Fish Sci 38:297-327. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(07\)80077-9](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(07)80077-9)

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. J Parasitol 83:575-583. <https://doi.org/10.2307/3284227>

Byrne M (1990) Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. Mar Biol 104:275–289. <https://doi.org/10.1007/BF01313269>

Campbell A (2006) Fauna e Flora do Litoral de Portugal e Europa. FAPAS, Matosinhos, Portugal

Criscione CD, Poulin R, Blouin MS (2005) Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. Mol Ecol, Oxford 14:2247–2257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02587.x>

Fernandes BM, Goulart MB (1992) First report of the genera *Macvicaria* Gibson & Bray, 1982, *Pachycreadium* Manter, 1954 and *Saturnius manter*, 1969 (Trematoda: Digenea), in Brazilian marine fishes. Mem Inst Oswaldo Cruz 87:101-104. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000500020>

Gianguzza P, Chiantore M, Bonaviri C, Cattaneo-Vietti R, Vielmini I, Riggio S (2006) The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). Fish Res 81:37-44. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.06.002>

Jangoux M (1987) Diseases of Echinodermata. II. Agents metazoans (Mesozoa to Bryozoa). Dis Aquat Organ 2(2):205–234. <https://doi.org/10.3354/dao002205>

Jousson O, Bartoli P, Pawlowski J (1999) Molecular identification of developmental stages in Opecoelidae (Digenea). Int J Parasit 29:1853–1858. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00124-1)

Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B (2017) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol* 34(3):772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>

Mamede, NMG (2014) Relações ecológicas entre ouriços-do-mar e os seus predadores e presas no sudoeste de Portugal continental. Dissertação, Universidade de Évora

Rima M, Marzoug D, Perez-del-Olmo A, Kostadinova A, Bouderbala M, Georgieva S (2017) New molecular and morphological data for opecoelid digeneans in two Mediterranean sparid fishes with descriptions of *Macvicaria gibsoni* n. sp. and *M. crassigula* (Linton, 1910) (sensu stricto). *Syst Parasitol* 94(7):739-763. <https://doi.org/10.1007/s11230-017-9736-2>

Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Stunkard HW (1938) *Distomium lasium* Leidy, 1891 (Syn. *Cercariaeum lintoni* Miller and Northup, 1926), the larval stage of *Zoogonus rubellus* (Olson, 1898) (Syn. *Z. mirus* Looss, 1901). *Biol Bulletin* 75:308–334. <https://doi.org/10.2307/1537737>

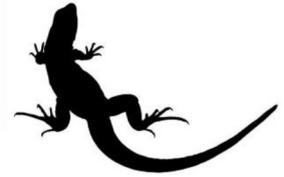
Timon-David J (1934) Recherches sur les Trématodes parasites des oursins en Méditerranée. *Bull Inst Océanogr* 652:1–16.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJB(1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

Apêndice F – Formulário para necrópsias



Helmintos de *Salvator merianae* - PPG em Parasitologia - UFPel



Formulário para necropsia:

Hospedeiro: _____

Nome específico/comum: *Salvator merianae* Linnaeus, 1758 (teiú)

Data da coleta: __ / __ / __

Sexo: Macho () Fêmea ()

Localidade da coleta: _____

Juvenil () Adulto ()

Modo de captura: _____

Armazenagem: Não () Refrigerador: () Congelador: ()

Data da Necropsia: __ / __ / __

ECTOPARASITOS: _____

ENDOPARASITOS:

Boca/Traquéia:

Esôfago:

Pulmões/Brônquios:

Coração:

Pâncreas:

Cloaca:

Fígado/ vesícula biliar:

Baço:

Rins/ureteres/veias renais:

Ovário/oviduto:

Testículos:

Cavidade celomática:

Estômago:

ID:

IG:

OBS: conteúdo intestinal (dieta):

