

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Diplotrriaena bargusinica*
Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotrriaenidae)**

Thainá Dutra Vieira

Pelotas, 2016

Thainá Dutra Vieira

**Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Diplotriaeana bargusínica*
Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotriaeidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área do conhecimento: Parasitologia).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Gertrud Müller Antunes

Co-orientadora: Dr.^a. Marcia Raquel Pegoraro de Macedo

Pelotas, 2016

Thainá Dutra Vieira

**Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Diplotrriaena bargusinica*
Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotrriaenidae)**

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

Data da defesa: 29 de fevereiro de 2016.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Gertrud Müller Antunes (Orientadora) (Instituto de Biologia - UFPel)

Dr^a. Tatiana Cheuiche Pesenti (Bióloga)

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela (Instituto de Biologia - UFPel)

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli (Faculdade de Veterinária - UFPel)

AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço à minha amada família, que é meu tudo, minha base, que sempre me deu força e apoio para seguir em frente e conquistar mais essa vitória. Obrigada pelas orações, palavras, abraços e aconchego, eu amo vocês!

Ao meu amado Jeferton, que compartilhou comigo todos os momentos dessa trajetória, pelo amor, carinho, compreensão, e paciência com meu mau humor nas horas difíceis.

À minha orientadora Gertrud, pela oportunidade, incentivo e confiança no meu trabalho com Biologia Molecular de parasitos.

À querida co-orientadora Marcia, pela imensa paciência de me aturar a todo o momento com milhões de dúvidas. Muito obrigada por todos os ensinamentos, com certeza sem tua ajuda esse trabalho não seria possível.

Às amigonas que a Parasito me deu Fabiana e Mirian. Fabi obrigada pela doação dos parasitos e fotos, por toda ajuda, incentivo e companheirismo nas horas de trabalho e também nas horas de descontração. Mirian obrigada pelo convívio, conversas e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, obrigada à cada um pelo convívio, parceria e troca de aprendizados.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pela oportunidade e a CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a finalização desse trabalho.

Muito obrigada!!!

Resumo

VIEIRA, Thainá Dutra; **Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Diplotriaena bargusinica* Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotriaenidae)**. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A taxonomia de nematoides é fundamentada, principalmente, em características morfológicas e morfométricas. Eles estão entre os parasitos mais difíceis de serem identificados, devido ao tamanho diminuto de algumas espécies e/ou as dificuldades na observação de características determinantes para o diagnóstico em microscopia óptica convencional. *Diplotriaena bargusinica* é um parasito de aves cuja identificação é fortemente baseada em caracteres morfológicos. A morfologia dos espécimes utilizados neste estudo gerou dúvidas quanto à identificação específica, devido às variações de formatos nos espículos dos machos. 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. A organização dos genes do DNAr os tornam alvos adequados para a amplificação do DNA por PCR, permitindo os estudos genéticos que visam a identificação de nematoides. Considerando a importância da taxonomia com o potencial da biologia molecular, esse estudo visa confirmar a identificação morfológica de *D. bargusinica*, bem como estabelecer relações filogenéticas com parasitos da ordem Spirurida. Vinte sequências parciais da região 18S do DNAr nuclear de *D. bargusinica* foram geradas, sendo estes, os primeiros dados genéticos disponíveis sobre a espécie. Com base na análise da matriz de distância genética observou-se pouca diferenciação genética entre as sequências, sendo que apenas três apresentaram sítios variáveis. As árvores filogenéticas foram obtidas através dos métodos de Neighbor-Joining, Evolução Mínima e Máxima Verossimilhança. Ambas apresentaram topologia muito similar, mostrando que os clados obtidos apresentam origem monofilética e corroboraram com as análises filogenéticas baseadas na taxonomia tradicional. Neste estudo os dados moleculares associados aos morfológicos foram essenciais para elucidar a taxonomia do grupo.

Palavras-chave: Nematoda; Diplotriaenoidea; marcador molecular; região 18S

Abstract

VIEIRA, Thainá Dutra; **Molecular characterization and phylogenetic relationships of *Diplotrriaena bargusinica* Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotrriaenidae)**. 2016. 53f. Dissertation (Master Degree in Parasitology) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The nematode taxonomy is based mainly on the morphological and morphometric features. They are among the most difficult pests to be identified due to the small size of some species and/or difficulties in observing essential character for diagnosis by conventional optical microscopy. *Diplotrriaena bargusinica* is a parasite of birds whose identification is based strongly on morphological characteristics. The morphology of the specimens used in this study has raised questions about the specific identification, due to variations in shape in the spicules of males. The increasing knowledge of the variability of genetic information has encouraged the use of DNA markers, in combination with morphological data for inferring phylogenetic relationships among different taxa. The organization of rDNA genes make them appropriate targets for DNA amplification by PCR, allowing genetic studies aimed at identifying nematodes. In view of the importance of taxonomy with the potential of molecular biology, this study aims to confirm the morphological identification of *D. bargusinica* and establish phylogenetic relationships among the parasites of Spirurida order. Twenty partial sequences of the 18S region of nuclear rDNA from *D. bargusinica* were generated by DNA sequencing, these being the first genetic data for the species. Based on the analysis of the genetic distance matrix was observed little difference between the genetic sequences, with only three showed variable sites. Phylogenetic trees were obtained by the methods: Neighbor-Joining, Minimum Evolution and Maximum Likelihood. Both had very similar topology, showing that the clades are monophyletic origin and corroborated phylogenetic analysis based on the traditional taxonomy. In this study, the molecular and morphological data correlated were crucial to elucidate the group's taxonomy.

Keywords: Nematoda; Diplotrriaenoidea; molecular marker; 18S region

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Diplotriana bargusina</i> Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotrienidae). Imagem retirada de Soota; Chaturvedi (1972). A - Região anterior da fêmea apontando o tridente liso de ápice afilado, esôfago, abertura vulvar e ovos. B - Região posterior do macho apontando espículos e papilas caudais.....	15
Figura 2	Desenhos realizados em câmera clara por Vicente et al. (1983) detalhando as variações morfológicas de tridentes visualizados em diferentes espécimes de <i>Diplotriana bargusina</i>	15
Figura 3	Desenhos realizados em câmera clara por Vicente et al. (1983) detalhando as variações morfológicas de espículos visualizados em diferentes espécimes machos de <i>Diplotriana bargusina</i>	16
Figura 4	Casal de <i>Chrysomus ruficapillus</i> , à esquerda a fêmea e a direita o macho.....	21
Figura 5	Visualização em gel de agarose de fragmentos amplificados por PCR da região 18S DNAr de quatro espécimes. 100pb: marcador de peso molecular; 1-4: diferentes amostras de DNA de <i>Diplotriana bargusina</i> ; (-): controle negativo.....	25
Figura 6	Alinhamento das vinte sequências da região 18S DNAr (501pb) de <i>Diplotriana bargusina</i> obtidas neste estudo destacando-se os sítios variáveis apresentados em DT06, DT08 e DT17.....	28
Figura 7	Matriz de distância genética (região 18S) das vinte sequências obtidas de <i>Diplotriana bargusina</i> , gerada a partir do modelo de Kimura 2-parâmetros.....	28
Figura 8	Relação filogenética entre <i>Diplotriana bargusina</i> e outras espécies de Spirurida. Árvore inferida com base na região 18S DNAr a partir do método da Evolução Mínima, e utilizando <i>Oxyuris equi</i> como grupo externo. 1000 réplicas de Bootstrap	29

Figura 9	Relação filogenética entre <i>Diplotriaena bargusinica</i> e outras espécies de Spirurida. Árvore inferida com base na região 18S DNAr a partir do método de Neighbor-Joining e utilizando <i>Oxyuris equi</i> como grupo externo. 1000 réplicas de Bootstrap	29
Figura 10	Relação filogenética entre <i>Diplotriaena bargusinica</i> e outras espécies de Spirurida. Árvore inferida com base na região 18S DNAr a partir da Máxima Verossimilhança, e utilizando <i>Oxyuris equi</i> como grupo externo. 1000 réplicas de Bootstrap	30
Figura 11	Relação filogenética das vinte sequências de <i>Diplotriaena bargusinica</i> e outras espécies de Spirurida. Árvore inferida com base na região 18S DNAr a partir do método da Neighbor-Joining, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros com distribuição Gamma utilizando sequência de <i>Oxyuris equi</i> como grupo externo.....	31
Figura 12	<i>Diplotriaena bargusinica</i> . A - Região anterior com detalhe no tridente liso com ápice afilado (200x). B – Região anterior da fêmea apontando a abertura vulvar (100x). C - Região mediana da fêmea apontando os ovos (100x). D - Região posterior da fêmea (100x). E – Região posterior do macho apontando espículo maior, espículo menor e papilas caudais (200x)	32
Figura 13	<i>Diplotriaena bargusinica</i> . Porção posterior dos seis espécimes machos utilizados neste estudo mostrando as variações morfológicas dos espículos (100x)	33
Figura 14	Desenhos realizados em câmera clara por Vicente et al. (1983). Porção posterior dos machos detalhando as variações morfológicas dos espículos entre as quatro espécies de <i>Diplotriaena</i>	34
Figura 15	Relação filogenética de espécies de Spirurida inferida com base na região 18S DNAr, indicando suas respectivas superfamílias.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1	Informação sobre os parasitos e número de acesso no GenBank, das sequências utilizadas neste estudo.....	24
Tabela 2	Composição nucleotídica do gene 18S DNAr da sequência consenso dos espécimes de <i>Diplotrinaena bargusinica</i>	28

Lista de Abreviaturas

CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
COXI	Citocromo Oxidase Subunidade 1
DDBJ	Banco de Dados de DNA do Japão
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAmt	DNA Mitocondrial
DNAr	DNA Ribossômico
EBI	Instituto Europeu de Bioinformática
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossômico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Objetivos	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. Revisão de Literatura.....	14
3.1 <i>Diplotrinaena bargusina</i>	14
3.2. Marcadores moleculares	17
3.3. Marcadores de DNA ribossômico nuclear	18
4. Material e Métodos	21
4.1. Obtenção dos parasitos	21
4.2. Extração do DNA.....	22
4.3 Reações de PCR.....	22
4.4. Purificação e sequenciamento.....	23
4.5. Análise das sequências.....	23
5. Resultados	25
6. Discussão	35
7. Conclusões	38
Referências	39
Apêndices	46
Apêndice A: Identificação dos vinte espécimes utilizados.	47
Anexos	48
Anexo A: Licença ICMBio para atividades com finalidade científica	49
Anexo B: Projeto de pesquisa com número do CEEA.....	52

1. Introdução

Os parasitos são os organismos mais diversos e estão presentes em todos os ecossistemas (POULIN, 2004). O processo coevolutivo entre parasitos e hospedeiros, bem como as mudanças ambientais de perda, ganho ou manutenção das espécies, pode ser estimado por meio do estudo da fauna parasitária encontrada nos animais (BRANDÃO et al., 2009).

