



YURI WILLKENS DE OLIVEIRA COSTA

**Taxonomia integrativa de nematódeos *Oswaldocruzia* (Trichostrongyloidea:
Molineidae) da Amazônia oriental**

Belém,
2019

YURI WILLKENS DE OLIVEIRA COSTA

Taxonomia integrativa de nematódeos *Oswaldocruzia* (Trichostrongyloidea: Molineidae) da Amazônia oriental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, do convênio da Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Área de concentração: Evolução.

Linha de Pesquisa: Sistemática e Taxonomia

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Jeannie
Nascimento dos Santos**

Belém,
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D278t de Oliveira Costa, Yuri Willkens
Taxonomia integrativa de nematódeos *Oswaldocruzia*
(Trichostrongyloidea: Molineidae) da Amazônia oriental / Yuri Willkens de Oliveira Costa. — 2019.
88 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Jeannie Nascimento dos Santos Dissertação
(Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém,
2019.

1. Nemata. 2. Helmintologia. 3. parasitos intestinais. 4. anfíbios e répteis. I. Título.

CDD 578.012

FOLHA DE APROVAÇÃO

YURI WILLKENS DE OLIVEIRA COSTA

Taxonomia integrativa de nematódeos *Oswaldocruzia* (Trichostrongyloidea: Molineidae) da Amazônia oriental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, do convênio da Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zoologia, sendo a COMISSÃO JULGADORA composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a. JEANNIE NASCIMENTO DOS SANTOS
Universidade Federal do Pará, UFPA (Presidente)

Prof. Dr. GLEOMAR FABIANO MASCHIO
Universidade Federal do Pará, UFPA

Prof.^a Dr.^a. ANA LÚCIA DA COSTA PRUDENTE
Museu Paraense Emílio Goeldi, MPEG

Prof. Dr. DRÁUSIO HONÓRIO MORAIS
Universidade Federal de Uberlândia, UFU Rural da Amazônia, UFRA

Aprovada em: 03 de abril de 2019
Local de defesa: Universidade Federal do Pará

Dedico este trabalho à minha família, professores e amigos que contribuíram para a realização desta etapa em minha vida.

“Parasites make up the majority of species on Earth. According to one estimate, parasites may outnumber free-living species four to one. In other words, the study of life is, for the most part, parasitology.”

Carl Zimmer

Parasite Rex: Inside the Bizarre World of Nature's Most Dangerous Creatures (2001)

AGRADECIMENTOS

Apresento neste pequeno espaço desta dissertação meus agradecimentos à todas as pessoas que, direta ou indiretamente, tiveram papel importante na realização e conclusão desse trabalho.

Agradeço primeiramente aos meus pais Wilquen e Elisângela por todo seu amor, zelo e carinho; pelos anos de investimento em meus estudos e oportunidades concedidas; pelo incondicional apoio ao meu desejo de seguir a carreira de biólogo e pesquisador e principalmente por serem meus maiores exemplos e inspirações na vida. Também agradeço à minha irmã, Yasmim, por sempre ter sido uma ótima parceira, amiga e conselheira, estarei sempre torcendo por teu sucesso e sempre disponível para te ajudar a seguir teus sonhos.

Agradeço a minha família por todo seu amor. Aos meus tios e tias pelas ajudas nos momentos de dificuldade, pelo incentivo aos estudos e os bons momentos em reuniões e festas de família. Aos meus primos e primas pelo companheirismo, pelas melhores histórias vividas e pela inestimável presença nos momentos mais importantes de minha vida. Aos meus avós, Agostinho e Edinea e principalmente aos finados José e Noêmia pelas lições de vida e por todo o carinho.

Também expresso profunda gratidão à Prof.^a Dr^a. Jeannie Nascimento dos Santos, minha orientadora e “mãe de laboratório”. Muito obrigado por ter abraçado minha orientação com tanta confiança e carinho e pelas incontáveis oportunidades de explorar novos horizontes na parasitologia e me aprimorar enquanto pesquisador. Tenho grande admiração e respeito por sua pessoa que também é uma das maiores fontes de inspiração em minha vida profissional.

Sou grato ao Prof. Dr. Gleomar Fabiano Maschio, meu primeiro orientador de iniciação científica na graduação. É sempre gratificante ter suas considerações e sugestões para nossos trabalhos bem como estabelecer parcerias para viagens de campo e coleta. Ao Prof. Dr. Francisco Tiago de Vasconcelos Melo, pelo contínuo apoio durante a realização deste trabalho, auxílio quanto a sistemática de parasitos, pelas críticas, sugestões e comentários que foram fundamentais para a realização desta dissertação. Ao Prof. Dr. Adriano Penha Furtado, um grande amigo do peito, pelo auxílio no estudo molecular, nas discussões quanto aos métodos filogenéticos empregados neste trabalho e por sua presença cativante no Laboratório de Biologia Celular e Helminologia.