Anexos

Anexo A - Licença para coleta dos animais atropelados



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38913-5	Data da Emissão: 22/02/2017 17:05	Data para Revalidação*: 24/03/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO	
Título do Projeto: Diversidade parasitária de animais silvestres atropelados nas estradas de rodagem do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	NECROPSIA DOS ANIMAIS, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITOS	04/2013	04/2015
2	COLETA DE ANIMAIS ATROPELADOS EM ESTRADAS DE RODAGEM DO RIO GRANDE DO SUL	04/2013	04/2015
3	COLETA DE ANIMAIS ATROPELADOS, NECROPSIA, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITOS	11/2015	10/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1) Este projeto não contempla coletas in situ de vertebrados vivos, mas somente de AMOSTRAS destes (carcaças, vísceras, material osteológico, regurgitos, etc); 2) Os répteis da Ordem Rhynchocephalia não existem em vida livre no Brasil, contudo essa opção inserida pela pesquisadora foi aprovada para não ocasionar divergência de pareceres.
2	Encaminhar à ESEC do Taim a lista das espécies encontradas e a cópia de toda a publicação gerada pela pesquisa, dissertação, artigos, resumos, separatas. Como já existe outro trabalho em andamento com os animais atropelados na UC, é necessário que a pesquisadora comunique um 24 horas de antecedência as coletas, para que não atrapalhe o outro projeto em andamento.
3	Durante a busca ativa nas rodovias, no caso de encontrar animais ainda com vida, recomendo que já haja um protocolo de encaminhamento previamente preparado (zoos, CETAS, clínicas veterinárias).

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
---	------	--------	-----	-----------------	---------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 54361312





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38913-5	Data da Emissão: 22/02/2017 17:05	Data para Revalidação*: 24/03/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO	
Título do Projeto: Diversidade parasitária de animais silvestres atropelados nas estradas de rodagem do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

1	Gertrud Müller	ORIENTADORA DE PÓS-GRADUAÇÃO		Brasileira
2	Carolina Silveira Mascarenhas	ESTUDANTE DE DOUTORADO		Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RS	Estado do Rio Grande do Sul	Fora de UC Federal
2		RS	Estado do Rio Grande do Sul	Fora de UC Federal
3	PELOTAS	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDÁRIAS	Fora de UC Federal
4	MORRO REDONDO	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDÁRIAS	Fora de UC Federal
5	RIO GRANDE	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDÁRIAS	Fora de UC Federal
6	CANGUCU	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDÁRIAS	Fora de UC Federal
7	TURUCU	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDÁRIAS	Fora de UC Federal
8		RS	ESTAÇÃO ECOLÓGICA DO TAIM	UC Federal
9	CAPAO DO LEAO	RS	RODOVIAS E ESTRADAS SECUNDÁRIAS	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Artiodactyla, Myrmecophagidae, Pilosa, Mephitidae, Alligatoridae, Procyonidae, Mustelidae, Aves, Squamata, Lagomorpha, Xenarthra, Chelidae, Testudinidae, Rodentia, Felidae, Didelphimorphia, Perissodactyla, Canidae, Chelydridae, Didelphidae, Cheloniidae, Tapiridae, Cingulata

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Outras amostras biológicas(coleta manual dos animais atropelados), Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita
2	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes, Outras amostras biológicas(coleta manual dos animais atropelados), Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão
3	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas(coleta manual dos animais atropelados)
4	Amostras biológicas (Répteis)	Outras amostras biológicas(coleta manual dos animais atropelados), Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes, Fragmento de tecido/órgão
5	Amostras biológicas (Tamanduás)	Outras amostras biológicas(coleta manual dos animais atropelados), Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão
6	Amostras biológicas (Tartarugas marinhas)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
7	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta(coleta manual dos animais atropelados)
8	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Outros métodos de captura/coleta(coleta manual dos animais atropelados)
9	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta(coleta manual dos animais atropelados)
10	Método de captura/coleta (Répteis)	Outros métodos de captura/coleta(coleta manual dos animais atropelados)
11	Método de captura/coleta (Tamanduás)	Coleta manual
12	Método de captura/coleta (Tartarugas marinhas)	Outros métodos de captura/coleta(coleta manual dos animais atropelados)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
---	--------------------	--------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 54361312





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38913-5	Data da Emissão: 22/02/2017 17:05	Data para Revalidação*: 24/03/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO	
Título do Projeto: Diversidade parasitária de animais silvestres atropelados nas estradas de rodagem do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
---	---------------------------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 54361312