Os animais silvestres podem ser reservatórios de diversos parasitos (BROOKS; HOBERG, 2000), sendo que as aves albergam uma diferente variedade durante sua vida (ATIKISON et al., 2008). Estima-se que dentro dos vertebrados é o grupo que apresenta a maior diversidade de parasitos, como nematoides, trematódeos, cestoides e acantocéfalos (POULIN; MORAND, 2000; DOBSON et al., 2008; AMATO; AMATO, 2010).

A taxonomia de Nematoda é fundamentada, principalmente, em características morfológicas e morfométricas baseando-se em medições e comparação de estruturas (MOURA, 2006). Os nematoides estão entre os parasitos mais difíceis de serem identificados, devido ao tamanho diminuto de algumas espécies e/ou as dificuldades na observação de características determinantes para o diagnóstico em microscopia óptica convencional (LEE, 2002; OLIVEIRA et al., 2009). Em outros casos, essa dificuldade ocorre pela semelhança entre as espécies e variabilidade morfológica intra-específica (HANDOO et al., 2008).

Frequentemente a diferenciação específica é baseada nas médias das medidas de uma população de indivíduos, um trabalho complicado se as populações consistem de misturas de espécies estreitamente relacionadas (POWERS, 2004). Esses fatos evidenciam a complexidade do grupo e as dificuldades que os taxonomistas encontram no processo de identificação.

Dessa maneira a identificação clássica tem induzido à necessidade de introdução de novos métodos de análise e novas ferramentas (MOURA, 2006, PIRES; MARINONI, 2010). A biologia molecular vem inovando no campo da

taxonomia, possibilitando o desenvolvimento de métodos para identificação e caracterização de indivíduos e populações (SCHLÖTTERER, 2004; TENEVA, 2009).

O uso conjunto de dados genéticos e morfológicos pode contribuir significativamente para a identificação de parasitos em relação ao uso de apenas um dos métodos (WILL, et al., 2005; VALDECASAS et al., 2008; LEMEY et al., 2009; PIRES; MARINONI, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Ambas, morfologia e genética são complementares e constituem fontes independentes de evidência, ao mesmo tempo agrupam conhecimentos sobre taxonomia, epidemiologia, diagnóstico, ecologia, evolução e relação parasito-hospedeiro (VALDECASAS et al., 2008; PIRES; NARINONI, 2010).

A importância e o interesse pela diversidade parasitária de aves, sua distribuição em diferentes ecossistemas, assim como a sua interação com diferentes hospedeiros tem se destacado nas últimas décadas (VICENTE et al., 1995).

Estudos genéticos de faunas parasitológicas de animais silvestres são expressivos, dados que permitem inferências sobre o comportamento, dieta e as relações dos hospedeiros com o meio ambiente. Porém, estudos embasados na genética molecular são incomuns e, com poucas exceções, são desenvolvidos principalmente com parasitos de importância em saúde humana, animal e vegetal (LUKES et al., 2005 apud HONISH; KRONE, 2008).

Considerando a importância da taxonomia com o potencial da biologia molecular, esse estudo visa confirmar a identificação morfológica de *Diplotrriaena bargusinica* Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotrriaenidae), bem como estabelecer relações filogenéticas com outras espécies de parasitos da ordem Spirurida.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Estudar a região 18S do DNA ribossômico nuclear de *Diplotrinaena bargusinica*.

2.2 Objetivos Específicos

- Comprovar molecularmente a identidade morfológica dos espécimes;
- Verificar a similaridade intra-específica de *D. bargusinica*;
- Reconhecer relações filogenéticas de *D. bargusinica* com espécies pertencentes à ordem Spirurida.

3. Revisão de Literatura

3.1 *Diplotrriaena bargusinica*

Nematoides *Diplotrriaena* Henry e Ozoux, 1909 (Nematoda: Diplotrriaenidae) possuem especificidade parasitária restrita às aves, onde são encontrados infectando os sacos aéreos, sendo que um hospedeiro pode ser parasitado por mais de uma espécie (VICENTE et al., 1983). Apresentam ampla distribuição geográfica, já tendo sido reportados em aves de diversas regiões do mundo (Anderson, 2000).

Segundo Chabaud (1956), o ciclo biológico de *Diplotrriaena* consiste na deposição de ovos nos sacos aéreos da ave, que chegam até os brônquios e a traqueia onde são deglutidos e eliminados com as fezes. Posteriormente esses ovos são ingeridos pelos hospedeiros intermediários, artrópodes coprófagos. A grande dispersão das espécies poderia então ser explicada pela falta de especificidade dos hospedeiros intermediários (CHABAUD, 1956; ANDERSON, 2000), como também em razão dos hábitos migratórios das aves (hospedeiros definitivos) (Vicente et al., 1983).

Anderson (1962) realizou um estudo de infecção experimental com *D. bargusinica* em aves silvestres (Icteridae e Turdidae) detalhando que em seu ciclo biológico o parasito utiliza gafanhotos (Orthoptera) como hospedeiros intermediários.

A taxonomia das espécies de *Diplotrriaena* é fortemente baseada em caracteres morfológicos, sendo o tamanho, textura e formato do ápice dos tridentes importantes, além da forma dos espículos dos machos, número de papilas caudais e tamanho dos ovos nas fêmeas as principais variáveis que evidenciam as diferentes espécies (Figura 1) (VICENTE et al., 1983).

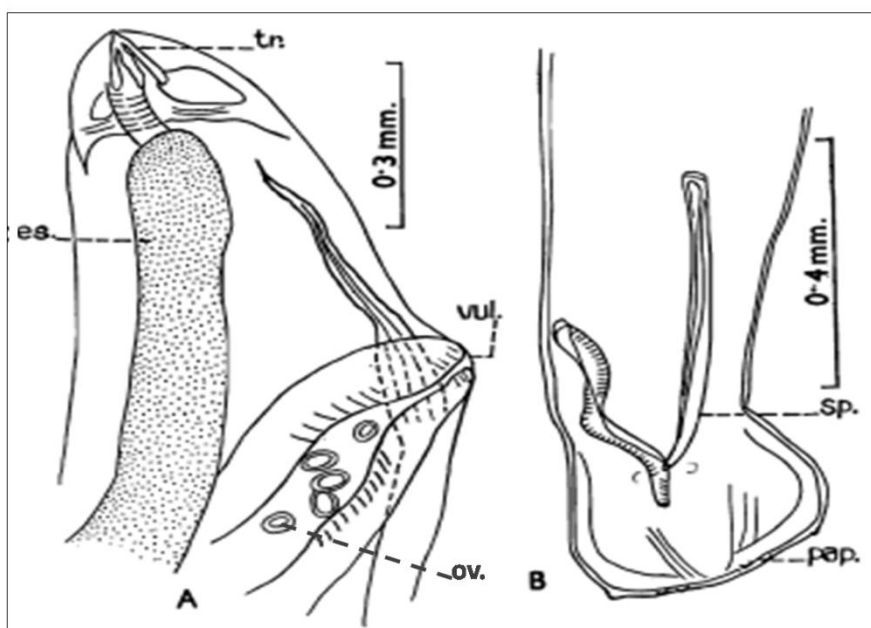


Figura 1 - *Diplotriaena bargusinica* Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotriaenidae). Imagem retirada de Soota; Chaturvedi (1972). A - Região anterior da fêmea apontando o tridente liso de ápice afilado, esôfago, abertura vulvar e ovos. B - Região posterior do macho apontando espículos e papilas caudais.

Diplotriaena bargusinica apresenta tridente liso e bem desenvolvido, com ápice afilado medindo entre 0,10 e 0,15mm (Figura 2), espículos desiguais sendo o menor pouco espiralado (Figura 3), com pequeno número de papilas caudais. Os ovos medem em média 0,044 x 0,029mm. Os machos medem entre 16,3 e 36mm e as fêmeas entre 45,2 e 54,4mm de comprimento (VICENTE et al., 1983).

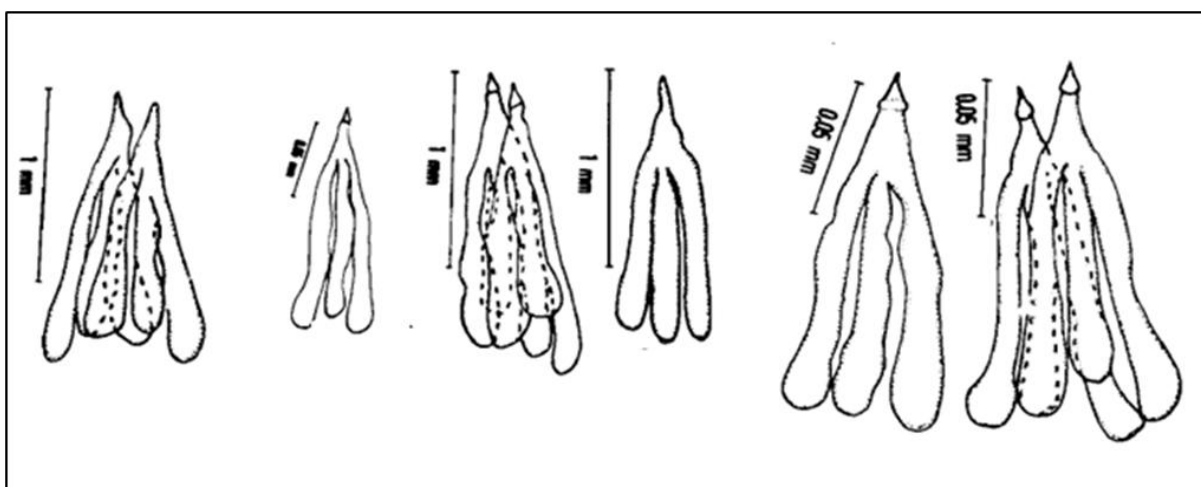


Figura 2 - Desenhos realizados em câmera clara por Vicente et al. (1983) detalhando as variações morfológicas de tridentes visualizados em diferentes espécimes de *Diplotriaena bargusinica*.

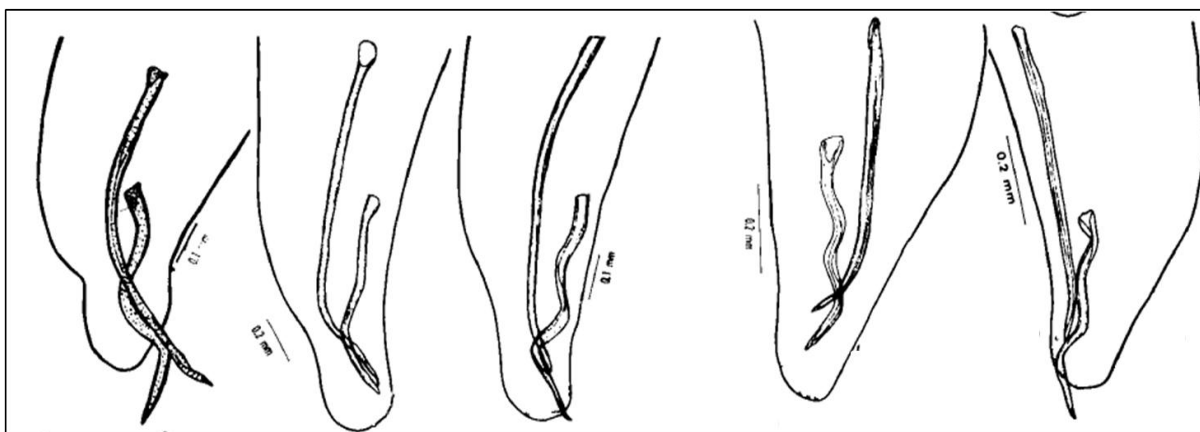


Figura 3 - Desenhos realizados em câmera clara por Vicente et al. (1983) detalhando as variações morfológicas de espículos visualizados em diferentes espécimes machos de *Diplotriaena bargusinica*.