Agradeço também aos colaboradores Dr. Yuriy Kuzmin pelo auxílio quanto a sistemática de nematódeos e no uso de softwares para a elaboração de ilustrações científicas. Dr^a. Elane Guerreiro Giese e. Dr. Eduardo Lopes Torres pelos ensinamentos teóricos e práticos em técnicas de processamento e análise em Microscopia Eletrônica de Varredura. Ao Dr. Arnaldo Maldonado Júnior pelo auxílio fundamental nas etapas extração, amplificação e sequenciamento genético em nosso

estudo molecular e ao Dr. Roberto do Val Vilela pela consultoria quanto aos métodos filogenéticos aqui empregados.

Aos meus companheiros de laboratório Allan Rodrigues, Lucas Aristóteles, Ana Nunes, Emanuelle Argolo, Thais Reis, Thayane Fernandes, Soraya Machado, Bianca Nandyara, Evelyn Lambrego, Heriberto Figueira, Carlos Augusto, Ronald, Ana Paula, Gabriel Rebêlo, Cybelle Miranda e Lilian Macedo “Lila”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia do Museu Paraense Emílio Goeldi, pela oportunidade de cursar pós-graduação, pela infraestrutura, professores e demais profissionais responsáveis por parte do meu aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela concessão da autorização para atividades com finalidade científica de número 47271-2 (Anexo 1) e licença permanente para coleta de material zoológico 53557-1 (Anexo 2), ambas obtidas na plataforma SISBio.

Por fim, agradeço também aos demais professores e amigos que conheci durante as disciplinas no Museu Paraense Emílio Goeldi, nos estágios e outras instituições, nas coletas de campo, nos minicursos e nos diversos congressos que pude participar pelo Brasil.

A todos, expresso aqui meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMO	15
<i>ABSTRACT</i>	16
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS	25
OBTENÇÃO DE HOSPEDEIROS E AMOSTRAS DE PARASITOS	25
MICROSCOPIA DE LUZ	26
TAXONOMIA.....	27
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	28
ESTUDO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA	28
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	71
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura do DNA mitocondrial de *Caenorhabditis elegans*, demonstrando a posição relativa dos genes para 12 proteínas (Setas vermelhas) com destaque para a região codificadora da enzima Citocromo c Oxidase I (Seta amarela) e dois rRNAs (setas negras) de acordo com Lemire (2005). **19**
- Figura 2** – Distribuição biogeográfica de *Oswaldocruzia* com base na morfologia do espículo: Orien-to-etíope (azul); Neo-etíope (roxo); Holártico (vermelho); Neotropical Caribenho (amarelo); Neotropical Continental (verde). Adaptado a partir das informações de Ben Slimane et al. (1996). **21**
- Figura 3** – Caracterização morfológica dos espículos das divisões biogeográficas de *Oswaldocruzia*: A. Orien-to-etíope (não-idiomorfo); B. Neo-etíope (não-idiomorfo); C. Holártico (idiomorfo, com bifurcação do garfo no terço mediano); D. Neotropical Continental (idiomorfo, com bifurcação do garfo no terço distal); E. Neotropical Caribenho (idiomorfo, com todos os ramos subdivididos em pequenas projeções). Adaptado a partir das informações de Ben Slimane et al. (1996). **22**
- Figura 4** - Tipos de bolsas copuladoras de acordo com a disposição relativa dos raios bursais: A. Tipo I - Raio 8 nascendo em ramo independente e sem contato com o raio 6 por toda sua extensão; B. Tipo II - Raio 8 nascendo em ramo independente e sobrepon-do-se ao raio 6 na parte mediana; Ca. Tipo III A - Raio 8 surgindo em ramo independente, porém sobrepon-do-se ao raio 6 por quase toda sua extensão, exceto na parte distal; Cb. Tipo III B - Raio 8 surgindo no mesmo ramo do raio 6 e sobrepon-do-se ao mesmo por quase toda sua extensão, exceto na parte distal (Ben Slimane et al. 1996). **23**
- Figura 5** - Localização dos pontos de coleta dos hospedeiros utilizados no presente estudo. 1. Estação Científica Ferreira Penna na Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço; 2. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém; 3. Praia Grande, Salvaterra, Ilha do Marajó. **25**
- Figura 6** - Microscopia de Luz de *O. chambrieri* fêmea parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da região anterior (Barra = 50 µm); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 30 µm); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 µm); D. Visão lateral da abertura da vulva e do aparelho ovojector (Barra = 50 µm); E. Visão lateral da região posterior, com a abertura do ânus e o espinho caudal (Barra = 100 µm). **35**
- Figura 7** - Microscopia de Luz de *O. chambrieri* macho parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da região anterior (Barra = 75 µm); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 30 µm); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 µm); D. Visão ventral da bolsa copuladora (Barra = 25 µm); E. Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 50 µm); F. Visão ventro-lateral do espículo direito, demonstrando a divisão dos três ramos principais (Barra = 40 µm); G. Visão dorsal dos espículos direito e esquerdo (Barra = 40 µm). **36**
- Figura 8** - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. chambrieri* fêmea parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã: A. Detalhes da região anterior (Barra = 50 µm); B. Visão apical da região cefálica, destacando a abertura bucal com um dente esofágico, papilas cefálicas (setas) e anfídios