Pesquisas realizadas nos bancos de dados genéticos internacionais como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) e DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) apontam que não existem estudos genéticos de *D. bargusinica* até o momento. No entanto, outros dois nematoides parasitos de sacos aéreos de aves que possuem importância veterinária, apresentam sequências disponíveis, *Serratospiculum tendo* (Nitzsch, 1857) (Nematoda: Diplotriaenidae) e *Cyathostoma (Cyathostoma) phenisci* Baudet, 1937 (Nematoda: Syngamidae).

Serratospiculum tendo parasita os sacos aéreos de aves de rapina (Falconiformes e Acipriformes) na Europa, possui grande importância econômica por causar danos às aves. Especula-se que o ciclo biológico de *S. tendo* seja similar ao de *D. bargusinica* apresentando insetos como hospedeiros intermediários (SANTORO et al., 2015).

Dentre os sintomas/doenças apresentadas pelas aves de rapina parasitadas Santoro et al. (2015) citaram aerosaculite, pneumonia, caquexia e fraturas nos ossos. Tais fraturas podem estar relacionadas à condição física debilitada da ave devido à carga parasitária, o que contribui para acidentes durante o voo e consequentes traumas secundários. Embora estudos sobre os efeitos de Diplotriaenidae sejam pontuais e não englobe *D. bargusinica*, é provável que esta também possa ocasionar problemas de saúde em seus hospedeiros causando sintomas/doenças semelhantes aos relatados.

Cyathostoma (Cyathostoma) phenisci descrito em pinguins africanos *Spheniscus demersus* (Linnaeus, 1758) (Sphenisciformes: Spheniscidae) foi estudado

por Kanarek et al. (2013). Os autores realizaram um estudo morfológico detalhado¹ e molecular, cujos dados bibliográficos da espécie sobre morfologia, ecologia e distribuição geográfica eram escassos. Este parasito, em determinadas condições, como altas intensidades de infecção, pode causar doenças graves e até morte das aves infectadas, portanto desempenhando papel relevante em saúde animal e no aspecto de conservação de espécies.

Os resultados de ambos estudos foram significativos para elucidar relações filogenéticas entre grupos de nematoides bem como a comparação desses dados com a sistemática morfológica tradicional.

3.2. Marcadores moleculares

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 são inferidas a partir da análise comparativa de sequências homólogas de DNA ou proteínas (LEMEY et al., 2009).

No DNA existem regiões que não codificam proteínas, muitas delas passaram a ser usadas como marcadores moleculares em estudos de genética de populações (JARMAN et al., 2002). Esses marcadores têm se tornado cada vez mais importantes na biologia de parasitos, incluindo caracterização de linhagens, epidemiologia, genética de populações, diagnóstico, mapeamento genético, isolamento de genes, evolução, filogenia, virulência, preferência de hospedeiro, taxa de desenvolvimento, antigenicidade, resistência a drogas, entre outros (GASSER; CHILTON, 2001; PEARCE et al., 2009; SIMO et al., 2010; CONRAD, 2011).

Existem vários modelos que possibilitam a determinação da variabilidade genética de diferentes organismos, desenvolvidos a partir de PCR e que vêm possibilitando o conhecimento da filogenia de diversas espécies animais (SANTOS, 2008). Diferentes marcadores baseados em PCR fornecem informações genéticas que são adequadas para certa gama de questões numa determinada escala. Um

¹Um estudo morfológico detalhado é baseado em características morfológicas e morfométricas, podendo ser realizado através de testes estatísticos, desenhos e fotografias.

marcador de escala muito fina pode detectar e quantificar as diferenças entre os indivíduos, mas torna-se inútil quando aplicado aos membros de espécies diferentes. Do mesmo modo, por exemplo, um marcador mais conservado pode ser usado para inferir filogenia de espécies, mas pode não detectar qualquer variação entre subespécies (ORITA et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990, HAYASHI, 1991; MORIN et al., 2004).

A informação contida em cada marcador é obtida pelo sequenciamento de DNA, oferecendo maior acurácia para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (BUENO-SILVA, 2012).

3.3. Marcadores de DNA ribossômico nuclear

Um grupo de genes utilizados como alvo de estudos filogenéticos são os que transcrevem para RNAr, eles estão presentes em múltiplas cópias em eucariotos, não codificam proteínas e são repetidos em tandem. Possuem partes altamente conservadas, alternadas com regiões variáveis, o que possibilita tanto estudos de divergência evolucionária como de diferenciação de espécies (HIBBETT, 1992).

O DNAr tem sido usado para investigar as relações filogenéticas das espécies de nematoides (BLOUIN, 2002). A organização dos genes do DNAr os tornam alvos adequados para a amplificação do DNA por PCR de modo a permitir os estudos genéticos que visam a identificação desses helmintos (POWERS et al., 1997; 2004)

Entre os genes que codificam para o RNAr, a região 18S tem sido muito empregada em estudos taxonômicos, por ser a mais conservada, é frequentemente utilizada para comparação de organismos distantemente relacionados (LI; GRAUR, 1991; HIBBETT, 1992).

O uso apenas da região 18S do DNAr ou este em conjunto com outras regiões possibilitou o estudo de nematoides com diversos propósitos, por exemplo, identificação de formas jovens ou distinção de espécies, caracterização molecular associada à taxonomia morfológica e análises filogenéticas e evolutivas.

Abe et al. (2015) identificaram morfológicamente e caracterizaram molecularmente *Ascaridia nymphii* Abe, Matsuo & Makino, 2015 (Nematoda: Ascaridae) encontrados em *Nymphicus hollandicus* (Kerr, 1792) (Psittaciforme: Cacatuidae), e com base na região 18S realizaram análises filogenéticas. A identificação morfológica detalhada juntamente com a caracterização molecular de

quatro espécies de parasitos de aves da subfamília Capillariinae foi realizada por Tamaru et al. (2015) onde novamente foi possível estabelecer a posição filogenética do grupo com o uso da região 18S DNAr.

A relação filogenética de nematoides Spiruromorpha provenientes de aves de rapina da Alemanha, baseada na região 18S para rever sua posição sistemática foi estudada por Honisch e Krone (2008), assim como análises filogenéticas de *Oxyspirura petrowi* Skrjabin, 1929 (Nematoda: Thelaziidae) parasito de *Colinus virginianus* (Linnaeus, 1758) (Galliforme: Odontophoridae) foram realizadas utilizando a mesma região do gene por Xiang et al. (2013).

Outros autores também realizaram estudos que preenchem lacunas do conhecimento com base em análise filogenética multigene, tais como BLIZZARD et al. (2010) que utilizaram a região 18S em conjunto com outras do DNAr (5.8S, ITS1 e ITS2) para identificar formas larvais e diferenciar espécimes morfológicamente semelhantes de *Baylisascaris procyonis* (Stefanski & Zarnowski, 1951) (Nematoda: Ascaridae) coletados de guaxinins na Geórgia, Texas e Kentucky, a fim de comparar a variabilidade genética entre os parasitos.

Meekums et al. (2015) realizaram análise genética de *Trichuris trichiura* (Owen, 1835) e *Trichuris suis* (Schrunk 1788) (Nematoda: Trichuridae) do Equador, com base nas regiões 18S e TS2, possibilitaram a diferenciação de duas espécies morfológicamente quase indistinguíveis.

Dados moleculares associados à morfológicos e epidemiológicos sobre a distribuição geográfica de *Crenosoma vulpis* (Rudolphi, 1819) (Nematoda: Crenosomatidae) de carnívoros silvestres e domésticos na Itália, foram fornecidos por Latrofa et al. (2015) e com base nas regiões 18S DNAr e 12S DNAm foi possível estudar as relações filogenéticas entre *C. vulpis* com outros membros da superfamília Metastrongyloidea.

Chilton et al. (2006), realizaram um estudo utilizando as regiões 18S e 28S DNAr, onde verificaram que a predileção do órgão de eleição e o tipo de hospedeiro escolhido por nematoides Strongylida está relacionado com a origem evolutiva dos diferentes grupos taxonômicos pertencentes a esse grupo.

Ainda o uso combinado de 18S DNAr e COX1 DNAm para análise da validação e posição filogenética de *Aspiculuris tetraptera* Schulz, 1924 (Nematoda: Heteroxynematidae) de *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) na Índia (GOSWAMI et al., 2015), e caracterização molecular e análise filogenética de

Lagochilascaris minor Leiper, 1909 (Nematoda: Ascaroidea) provenientes de gatos domésticos *Felis catus* Linnaeus, 1758 (Carnivora: Felidae) (MACEDO, 2015), em que ambos sugerem que dados morfológicos associados aos moleculares geram uma melhor resolução filogenética.

Dessa forma este estudo segue o mesmo viés dos anteriormente citados e foi o primeiro a gerar sequências parciais do gene 18S do DNAr nuclear de *D. bargusinica*, a fim de contribuir para a elucidação taxonômica da espécie. Tais sequências servirão para estudos filogenéticos atuais e futuros, disponibilizando dados moleculares de nematoides parasitos de aves da região neotropical do Brasil.

4. Material e Métodos

4.1. Obtenção dos parasitos

Para a realização do estudo foram utilizados 20 espécimes de *Diplotriaena bargusinica* (14 fêmeas e 6 machos) classificadas conforme o Apêndice A, coletados dos sacos aéreos de 13 *Chrysomus ruficapillus* (Vieillot, 1819) (Passeriformes: Icteridae) popularmente conhecido como Garibaldi (Figura 4), do município do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (32° 24.36" S - 52° 49.38" W) (ICMBio n°41095-3; CEEA/UFPel n°1477) (Anexos A e B). Os exemplares coletados foram armazenados em etanol 70°GL a -20°C e identificados morfologicamente de acordo com Vicente (1983). Os parasitos foram lavados em solução fisiológica antes de cada extração. Suas porções anteriores e posteriores foram preparadas entre lâmina e lamínula, clarificadas com lactofenol de Aman para registro fotográfico e testemunho morfológico.



Figura 4 – Casal de *Chrysomus ruficapillus*, à esquerda a fêmea e a direita o macho.

Fonte: <https://www.flickr.com/photos/flaviocb/4429860355>

4.2. Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico, as porções intermediárias dos parasitos foram maceradas em tubos com uma solução de 70µl de SDS 10% e 6µl de proteinase K 33%, e colocadas em banho-maria a 55°C por aproximadamente 48 horas. As etapas posteriores foram executadas de acordo com o protocolo do fenol-clorofórmio estabelecido por Sambrook et al. (1989). O DNA extraído foi quantificado e sua concentração e pureza foram observadas em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare), utilizando-se 2µL do DNA.