(asteriscos) (Barra = 5 µm); C. Detalhes das cristas longitudinais na superfície cuticular (Barra = 20 µm); D. Detalhes do deirídio (Barra = 5 µm); E. Poro excretor (Barra = 20 µm); F. Visão ventral da abertura da vulva (Barra = 50 µm); G. Visão ventro-lateral da extremidade posterior (Barra = 20 µm); H. Extremidade da cauda com o espinho cuticular, destacando um fasmídio (seta) (Barra = 5 µm).³⁷

Figura 9 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. chambrieri* macho parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã: A. Visão lateral da bolsa copuladora, destacando papilas bursais (setas) e o lobo dorsal (dl) (Barra = 20 µm); B. Visão ventral da bolsa copuladora, destacando o cone genital com a papila zero (pz), os raios 7 reduzidos (r7) e papilas genitais (setas) (Barra = 20 µm); C. Detalhes do lobo dorsal, com a divisão dos raios 9 (r9) e 10 (r10) (Barra = 5 µm). **38**

Figura 10 - Microscopia de Luz de *O. chabaudi* fêmea parasito de *B. geographica* e *B. wavrini* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da região anterior, com a vesícula cefálica, o esôfago, o anel nervoso, o poro excretor e deirídios (Barra = 150 µm); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 20 µm); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 µm); D. Visão lateral da abertura da vulva e do ovojector (Barra = 200 µm); E. Visão lateral da região posterior, com o ânus e o espinho caudal (Barra = 80 µm). **40**

Figura 11 - Microscopia de Luz de *O. chabaudi* macho parasito de *B. geographica* e *B. wavrini* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da bolsa copuladora, demonstrando o padrão de distribuição dos raios bursais (Barra = 100 µm); B. Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 60 µm); C. Detalhes do cone genital (Barra = 20 µm); D. Detalhes do lobo dorsal (Barra = 20 µm); E. Visão ventral dos espículos direito e esquerdo (Barra = 40 µm); F. Visão ventro-lateral do espículo direito, demonstrando a divisão dos três ramos principais (Barra = 40 µm). **41**

Figura 12 - Microscopia de Luz de *O. chabaudi* macho e fêmea parasito de *B. geographica* e *B. wavrini* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior do corpo (Barra = 100 µm); B. Detalhes da vesícula cefálica (Barra = 40 µm); C. Região posterior da fêmea, indicando a abertura do o ânus (a) e o espinho cuticular terminal (seta) (Barra = 40 µm); D. Visão ventral da bolsa copuladora do macho, indicando papilas bursais (seta) (Barra = 40 µm); E. Visão lateral dos espículos dentro do corpo do macho (Barra = 40 µm). **42**

Figura 13 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. chabaudi* fêmea parasito de *B. geographica* e *B. wavrini* da Flona de Caxiuanã: A. Detalhes da região anterior (Barra = 50 µm); B. Visão apical da região cefálica, destacando a abertura bucal com um dente esofágico, papilas cefálicas (setas) e anfídios (asteriscos) (Barra = 5 µm); C. Detalhes das cristas longitudinais na superfície cuticular e do poro excretor (pe) (Barra = 20 µm); D. Visão ventro-lateral da extremidade posterior, indicando o espinho cuticular e um fasmídio (asterisco) (Barra = 50 µm); E. Visão lateral da bolsa copuladora do macho (Barra = 50 µm). **43**