4.3 Reações de PCR

Os *primers* utilizados para a avaliação e amplificação por PCR do gene 18S do DNAr foram Nem18SF, 5'-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC-3' e Nem18SR, 5'-GGGCGGTATCTGATCGCC-3' (FLOYD et al., 2005).

Para o preparo da reação foi utilizado uma alíquota de 1-5µL (50-100ng) do DNA extraído, 0,5µM de cada *primer*, 12,5µL de mix de PCR 2X (GoTaq® Green Master Mix – Promega) e água ultrapura esterilizada para completar o volume final de 25µL.

Para amplificação do material genético foi utilizado termociclador Amplitherm. As condições de amplificação consistiram de: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5min, seguido de 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 por um resfriamento a 4°C. Controles negativos (mix e água) foram utilizados em cada PCR realizado.

Os amplicons 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), onde o tamanho esperado dos amplicons era de 900-1000pb. Os géis foram observados e fotografados em um transiluminador (L-Pix EXSystem Loccus Biotecnologia). O marcador padrão utilizado foi 100pb DNA Ladder (Promega).

4.4. Purificação e sequenciamento

Os amplicons foram purificados utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), quantificados e submetidos ao sequenciamento automático, pela empresa MacroGen Advancing through Genomics (Coréia do Sul) (<http://www.macrogen.com/>). Para garantir a máxima precisão, cada produto de PCR foi sequenciado três vezes separadamente.

4.5. Análise das sequências

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) (ZANG et al., 2000).

As sequências de diferentes espécies e espécimes foram alinhadas e comparadas usando o software *Clustal W* (THOMPSON et al., 1994) com os parâmetros padrões e modificados visualmente. As sequências foram comparadas, agrupadas e editadas no programa Bioedit 7.2.5 (HALL, 1999).

A composição de nucleotídeos e as análises filogenéticas foram realizadas utilizando o software Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013). As divergências genéticas intraespecíficas entre as sequências foram calculadas por meio do modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) no mesmo programa.

Foram construídas árvores filogenéticas através dos métodos de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), Evolução Mínima (CAVALLI-SFORZA; EDWARD, 1967) e Máxima Verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981).

Para o método de reconstrução filogenética Neighbor-Joining, foi utilizado o modelo de substituição Jukes-Cantor (JUKES; CANTOR, 1969) com padrão de distribuição Gamma. O modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para a reconstrução filogenética de Evolução Mínima com padrão de distribuição Gamma, e também para o método da Máxima Verossimilhança com uso do padrão de distribuição Gamma e sítios invariáveis (G+I).

As árvores filogenéticas foram enraizadas utilizando sequências da região gene 18S DNAr de *Oxyuris equi* (Schrunk, 1788) (Nematoda: Oxyuridae) obtidas do GenBank como grupo externo e representantes de Spirurida descritos na Tabela 1.

Para estimar a confiabilidade das análises, as árvores de consenso foram obtidas após a análise de testes de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985).

Tabela 1 – Parasitos e número de acesso no GenBank, das sequências utilizadas neste estudo.

Espécie	Superfamília	Nº de acesso GenBank
<i>Stegophorus macronectes</i>	Acuarioidea	HE793715
<i>Synhimantus laticeps</i>	Acuarioidea	EU004818
<i>Synhimantus hamatus</i>	Acuarioidea	EU004819
<i>Echinuria borealis</i>	Acuarioidea	EF180064
<i>Serratospiculum tendo</i>	Diplotriaenoidea	AY702704
<i>Cyrnea seurati</i>	Habronematoidea	EU004816
<i>Cyrnea leptoptera</i>	Habronematoidea	EU004815
<i>Cyrnea mansioni</i>	Habronematoidea	AY702701
<i>Microtetrameres cloacitectus</i>	Habronematoidea	EU004814
<i>Hadjelia truncata</i>	Habronematoidea	JX235976
<i>Physaloptera alata</i>	Physalopteroidea	AY702703
<i>Physaloptera pivori</i>	Physalopteroidea	EU004817
<i>Oxyuris equi</i>	Oxyuroidea	EF180062

5. Resultados

Vinte sequências parciais do gene 18S do DNAr foram geradas a partir de fragmentos obtidos por amplificação com comprimento entre 900 e 1000pb (Figura 5). Porém, para otimizar as análises moleculares a matriz de dados foi editada em tamanho padrão com 501pb.

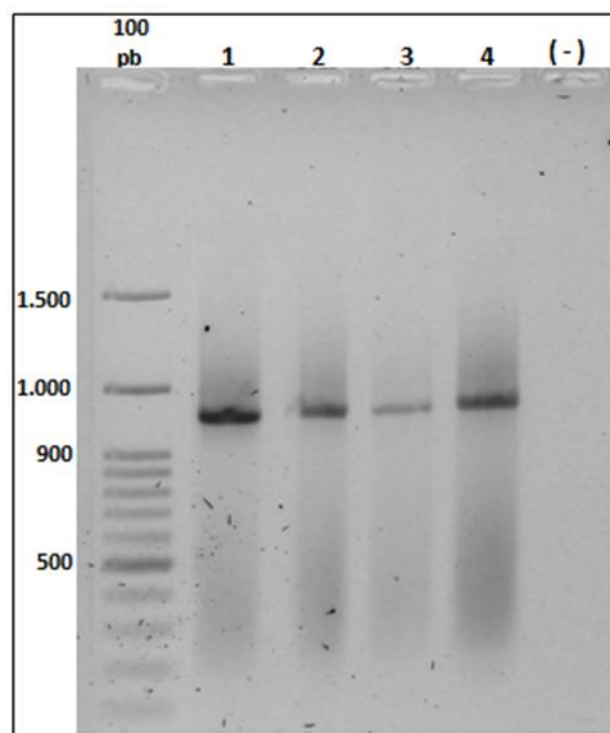


Figura 5 - Visualização em gel de agarose de fragmentos amplificados por PCR da região 18S DNAr de quatro espécimes. 100pb: marcador de peso molecular; 1-4: diferentes amostras de DNA de *Diplotrinaena bargusinica*; (-): controle negativo.

Das vinte sequências analisadas apenas três apresentaram sítios variáveis (DT06, DT08, DT17), num total de seis sítios, como pode ser observado na Figura 6. Essas sequências são oriundas de três hospedeiros diferentes. As outras dezessete não apresentaram variações. Todas elas estão em processo de submissão ao GenBank. No total quatro haplótipos foram obtidos.

DT01	G T G T C T G C C T T A T C A A C T T T C G A T G G T A G T T T A T G T G C C T A C C A T G G T T G T A A C G G G T A A	[60]
DT02	.	
DT03	.	
DT04	.	
DT05	.	
DT06	.	
DT07	.	
DT08	.	
DT09	.	
DT10	.	
DT11	.	
DT12	.	
DT13	.	
DT14	.	
DT15	.	
DT16	.	
DT17	.	
DT18	.	
DT19	.	
DT20	.	

DT01	C G G A G A A T A A G G G T T C G A C T C C G G A G A G G G A G C C T G A G A A A C G G C T A C C A C A T C C A A G G A	[120]
DT02	.	
DT03	.	
DT04	.	
DT05	.	
DT06	.	
DT07	.	
DT08	.	
DT09	.	
DT10	.	
DT11	.	
DT12	.	
DT13	.	
DT14	.	
DT15	.	
DT16	.	
DT17	.	
DT18	.	
DT19	.	
DT20	.	

DT01	A G G C A G C A G G C G C G C A A A T T A C C C A A T C T C G G A A T G A G G A G G T A G T G A C G A A A A A T A A C G	[180]
DT02	.	
DT03	.	
DT04	.	
DT05	.	
DT06	.	
DT07	.	
DT08	.	
DT09	.	
DT10	.	
DT11	.	
DT12	.	
DT13	.	
DT14	.	
DT15	.	
DT16	.	
DT17	.	
DT18	.	
DT19	.	
DT20	.	

DT01	A G A C C G T T C T C T T T G A G G C C G G T T A T C G G A A T G G G T A C A A T T T A A A C C C G T T A A C G A G A A	[240]
DT02	.	
DT03	.	
DT04	.	
DT05	.	
DT06	.	
DT07	.	
DT08	.	
DT09	.	
DT10	.	
DT11	.	
DT12	.	
DT13	.	
DT14	.	
DT15	.	
DT16	.	
DT17	.	
DT18	.	
DT19	.	
DT20	.	

[illegible]

DT01	T C G T T A T T G C T G C G G T T A A A A A G C T C G T A G T T G G A T C T G C G T C T T A G G G C C T G G T C C G T C [360]
DT02	
DT03	
DT04	
DT05	
DT06	
DT07	
DT08	
DT09	
DT10	
DT11	
DT12	
DT13	
DT14	
DT15	
DT16	
DT17	
DT18	
DT19	
DT20	

[illegible][illegible]

```

DT01  G G G C T A A T G C C T G A A T A A T G G [501]
DT02  . . . . .
DT03  . . . . .
DT04  . . . . .
DT05  . . . . .
DT06  . . . . .
DT07  . . . . .
DT08  . . . . .
DT09  . . . . .
DT10  . . . . .
DT11  . . . . .
DT12  . . . . .
DT13  . . . . .
DT14  . . . . .
DT15  . . . . .
DT16  . . . . .
DT17  . . . . .
DT18  . . . . .
DT19  . . . . .
DT20  . . . . .

```

Figura 6 – Alinhamento das vinte sequências da região 18S DNAr (501pb) de *Diplotriaena bargusínica* obtidas neste estudo destacando-se os sítios variáveis apresentados em DT06, DT08 e DT17.

A composição nucleotídica das sequências revelou valores bem similares entre elas, e A+T apresentaram valores maiores (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição nucleotídica do gene 18S DNAr da sequência consenso dos espécimes de *Diplotriaena bargusínica*.

Gene	Comprimento (pb)	A %	T %	C %	G %	CG %	AT %	Sítios variáveis	Sítios conservados
18SDNAr	501	26,8	24,8	20,6	27,8	48,4	51,6	6	495

A – Adenina, T – Timina, C – Citosina, e G – Guanina

Foi construída uma matriz de distância genética das sequências obtidas (Figura 7), onde pode-se observar pouca diferenciação genética entre elas.

	DT01	DT02	DT03	DT04	DT05	DT06	DT07	DT08	DT09	DT10	DT11	DT12	DT13	DT14	DT15	DT16	DT17	DT18	DT19	DT20
DT01		0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT02	0,000		0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT03	0,000	0,000		0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT04	0,000	0,000	0,000		0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT05	0,000	0,000	0,000	0,000		0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT06	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002		0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002
DT07	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002		0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT08	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002		0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002
DT09	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT12	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT15	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
DT16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,003	0,000	0,000	0,000
DT17	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,008	0,006	0,008	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006		0,003	0,003	0,003
DT18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006		0,000	0,000
DT19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000		0,000
DT20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	

Figura 7 – Matriz de distância genética (região 18S) das vinte sequências obtidas de *Diplotriaena bargusínica*, gerada a partir do modelo de Kimura 2-parâmetros.

Quanto às análises filogenéticas, três árvores foram geradas com base em dois métodos de distância Neighbor-Joining e Evolução Mínima e uma pelo método da Máxima Verossimilhança baseado em caráter (Figuras 8, 9 e 10), utilizando-se a sequência consenso de *D. bargusinica*.

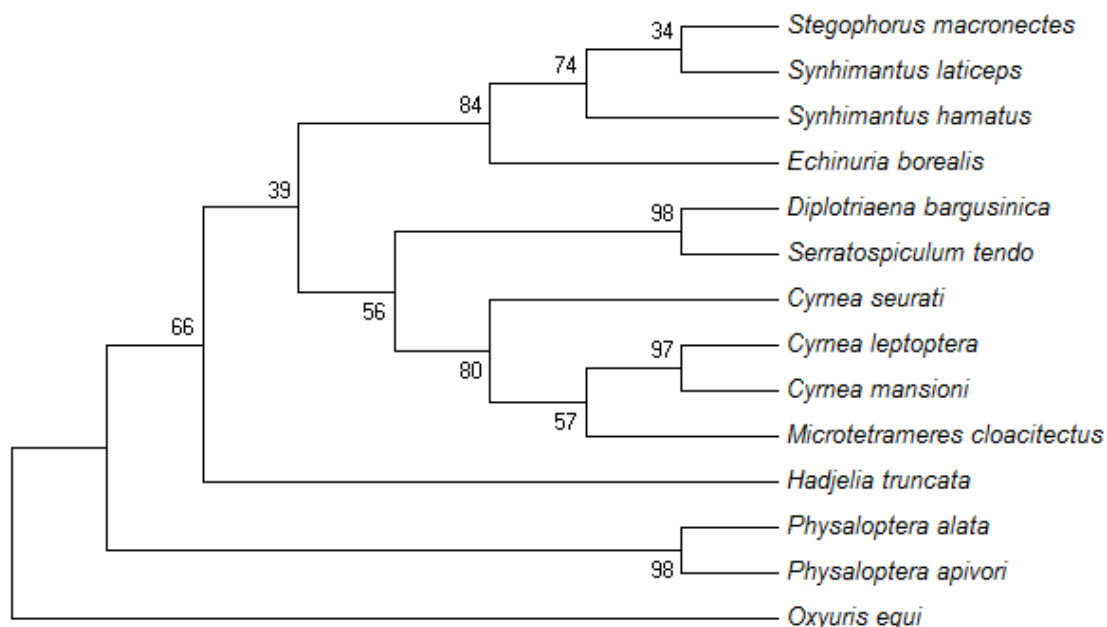


Figura 8 - Relação filogenética entre *Diplotriaena bargusinica* e outras espécies de Spirurida. Árvore inferida com base na região 18S DNAr a partir do método da Evolução Mínima, e utilizando *Oxyuris equi* como grupo externo. 1000 réplicas de Bootstrap.

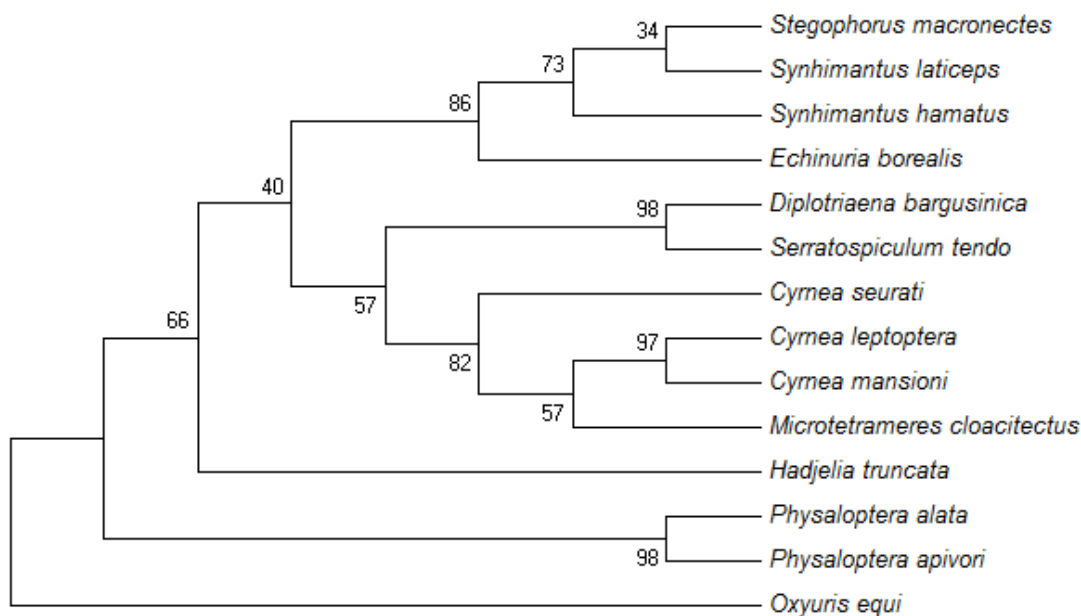


Figura 9 - Relação filogenética entre *Diplotriaena bargusinica* e outras espécies de Spirurida. Árvore inferida com base na região 18S DNAr a partir do método de Neighbor-Joining e utilizando *Oxyuris equi* como grupo externo. 1000 réplicas de Bootstrap.

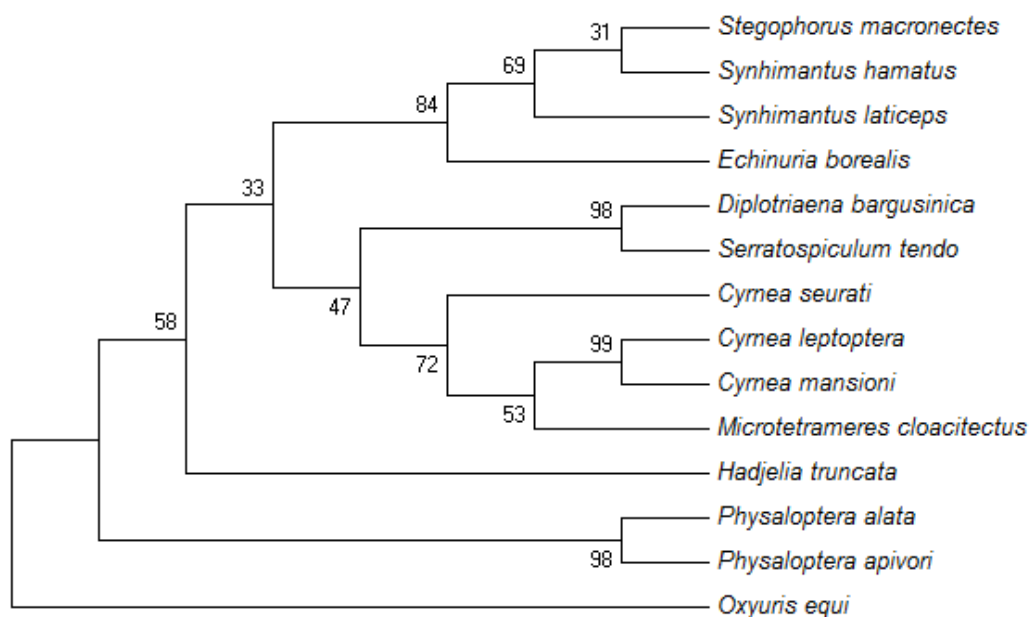


Figura 10 - Relação filogenética entre *Diplotriaena bargusinica* e outras espécies de Spirurida. Árvore inferida com base na região 18S DNAr a partir da Máxima Verossimilhança, e utilizando *Oxyuris equi* como grupo externo. 1000 réplicas de Bootstrap.

As três árvores apresentaram topologia muito similar, mostrando que o clado constituído por *D. bargusinica* e *S. tendo* apresenta origem monofilética assim como todos os outros grupos.

Uma quarta árvore filogenética foi construída utilizando-se todas as sequências de *D. bargusinica* obtidas neste estudo, com finalidade de analisar as diferenças geradas entre os agrupamentos (Figura 11). Neste caso todas as sequências de *D. bargusinica* agruparam-se filogeneticamente, se distanciando de *S. tendo* com um valor de Bootstrap de 96%.

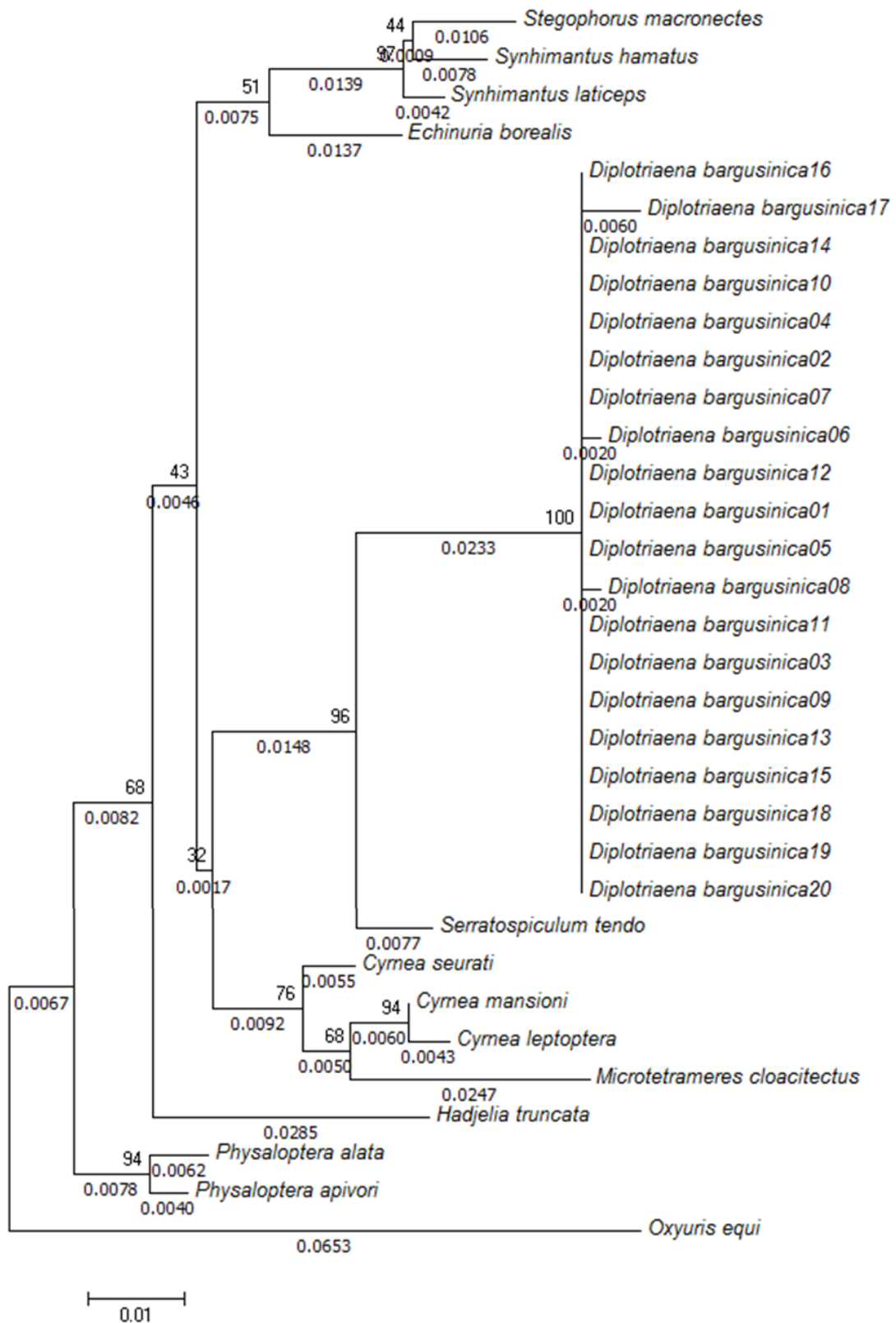


Figura 11 - Relação filogenética das vinte sequências de *Diplotriaena bargusina* e outras espécies de Spirurida. Árvore inferida com base na região 18S DNAr a partir do método da Neighbor-Joining, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros com distribuição Gamma utilizando sequência de *Oxyuris equi* como grupo externo.