Figura 14 - Microscopia de Luz de *O. lanfrediae* fêmea parasito de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A- Região anterior, destacando o esôfago (Barra = 100 µm); B- Detalhes da vesicular cefálica (Barra = 20 µm); C- Detalhes do anel nervoso indicado na seta (Barra = 20 µm); D- Posição do poro excretor (pe) e do deirídio (d) (Barra = 20 µm); E- Detalhes do sistema reprodutor feminino com a vulva indicada na seta (Barra = 100 µm); F- Região posterior evidenciando o ânus, a cauda e o espinho cuticular terminal indicado na seta (Barra = 50 µm). **46**

Figura 15 - Microscopia de Luz de *O. lanfrediae* macho parasito de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A- Região posterior, destacando a bolsa copuladora em visão ventral (Barra = 150 µm); B- Detalhes da distribuição dos raios e posição das papilas bursais (Barra = 40 µm); C- Detalhes dos raios 9 e 10 no lobo dorsal da bolsa copuladora (Barra = 20 µm); D- Visão geral dos espículos no interior do corpo (Barra = 40 µm); E- Detalhes da estrutura espicular destacando o “garfo” (g), a “calçadeira” (c) e a “lâmina” (l) (Barra = 40 µm)..... **47**

Figura 16 - Microscopia de Luz de *O. lanfrediae* macho e fêmea parasitos de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A- Visão lateral da região anterior, indicando o esôfago, o anel nervoso, o poro excretor e deirídios (Barra = 100 µm); B- Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 20 µm); C- Corte transversal na metade do corpo (Barra = 30 µm); D- Visão lateral da vulva da fêmea e do ovojector (Barra = 150 µm); E- Visão lateral da região posterior da fêmea, destacando o ânus e o espinho caudal (Barra = 100 µm); F- Região posterior do macho, destacando os espículos (Barra = 100 µm); G- Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 50 µm); H- Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 50 µm). **48**

Figura 17 – Imagens capturadas em Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. lanfrediae* fêmea parasito de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A- Região anterior, evidenciando a presença das aletas laterais (Barra = 50 µm); B- Detalhes da região cefálica, destacando a posição das papilas (setas) e anfídios (*) (Barra = 8 µm); C- Detalhes do deirídio (Barra = 5 µm); D- Detalhes da abertura da vulva (Barra = 20 µm); E- Visão geral da região posterior do corpo, evidenciando a abertura do ânus e o espinho caudal (seta) (Barra = 20 µm)..... **49**

Figura 18 – Imagens capturadas em Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. lanfrediae* macho parasito de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A-Visão lateral da região posterior do corpo, demonstrando o arranjo dos raios e a presença de papilas (*) na bolsa copuladora (Barra = 20 µm); F- Visão ventrolateral da região posterior, evidenciando o lobo dorsal da bolsa copuladora e o cone genital (Barra = 20 µm). **50**

Figura 19 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia belenensis* parasito de *R. marina*: A. Visão lateral da região anterior, indicando o poro excretor (pe) (Barra = 100 µm); B. Detalhes da vesícula cefálica (Barra = 20 µm); C. Detalhes das cristas longitudinais na superfície cuticular (setas) (Barra = 40 µm); D. Visão lateral da abertura vulva (v) e do ovojector (Barra = 100 µm); E. Visão lateral da região posterior, destacando o ânus (a) e o espinho caudal (seta) (Barra = 40 µm). **52**

Figura 20 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia belenensis* parasito de *R. marina*: A. Visão ventral da bolsa copuladora, mostrando o padrão de distribuição dos raios bursais (Barra = 40 µm); B. Visão ventral do espículo esquerdo, mostrando a divisão nos três ramos principais (Barra = 20 µm); C. Extremidade da lâmina espicular, demonstrando os processos distais (Barra = 10 µm)..... **53**

Figura 21 - Microscopia de Luz de *O. vittii* macho e fêmea parasito de *A. fuscauratus* da Flona de Caxiuanã: A. Visão lateral da região anterior (Barra = 100 µm); B. Corte transversal na altura do esôfago, demonstrando a presença de aletas laterais (Barra = 20 µm); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 µm); D. Visão ventral da abertura da vulva e do ovojector (Barra = 100 µm); E. Visão lateral da cauda da fêmea (Barra = 70 µm); F. Visão lateral da bolsa copuladora do macho

(Barra = 80 μ m); G. Visão ventral da bolsa copuladora (Barra = 80 μ m); H. Visão ventral dos espículos direito e esquerdo (Barra = 40 μ m). 56