Os espécimes utilizados neste estudo foram identificados através da chave elaborada por Vicente et al. (1983) levando em consideração as particularidades de fêmeas e machos (Figura 12). Porém devido as variações morfológicas dos espículos apresentadas entre os machos (Figura 13), e a possibilidade de os hospedeiros estarem infectados por mais de uma espécie, a taxonomia baseada somente na morfologia não foi suficiente para uma identificação específica confiável.

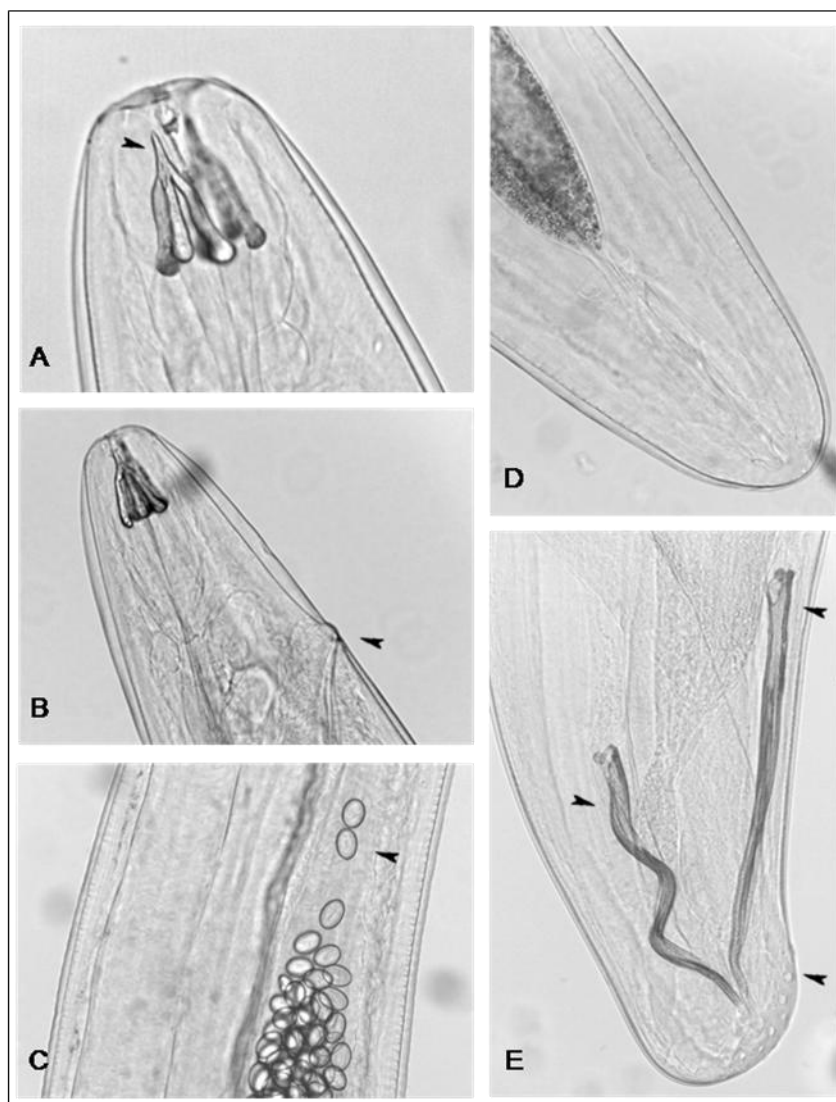


Figura 12 - *Diplotriaena bargusinica*. A - Região anterior com detalhe no tridente liso com ápice afilado (200x). B – Região anterior da fêmea apontando a abertura vulvar (100x). C - Região mediana da fêmea apontando os ovos (100x). D - Região posterior da fêmea (100x). E – Região posterior do macho apontando espículo maior, espículo menor e papilas caudais (200x).

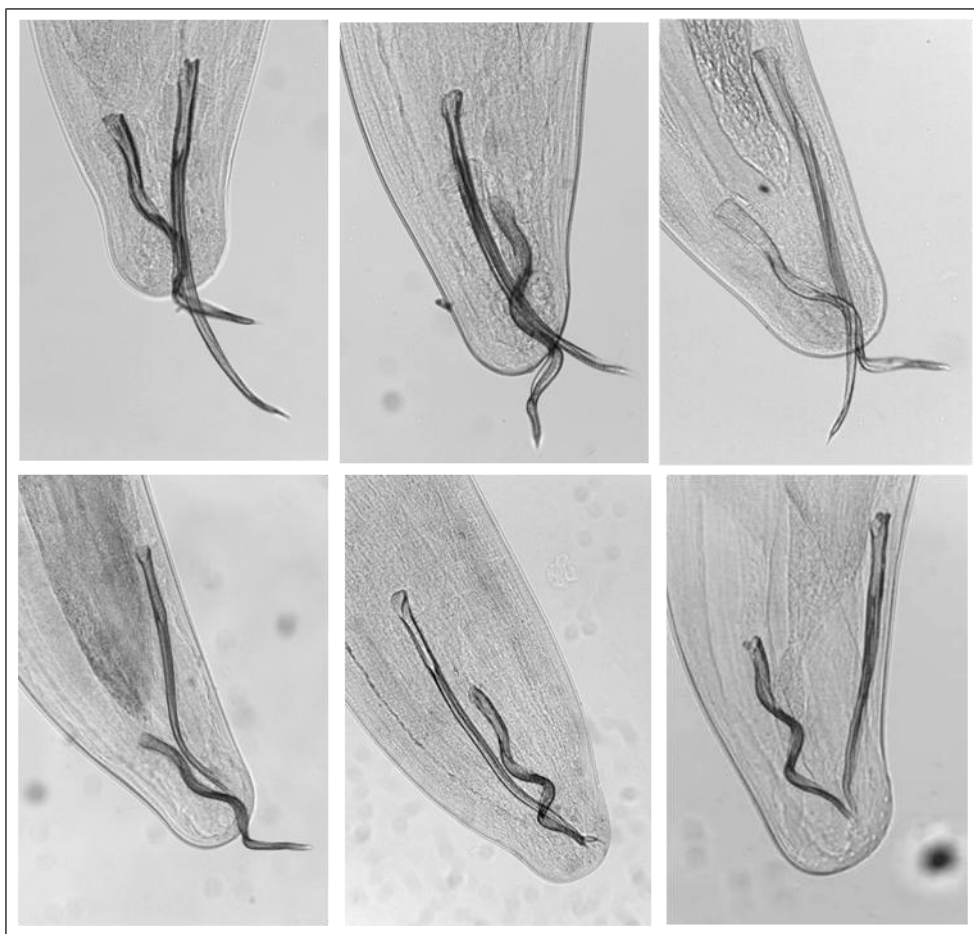


Figura 13 - *Diplotriaena bargusinica*. Porção posterior dos seis espécimes machos utilizados neste estudo mostrando as variações morfológicas dos espículos (100x).

Na Figura 14 visualiza-se diferentes espécies de *Diplotriaena* com base nas variações morfológicas dos espículos segundo Vicente et al. (1983). Dessa forma observa-se o quanto a similaridade entre elas ocorre, fato que dificulta a identificação intra e interespecífica do grupo.

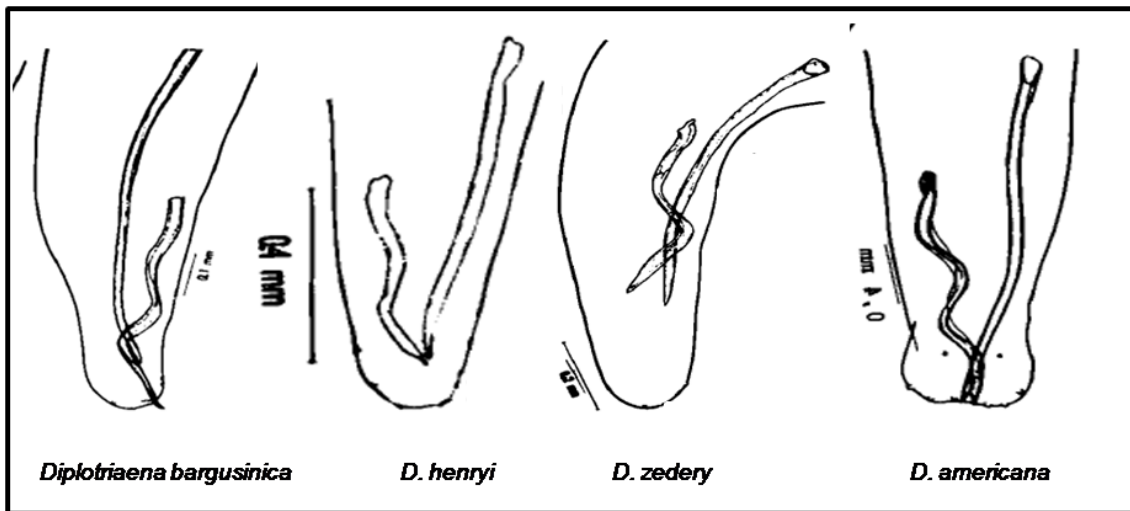


Figura 14 - Desenhos realizados em câmara clara por Vicente et al. (1983). Porção posterior dos machos detalhando as variações morfológicas dos espículos entre as quatro espécies de *Diplotrinaena*.

6. Discussão

Com base na composição nucleotídica das sequências observou-se valor pouco maior de A+T (51,6%) em relação a C+G (48,4%) (Tabela 2), semelhante às composições relatadas por Pereira (2006) para a região 18S.

As análises da matriz de distância genética das sequências confirmaram a identidade dos espécimes. Visto que os índices apresentados variaram de 0 a 0,008 o que indica pouca diferenciação segundo Yeh (2000) (Figura 7).

Essas variações podem ser notadas ao observar as três sequências que apresentam sítios variáveis. As demais sequências não apresentaram variabilidade genética. Os valores encontrados retratam um alto grau de proximidade entre as amostras, sugerindo que todas são pertencentes à mesma espécie, tomando como parâmetro a região 18S, e neste caso os dados moleculares comprovaram os morfológicos.