Figura 22 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. vitti* fêmea parasito de *A. fuscuaauratus* da Flona de Caxiuanã: A. Detalhes da região anterior, indicando a presença de aleta lateral (seta) (Barra = 100 μ m); B. Detalhes do deirídio (Barra = 5 μ m); C. Poro excretor (Barra = 5 μ m); D. Detalhes da abertura da vulva (Barra = 5 μ m); E. Visão ventro-lateral da extremidade posterior, indicando a abertura do ânus (a) (Barra = 20 μ m); F. Detalhes do espinho cuticular na extremidade da cauda (Barra = 5 μ m). 57

Figura 23 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. vitti* macho parasito de *A. fuscuaauratus* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventrolateral da bolsa copuladora, indicando papilas bursais na extremidade dos raios 4 (setas) (Barra = 20 μ m); B. Visão lateral da bolsa copuladora, indicando papilas bursais nas extremidades dos raios 4 e 8 (Barra = 20 μ m); C. Detalhes da a papila zero (seta) na margem superior do cone genital (Barra = 5 μ m). 58

Figura 24 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 fêmea parasito de *P. vaillantii* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior do corpo, demonstrando o esôfago claviforme (Barra = 50 μ m); B. Detalhes da vesícula cefálica (Barra = 20 μ m); C. Cristas longitudinais na superfície cuticular (Barra = 50 μ m); D. Detalhes do poro excretor (pe) e do deirídio (d) (Barra = 20 μ m); E. Visão ventral da abertura da vulva (v) e do ovojector (Barra = 100 μ m); F. Visão lateral da extremidade posterior, indicando a abertura do ânus (a) e o espinho cuticular terminal (seta) (Barra = 40 μ m). 61

Figura 25 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 macho parasito de *P. vaillantii* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da bolsa copuladora, indicando a presença de papilas bursais (Barra = 40 μ m); B. Visão lateral da bolsa copuladora, demonstrando a distribuição dos raios bursais (Barra = 40 μ m); C. Detalhes do cone genital, destacando os raios sete (r7) e zero (rz) (Barra = 20 μ m); D. Visão do lobo dorsal destacando os raios 9 (r9) e 10 (r10) (Barra = 20 μ m); E. Visão ventral dos espículos, indicando a lâmina (l), garfo (g) e calçadeira (c) (Barra = 40 μ m). 62

Figura 26 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 fêmea parasito de *P. vaillantii* da Flona de Caxiuanã: A. Visão lateral da região anterior do corpo, indicando o esôfago, o anel nervoso, o poro excretor e deirídios (Barra = 50 μ m); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 30 μ m); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 μ m); D. Visão lateral da abertura vulva e do ovojector (Barra = 100 μ m); E. Visão lateral da região posterior, destacando o ânus e o espinho caudal (Barra = 50 μ m). 63

Figura 27 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 macho parasito de *P. vaillantii* da Flona de Caxiuanã: A- Região anterior, destacando o esôfago, o anel nervoso, o poro excretor e os deirídios (Barra = 75 μ m). B- Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 30 μ m). C- Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 μ m). D- Visão ventral da bolsa copuladora (Barra = 25 μ m). E- Cone genital (Barra = 5 μ m). F- Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 50 μ m). G- Visão ventral dos espículos direito e esquerdo (Barra = 40 μ m). H- Detalhes do espículo direito, demonstrando a divisão dos três ramos principais (Barra = 40 μ m). I- Detalhes do garfo, destacando as projeções secundárias (Barra = 5 μ m). J- Visão dorsal do espículo direito (Barra = 40 μ m). 64

Figura 28 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 2 fêmea parasito de *O. oophagus* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior, indicando o anel nervoso (an) (Barra = 100 µm); B. Detalhes da vesícula cefálica (Barra = 40 µm); C. Detalhes da superfície cuticular, destacando o poro excretor (pe) e o deirídio (seta) (Barra = 40 µm); D. Detalhes do sistema reprodutor feminino indicando a abertura da vulva (v) e o ovojector (Barra = 100 µm); E. Região posterior, indicando a abertura do o ânus (a) e o espinho cuticular terminal (seta) (Barra = 50 µm). **67**

Figura 29 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 2 macho parasito de *O. oophagus* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da bolsa copuladora (Barra = 40 µm); B. Visão ventral dos espículos dentro do corpo (Barra = 40 µm); C. Detalhes da estrutura do espículo direito, destacando o “garfo” (g), a “calçadeira” (c) e a “lâmina” (l) (Barra = 20 µm); D. Lâmina espicular isolada demonstrando as projeções na porção distal (Barra = 10 µm). **68**