A identificação precisa deste grupo, apenas com base nas abordagens tradicionais é laboriosa, pois as espécies de *Diplotrina* exibem uma grande semelhança e algumas delas foram pobremente descritas ou ilustradas na literatura. Essas diferenças morfológicas podem ser sutis e de difícil visualização, e ainda algumas delas podem aparecer entre indivíduos da mesma espécie.

Frequentemente estudos baseados apenas em caracteres morfológicos para a identificação de nematoides apresentam sua taxonomia inconclusiva, tanto pela inconsistência dos caracteres, como pela ausência dos mesmos em determinados estágios do ciclo biológico (OLIVEIRA, et al., 2011). No caso dos espécimes de *D. bargusinica* utilizados neste estudo é importante ressaltar que através da identificação específica das fêmeas, com base no diagnóstico morfológico, a posterior análise molecular foi conclusiva. Pois, uma vez que os machos geraram dúvida quanto a identificação morfológica, devido a variação encontrada em seus espículos, a utilização de amostras de DNA de ambos, comprovou que todos pertencem geneticamente à mesma espécie.

Logo, conclui-se que as descrições de táxons baseadas exclusivamente em dados morfológicos podem gerar incertezas na delimitação das espécies, e a caracterização molecular torna-se uma ferramenta importante para auxiliar nestes estudos, possibilitando também, ampliar o conhecimento da diversidade genética desses parasitos.

Quanto às análises filogenéticas, as três árvores geradas (Figuras 8, 9 e 10) apresentaram topologia muito similar, porém os ramos gerados nem sempre são bem suportados, isto devido à escassez de dados da região 18S de representantes do grupo Spirurida disponíveis nos bancos genéticos.

O clado constituído por *D. bargusinica* e *S. tendo* apresenta origem monofilética assim como todos os outros grupos.

A conformação dos ramos mostrados nas árvores obtidas concorda com a filogenia realizada por Chabaud e Bain (1994), em que os autores inferem relações filogenéticas hipotéticas das superfamílias de Spirurida com base em caracteres morfológicos e distribuição geográfica. Segundo esse estudo, os grupos Acuarioidea, Diplotriaenoidea e Habronematoidea são mais próximos entre si, e mais distantes em relação à Physalopteroidea, corroborando os resultados encontrados no presente estudo (Figura 15).

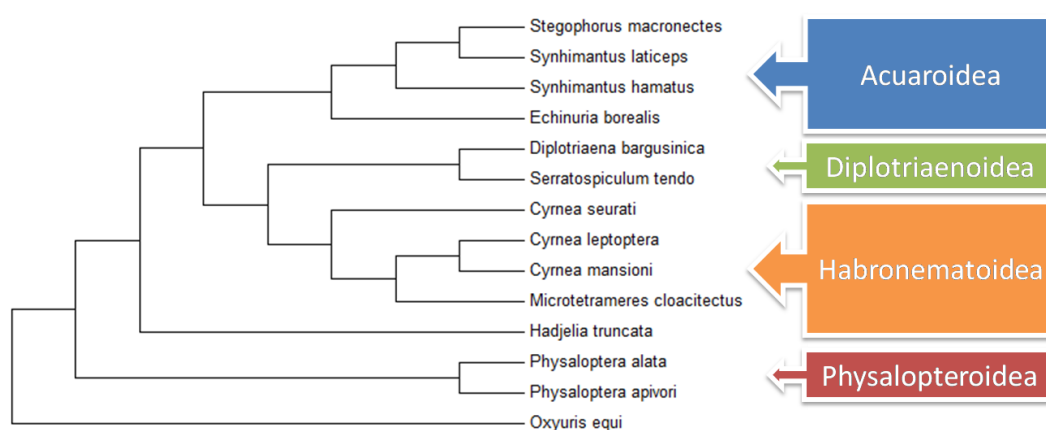


Figura 15 – Relação filogenética de espécies de Spirurida inferida com base na região 18S DNAr, indicando suas respectivas superfamílias.

A comparação molecular entre diferentes grupos de Spirurida é dificultada pela carência de dados da região 18S disponíveis. Devido a esta razão, as análises das sequências de *D. bargusinica* apresentaram maior semelhança genética com espécies de outros gêneros, como por exemplo, sua proximidade com *S. tendo*.

Diplotriaeana bargusinica e *S. tendo* pertencem à mesma família Diplotriaeidae, mesmo sendo de gêneros diferentes os dois agruparam-se com um valor de Bootstrap de 98%. Já em uma árvore onde todas as sequências geradas neste estudo são utilizadas para filogenia (Figura 11), percebe-se que elas constituíram um clado altamente suportado, em que todos da mesma espécie agruparam-se filogeneticamente, se distanciando de *S. tendo* com um valor de Bootstrap de 96%.

Na mesma árvore também é possível observar as três sequências que apresentaram os sítios variáveis (DT06, DT08 e DT17), com distâncias diferentes das demais, refletindo os valores mostrados anteriormente na matriz de distância (Figura 7). Portanto a análise molecular baseada na região 18S permitiu diferenciar grupos taxonômicos entre si, com valores de Bootstrap bem suportados entre as espécies bem como entre os espécimes de *D. bargusinica* (Figura 11).

Apenas espécies de Spirurida parasitos de aves foram selecionadas para as análises filogenéticas, e com relevante homologia entre si, considerando os poucos dados disponíveis para o grupo. No entanto em estudos futuros, onde estejam disponíveis sequências de parasitos de outros grupos de vertebrados, espera-se obter valores de homologia acima de 95%, e consequentemente gerar melhores valores de suporte, tanto em nível de espécie como de famílias.

7. Conclusões

Este é o primeiro estudo a gerar sequências parciais do gene 18S da região ribossômica do DNA nuclear de *D. bargusinica* contribuindo para a elucidação da sua taxonomia.

As sequências obtidas e analisadas confirmam a identificação morfológica dos espécimes, indicando que todos pertencem à *Diplotrinaena bargusinica*.

Com relação à filogenia, estudos adicionais utilizando um número maior de dados genéticos são necessários para análise e comparação congruente e elucidação da posição filogenética destes nematoides parasitos.

Referências

- ABE, N.; MATSUO, K.; MAKINO, I. *Ascaridia nymphii* n. sp. (Nematoda: Ascaridida) from the alimentary tract of a severely emaciated dead cockatiel *Nymphicus hollandicus*. **Parasitology Research**, v.114, n.11, p. 4281-4288, 2015.
- 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. p. 1-25.
- ANDERSON, Roy C. On the development, morphology, and experimental transmission of *Diplotrriaena bargusina* (Filarioidea: Diplotrriaenidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 40, n. 7, p. 1175-1186, 1962.
- ANDERSON, ROY. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. London: Cabi.2000, 671 p.
- ATIKISON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. USA: Wiley-Blackwell, 2008. 592 p.
- BLIZZARD, E. L.; DAVIS, C. D.; HENKE, S.; LONG, D. B.; HALL, C. A; YABSLEY, M. J. Distribution, Prevalence, and Genetic Characterization of *Baylisascaris procyonis* in Selected Areas of Georgia. **Journal of Parasitology**, v. 96, n.6, p. 1128-1133, 2010.
- BLOUIN, M.S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcript spacer. **International Journal for Parasitology** v. 32, p. 527–531, 2002.
- 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, supl. 1, p. 19-28, 2009.
- BROOKS, D. R.; HOBERG, E. P. Triage for the biosphere: The need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. **Comparative Parasitology**, v. 67, n. 1, p. 1 25, 2000.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**, v. 34, n. 83, p. 157-163, 2012.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. **American journal of human genetics**, v. 19, n. 3 Pt 1, p. 233, 1967.

CHABAUD, A. G. Remarques sur le cycle évolutif des filaires du genre *Diplotrriaena* et redescription de *D. Monticelliana*. **Vie et Milieu**, v. 6, n. 3, p. 342 – 347, 1956.

CHABAUD, A. G.; BAIN, O. The evolutionary expansion of the Spirurida. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1179-1201, 1994.

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 and Evolution**, v. 40, n. 1, p. 118-128, 2006.

CONRAD, M.; ZUBACOVA, Z.; DUNN, L. A.; UPCROFT, J.; SULLIVAN, S. A.; TACHEZY, J.; CARLTON, J. M. Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 175, n. 1, p. 30-38, 2011.

DOBSON, A.; LAFFERTY, K. D.; KURIS, A. M.; HECHINGER, R. F.; JETZ, W. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, suppl. 1, p. 11482-11489, 2008.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, v.17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, p. 783-791, 1985.

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.

GASSER, R. B.; CHILTON, N. B. Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular

evolution of parasitic nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 201-13, 2001.

GOSWAMI, U.; CHAUDHARY, A.; VERMA, C.; SINGH, H. S. First Molecular Characterization of *Aspiculuris tetraptera* (Nematoda: Heteroxynematidae) from *Mus musculus* (Rodentia: Muridae) in India. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 3, p. 553-556, 2015.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

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.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods Applications Journal**, v. 1, n. 1, p. 34-8, 1991.

HIBBETT, D.S. Ribosomal RNA and fungal systematics. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, 33: 533-556, 1992.

HONISCH, M.; KRONE, O. Phylogenetic relationships of Spiruromorpha from birds of prey based on 18S rDNA. **Journal of helminthology**, v. 82, n. 02, p. 129-133, 2008.

JARMAN, S. N.; WARD, R. D.; ELLIOTT, N. G. Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns. **Journal of Marine Biotechnology**, 347-355, 2002.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press, 1969. v. 3, n. 21, p. 21-132.

KANAREK, G.; HORNE, E. C.; ZALEŚNY, G. *Cyathostoma (Cyathostoma) phenisci* Baudet, 1937 (Nematoda: Syngamidae), a parasite of respiratory tract of African penguin *Spheniscus demersus*: Morphological and molecular characterisation with some ecological and veterinary notes. **Parasitology international**, v. 62, n. 5, p. 416-422, 2013.

KIMURA, M. Simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions

trought comparative studies nucleotide sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LATROFA, M. S.; LIA, R. P.; GIANNELLI, A.; COLELLA, V.; SANTORO, M.; D'ALESSIO, N.; CAMPBELL, B. E.; PARISI, A.; DANTAS-TORRES, F.; MUTAFCHIEV, Y.; VENEZIANO, V.; OTRANTO, D. *Crenosoma vulpis* in wild and domestic carnivores from Italy: a morphological and molecular study. **Parasitology research**, v. 114, n. 10, p. 3611-3617, 2015.

LEE, Donald L. (Ed.). **The biology of nematodes**. London: CRC Press, 2002, 618 p.

LI, W.-H; GRAUR, D. **Fundamentals of molecular evolution**. Sinauer Associates, 1991, 284 p.

LUKES, J.; HORÁK, A.; SCHOLZ, T. Helminth genome projects: all or nothing. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 265–266, 2005.

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, p. 723.