Figura 30 – Árvore filogenética por critério de Máxima Verossimilhança (ML) de *Oswaldocruzia* baseada na região codificante da enzima Citocromo c Oxidase Subunidade I do DNA mitocondrial. **69**

Figura 31 - Árvore filogenética por Inferência Bayesiana (BI) de *Oswaldocruzia* baseada na região codificante da enzima Citocromo c Oxidase Subunidade I do DNA mitocondrial. **70**

RESUMO

Oswaldocruzia é um gênero de nematódeos parasitos de anfíbios (Anura, Caudata) e répteis (Squamata), representado por cerca de 90 espécies distribuídas mundialmente, das quais 43 ocorrem na região Neotropical. As espécies de *Oswaldocruzia* são caracterizadas principalmente pela morfologia espicular dos machos e são divididas em cinco grupos biogeográficos (Oriental-Etíope, Neo-etíope, Holártico, Neotropical Caribenho e Neotropical Continental) e, também, em três tipos morfológicos de bolsa copuladora (tipos I, II e III). Porém, a similaridade morfológica, a ausência de chaves de identificação atualizadas e de dados moleculares dificulta a sistemática do gênero. Assim, este estudo teve como objetivo, a realização da taxonomia integrada de nove espécies de *Oswaldocruzia* parasitos de oito espécies de anfíbios e uma espécie de réptil oriundos de diferentes coletas realizadas em três localidades no estado do Pará. Os hospedeiros foram necropsiados e os helmintos encontrados foram limpos, fixados e armazenados em etanol 70%. Para o estudo morfológico, os espécimes foram destinados à observação por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Para o estudo molecular, realizamos a extração, amplificação e sequenciamento da região codificadora da enzima Citocromo c Oxidase Subunidade I do DNA mitocondrial. As sequências resultantes foram alinhadas e comparadas com dez sequências disponíveis publicamente no GenBank e duas reconstruções filogenéticas foram realizadas para observar as relações de parentesco, uma sob o critério de Máxima Verossimilhança e outra por Inferência Bayesiana. Como resultados identificamos *Oswaldocruzia belenensis* em *Rhinella marina* e *Rhinella margaritifera*, *Oswaldocruzia chabaudi* em *Boana geographica* e *Boana wavrini*, *Oswaldocruzia chambrieri* em *Amazophrynella bokermanni* e *R. margaritifera*, *Oswaldocruzia lanfrediae* em *Leptodactylus paraensis*, *Oswaldocruzia vitti* em *Anolis fuscuauratus*, *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 em *Phyllomedusa vaillantii* e *Oswaldocruzia* sp. nov. 2 em *Osteocephalus oophagus*. O alinhamento e comparação dos níveis de divergência demonstraram diferenças significativas entre as novas sequências obtidas e as sequências do GenBank. Ambas as reconstruções filogenéticas demonstraram dois clados principais, um incluindo as sequências do México e outro clado geneticamente distinto da Amazônia, destacando a ocorrência de *O. chabaudi* em *B. wavrini* e *B. geographica*, a relação próxima entre as sequências de parasitos de Bufonidae e novas registros de hospedeiros e localidades para *O. chambrieri* e *O. belenensis*. Este estudo adiciona informações acerca da diversidade de helmintos parasitos de anfíbios e répteis da Amazônia, e demonstra que a combinação dos métodos morfológicos e moleculares apresentam potencial satisfatório para delimitação de espécies e caracterização do gênero.

Palavras-chave: Nemata; Helminologia; parasitos intestinais; anfíbios e répteis

ABSTRACT

Oswaldocruzia is a genus of parasitic nematodes of amphibians (Anura, Caudata) and reptiles (Squamata), represented by about 90 species distributed worldwide, of which 43 occur in the Neotropical region. The species of *Oswaldocruzia* are mainly characterized by the spicular morphology of the males and are divided into five biogeographic groups (Oriental-Ethiopian, Neo-Ethiopian, Holarctic, Neotropical Caribbean and Neotropical Continental) and also three morphological types of copulatory bursa (types I, II and III). However, morphological similarity, absence of updated identification keys and molecular data complicate the systematic of the genus. Thus, the objective of this study was the realization of the integrated taxonomy of nine species of *Oswaldocruzia* parasitizing eight species of amphibians and one reptile species from different collections in three locations in the state of Pará, Brazil. The hosts were necropsied and the helminths found were rinsed, fixed and stored in 70% ethanol. For the morphological study, the specimens were used for observation by light microscopy and scanning electron microscopy. For the molecular study, we performed the extraction, amplification and sequencing of the coding region of the Cytochrome c Oxidase Subunit I enzyme from the mitochondrial DNA. The resulting sequences were aligned and compared to ten sequences publicly available in GenBank and two phylogenetic reconstructions were performed to observe their relationships, one under the Maximum Likelihood criterion and the other by Bayesian Inference. As results we identified *Oswaldocruzia belenensis* in *Rhinella marina* and *Rhinella margaritifera*, *Oswaldocruzia chabaudi* in *Boana geographica* and *Boana wavrini*, *Oswaldocruzia chambrieri* in *Amazophrynella bokermanni* and *R. margaritifera*, *Oswaldocruzia lanfrediae* in *Leptodactylus paraensis*, *Oswaldocruzia vitti* in *Anolis fuscauratus*, *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 in *Phyllomedusa vaillantii* and *Oswaldocruzia* sp. nov. 2 in *Osteocephalus oophagus*. Alignment and comparison of levels of divergence demonstrated significant differences between the new obtained sequences and the sequences from GenBank. Both phylogenetic reconstructions demonstrated two main clades, one including the sequences from Mexico and another clade genetically distinct from the Amazon, highlighting the occurrence of *O. chabaudi* in *B. wavrini* and *B. geographica*, the close relationship between the sequences from parasites of Bufonidae and new records of hosts and localities for *O. chambrieri* and *O. belenensis*. This study adds information about the diversity of helminth parasites of amphibians and reptiles of Amazon, and shows that the combination of morphological and molecular methods presents satisfactory potential for species delimitation and characterization of the genus.

Keywords: Nemata; Helminthology; intestinal parasites; amphibians and reptiles

INTRODUÇÃO

Os organismos parasitários compõem uma importante fração da biomassa nos ecossistemas, são indicadores de integridade e estabilidade ambiental e representam bons modelos para estudos gerais de evolução. Entretanto, apenas uma pequena fração de sua diversidade no planeta têm sido identificada, e as relações filogenéticas entre as espécies ainda não são bem esclarecidas (Brooks e Hoberg 2001). Parasitos e demais patógenos desempenham um papel central nos ecossistemas, afetando a ecologia e evolução de seus hospedeiros, o crescimento populacional, além de desempenhar papel regulador da biodiversidade de comunidades (Brooks e Hoberg 2007).

A avaliação dos padrões de abundância dos parasitos em seus hospedeiros e do seu ciclo de transmissão é considerada ponto central no estudo da interação hospedeiro-parasito (Bonsall 2004). Adicionalmente, os parasitos fornecem informações valiosas para a história natural dos hospedeiros, sendo importantes indicadores dos hábitos alimentares e comportamentais do hospedeiro e da estrutura trófica nas comunidades (Brooks e Hoberg 2000). Entretanto, os parasitos ainda instigam pouco interesse da comunidade científica em geral, e foram negligenciados dos estudos pela maioria dos naturalistas ao longo do século passado.

Felizmente a situação vem mudando nas últimas décadas com o estabelecimento de várias pontes entre a parasitologia e a ecologia de comunidades (Poulin 1999). Assim, do ponto de vista ecológico, as pesquisas sobre parasitos se concentraram em dois níveis distintos: Primeiro, demonstrando o papel que os parasitos têm na estruturação das comunidades através de efeitos diferenciais nos hospedeiros, ou causando a debilitação de espécies chaves na estruturação da comunidade ou alterando indiretamente o fenótipo das mesmas, mudando sua importância ecológica. Segundo, demonstrando a importância dos parasitos na modelagem das próprias comunidades parasitárias, através da competição entre diferentes espécies e consequente redução da abundância parasitária; tornando um hospedeiro mais ou menos suscetível à infecção de outras espécies de parasitos; ou se fazendo presentes simultaneamente em diferentes níveis da comunidade, com ciclos que podem incluir hospedeiros intermediários e até mesmo fases de vida livre (Poulin 1999).

Desta forma, enfatiza-se a importância de estudos sobre helmintos parasitos da fauna amazônica, pois, quando uma espécie de vertebrado é ameaçada de extinção, sua infracomunidade também estará sob ameaça.

Tradicionalmente, a identificação das espécies de nematódeos é baseada em uma minuciosa mensuração e comparação de caracteres morfológicos. Frequentemente, a diferenciação entre algumas espécies é baseada em valores médios de uma população de indivíduos, o que acaba sendo dificultado quando as populações apresentam espécies estreitamente relacionadas ou que apresentam baixa prevalência relativa, dificultando a obtenção de um número suficientemente alto de espécimes

para uma análise mais robusta da variação morfológica (Powers 2004).