MACEDO, M. P. **Diagnóstico morfológico e molecular de parasitos de *Canis lupus* (Linnaeus, 1758) e caracterização molecular de *Lagochilascaris minor* (Leiper, 1909)**. 2015. 63 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

MEEKUMS, H.; HAWASH, M. B.; SPARKS, A. M.; OVIEDO, Y.; SANDOVAL, C.; CHICO, M. E.; STOTHARD, J. R.; COOPER, P. J.; NEJSUM, P.; BETSON, M. A genetic analysis of *Trichuris trichiura* and *Trichuris suis* from Ecuador. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 168, 2015.

MORIN, P. A.; LUIKART, G.; WAYNE, R. K. SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 4, p. 208-216, 2004.

MOURA, R. M. Histórico da taxonomia dos nematóides. **Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol. 3, p.139-169, 2006.

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.

OLIVEIRA, C. M. G; INOMOTO, M. M.; BESSI, R.; TOMAZINI, M. D.; BLOK, V. P. Técnicas moleculares e taxonomia clássica na diagnose de nematoides parasitos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 19, 2011.

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; & HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, v. 5, n. 4, p. 874-9, 1989.

PEARCE, R. J; POTA, H.; EVEHE, M. S. B.; BÂ, E. H.; MOMBO-NGOMA, G.; MALISA, A. L.; MBACHAM, W.; ORD, R.; INOJOSA, W.; MATONDO, A.; DIALLO, D.; BROEK, I.; SWAETHOUT, T.; DEJENE, A.; GROBUCH, M.; NJIE, F.; DUNYOT, S.; KWEKU, M.; CHANDRAMOHAN, S.; BONNET, D.; GUTHMANN, J.; CLARKE, S.; BARNES, K.; KATOKELE, S.; UUSIKU, P.; AGBOGHOROMA, C.; ELEGBA, O.; CISSÉ, B.; A-ELBASIT, I.; GIHA, H.; KACHUR.; LYNCH, S.; RWAKIMARI, J.; CHANDA, P.; HAWELA, M.; SHARPT, B.; NAIDOO, I.; ROPER, C. Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African *Plasmodium falciparum* malaria. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 4, p. e1000055, 2009.

PEREIRA, J. O. P. **Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear**. 2006. 142 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

PIRES, A. C.; MARINONI, L. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, p. 339-346, 2010.

POULIN, Robert; MORAND, Serge. **The diversity of parasites**. Quarterly Review of Biology, p. 277-293, 2000.

POULIN, R. Macroecological patterns of species richness in parasite assemblages. **Basic and Applied Ecology**, v. 5, n. 5, p. 423-434, 2004.

POWERS, T. O.; TODD, T. C.; BURNELL, A. M.; MURRAY, P. C. B.; FLEMING, C. C.; SZALANSKI, A. L.; ADAMS, B.A.; HARRIS, T. S. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. **Journal of Nematology**, v. 29, n. 4, p. 441, 1997.

POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p. 367–383, 2004.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989, p.253.

SANTORO, M.; D'ALESSIO, N.; DI PRISCO, F.; KINSELLA, J. M.; BARCA, L.; DEGLI UBERTI, B.; RESTUCCI, B.; MATANO, M.; TROISI, S.; GALIERO, G.; VENEZIANO, V. The occurrence and pathogenicity of *Serratospiculum tendo* (Nematoda: Diplostriaenoidea) in birds of prey from southern Italy. **Journal of helminthology**, 1-4, 2015.

SANTOS, K. R. **Caracterização morfológica e molecular de *Strongyloides ophidia* (Nematoda: Strongyloididae) parasitas de serpentes**. 2008. 57 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 1, p. 63-69, 2004.

SIMO, G.; NJIOKOU, F.; TUME, C.; LUEONG, S.; DE MEEÛS, T.; CUNY, G.; ASONGANYI, T. Population genetic structure of Central African Trypanosoma brucei gambiense isolates using microsatellite DNA markers. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 68-76, 2010.

SOOTA, T. D.; CHATURVEDI, Y. Systematic studies on some more nematodes from the unnamed collections of the Zoological Survey of India. **Records of the Zoological Survey of India**, v. 67, n. 1/2, p. 121-137, 1972.

TAMARU, M.; YAMAKI, S.; JIMENEZ, L. A.; SATO, H. Morphological and molecular genetic characterization of three *Capillaria* spp. (*Capillaria anatis*, *Capillaria pudendotecta*, and *Capillaria madseni*) and *Baruscapillaria obsignata* (Nematoda: Trichuridae: Capillariinae) in avians. **Parasitology research**, v. 114, n. 11, p. 4011-4022, 2015.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** v. 30, p. 2725 - 2729, 2013.

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

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.

VALDECASAS, A. G.; WILLIAMS, D.; WHEELER, Q. D. 'Integrative taxonomy' then and now: a response to Dayrat (2005). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 93, n. 1, p. 211-216, 2008.

VICENTE, J. J.; PINTO, R. M.; NORONHA, D. Estudo das espécies brasileiras do gênero *Diplotrina* Henry & Ozoux, 1909 (Nematoda, Filarioidea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 2, p. 165-182, 1983.

VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H.de. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R. M. Nematóides do Brasil. Parte IV: Nematóides de aves. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.1, p. 1-27, 1995.

XIANG, L.; GUO, F.; ZHANG, H.; LACOSTE, L.; ROLLINS, D.; BRUNO, A.; FEDYNICH, A. M.; ZHU, G. Gene discovery, evolutionary affinity and molecular detection of *Oxyspirura petrowi*, an eye worm parasite of game birds. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**. v. 13, n. 5, p. 303-14, 2012.

YEH, F. C. Population genetics. In: Young, A. G., Boshier, D., & Boyle, T. J. B. (eds) **Forest conservation genetics: principles and practice**. **Collingwood: Csiro Publishing**, 2000. p. 21-37.

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.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-5, 1990.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

Apêndice

Apêndice A: Identificação dos vinte espécimes utilizados.

DT01	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 01
DT02	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 02
DT03	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 03
DT04	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 04
DT05	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 05
DT06	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 06
DT07	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 07
DT08	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 08
DT09	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 09
DT10	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 10
DT11	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 11
DT12	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 12
DT13	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 13
DT14	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 14
DT15	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 15
DT16	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 16
DT17	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 17
DT18	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 18
DT19	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 19
DT20	<i>Diplotriaena bargusinica</i> 20

Anexos

Anexo A: Licença ICMBio para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41095-3	Data da Emissão: 26/02/2014 17:56	Data para Revalidação*: 28/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: Fabiana Fedatto Bernardon	CPF: 007.999.960-33
Título do Projeto: Assembléia de helmintos de Chrysomus ruficapillus (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil	
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	Coleta de C. ruficapillus (total 240 aves; 2013 (20), 2014 (120), 2015 (100)) de Rio Grande, RS	10/2013	10/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO 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, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso 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	Está autorizada a coleta de apenas 20 indivíduos em 2013, 120 em 2014 e 100 em 2015, conforme descrição nos dados básicos do projeto.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Gertrud Müller	Orientadora	218.928.730-87	1030796914 SSP-RS	Brasileira
2	Rômulo Silveira Vitôna	Coleta das aves	838.478.800-63	9062215927 SJS-RS	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	RIO GRANDE	RS	Fazendas em Rio Grande	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 39525881





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41095-3	Data da Emissão: 26/02/2014 17:56	Data para Revalidação*: 28/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: Fabiana Fedatto Bernardon	CPF: 007.999.960-33
Título do Projeto: Assembléia de helmintos de <i>Chrysomus ruficapillus</i> (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Chrysomus ruficapillus</i>
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Chrysomus ruficapillus</i> (*Qtde: 120)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina, Outros métodos de captura/coleta(armadilha alcapao)
---	---------------------------------	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 39525881



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41095-3	Data da Emissão: 26/02/2014 17:56	Data para Revalidação*: 28/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: Fabiana Fedatto Bernardon	CPF: 007.999.960-33
Título do Projeto: Assembléia de helmintos de Chrysomus ruficapillus (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 39525881



Página 3/3

Anexo B: Projeto de pesquisa com número do CEEA.



Universidade Federal de Pelotas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Pesquisa

Assembleia de helmintos de *Chrysomus ruficapillus* (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil

1. Identificação

Título do Projeto: **Assembleia de helmintos de *Chrysomus ruficapillus* (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil**

Data Cadastro: **03/12/2013**

Unidade: **IB - INSTITUTO DE BIOLOGIA**

Grupo de Pesquisa: **Parasitas de Animais Silvestres**

Período de Realização: **03/12/2013** até **20/12/2016**

Carga Horária Semanal: **1** Código COCEPE: **4245**

2. Dados Gerais

Grande Área CNPQ: **2.00.00.00-6 - Ciências Biológicas**

Área CNPQ: **2.13.00.00-3 - Parasitologia**

Resumo: **O Brasil está entre as nações com o maior índice de biodiversidade do mundo, estima-se que essa biodiversidade represente cerca de 20% do que há de vida no planeta. Os parasitos representam uma grande proporção da diversidade de vida no mundo, sendo o parasitismo um dos modos de vida mais bem sucedidos exibidos pelos organismos vivos. Nesse contexto, os vertebrados são conhecidos por abrigar uma grande quantidade desses parasitos, em sua maioria, ainda desconhecidos. O projeto visa gerar conhecimento sobre a diversidade de helmintos de *Chrysomus ruficapillus* (Vieillot, 1819) (Passeriformes: Icteridae), popularmente conhecido como garibaldi. Serão coletados 240 espécimes provenientes do município de Rio Grande, RS.**

Envolve experimentação com modelos de animais sob registro CEEA: **Sim**

Registro CEEA: **1477**

Objetivos: **Objetivo geral Identificar as espécies de helmintos que compõem a diversidade parasitária de *Chrysomus ruficapillus* do Rio Grande do Sul. Objetivos específicos - Conhecer a diversidade de helmintos que a espécie abriga. - Quantificar as infecções através dos parâmetros de prevalência, abundância e intensidade médias. - Verificar a possível existência de diferenças quantitativas e qualitativas na carga de helmintos de *C. ruficapillus* em relação aos períodos de coleta das aves e estágio das lavouras de arroz, levando em consideração a disponibilidade de recursos alimentares (presença ou ausência das plantações de arroz) e consequentemente acesso a hospedeiros intermediários. - Comparar os parasitos dos espécimes em diferentes estágios de desenvolvimento e sexo (machos, fêmeas, juvenis).**

3. Equipe

Coordenador

SIAPÉ	Nome	Email
6420568	GERTRUD MULLER ANTUNES	gertruda@ufpel.edu.br

4. Fonte financiadora

Fonte Financeira	Valor
- CAPES	R\$ 2000.00

O Coordenador deste projeto declara, formalmente, que:

- Tem pleno conhecimento dos trâmites a serem seguidos para cadastro junto ao Departamento de Pesquisa da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PRPPG) e o registro no COCEPE;
- Se responsabiliza pelo encaminhamento do projeto em seu Departamento e no Conselho Superior da unidade para sua aprovação;
- Assume inteira responsabilidade pela veracidade das informações contidas na presente solicitação e pelos danos pessoais, materiais e ambientais, decorrentes da execução do projeto e aplicação de seus resultados.

Para validar este documento acesse o site da UFPEL item **Validador de documentos** e informe o código **PI11714CNE**