Frente ao grande número de espécies a serem descritas e os problemas na sistemática em geral, o diagnóstico molecular tem se tornado uma alternativa promissora de identificação rápida e acurada de espécies animais (Hajibabaei et al. 2007; Siddall et al. 2012). O *DNA Barcoding* ou "*códigos de barra de DNA*" consiste em um sistema universal de identificação biológica a partir de sequências de regiões específicas do DNA. Hebert et al. (2003) propuseram este método como uma adaptação do sistema de código de barras utilizados para produtos do mercado varejista, no qual são utilizadas 11 posições onde os números de 0 a 9 podem ser alternados em diferentes combinações, gerando cerca de 100 bilhões de identificadores numéricos únicos. No caso do DNA, cada par de base (pb) seria uma posição com quatro possibilidades de nucleotídeos (Adenina, Citosina, Guanina e Timina). Uma combinação de apenas 15 pb, gera cerca de um bilhão de códigos únicos, um número muito maior que o de espécies conhecidas. Como as sequências obtidas são muito maiores que 15 pb, seria possível identificar cada espécie através de uma única sequência de DNA.

O surgimento de novas tecnologias e a redução gradual dos custos de extração, amplificação e sequenciamento de DNA, em conjunto com o aumento da capacidade computacional de processamento de dados, têm popularizado o uso das ferramentas moleculares e o *DNA barcode* vem sendo mais utilizado tanto para a sistemática quanto para a ecologia, auxiliando as estratégias de conservação (Hebert e Gregory 2005).

Ao escolher quais segmentos do DNA devem ser incluídos na análise molecular, deve-se levar em consideração que tanto a diversidade quanto o grau de conservação da sequência são muito relevantes para os taxa. A diversidade de uma determinada sequência é necessária para o reconhecimento de distinções interespecíficas, assim como o grau de conservação do segmento deve ser levado em conta para a construção de *Primers* universais e no alinhamento das sequências dos diferentes taxa (Floyd et al. 2002). Desta forma, muitos marcadores do DNA Mitocondrial têm sido utilizados em estudos filogenéticos e *barcoding* de nematódeos (Fig. 1), principalmente pela ausência de íntrons, menor exposição à recombinação, hereditariedade haploide e um bom nível de conservação apesar da taxa de mutação relativamente elevada, resultando em variação molecular significativa entre as espécies e uma variação comparativamente menor dentro das espécies (Hyman 1988; Saccone et al. 1999; Elsasser et al. 2009).

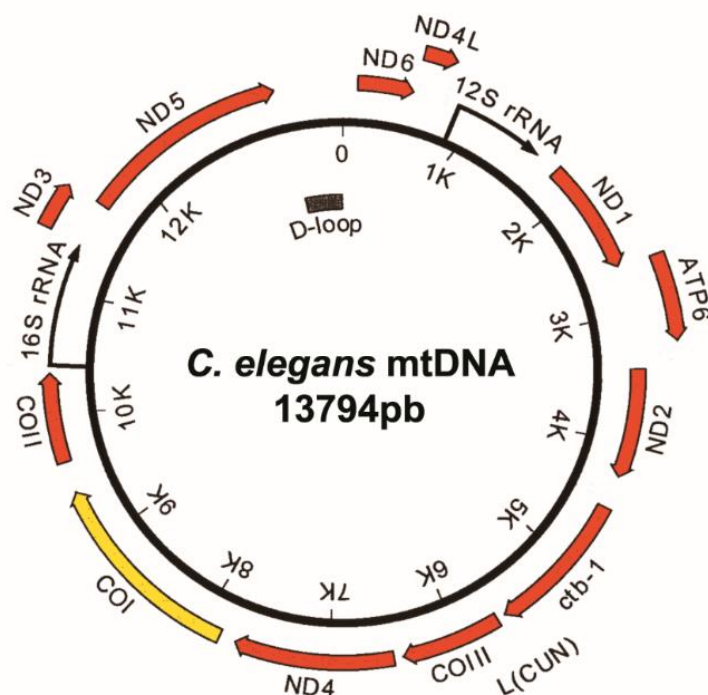


Figura 1 - Estrutura do DNA mitocondrial de *Caenorhabditis elegans*, demonstrando a posição relativa dos genes para 12 proteínas (Setas vermelhas) com destaque para a região codificadora da enzima Citocromo c Oxidase I (Seta amarela) e dois rRNAs (setas negras) de acordo com Lemire (2005).

Dentre os marcadores genéticos mais comuns para a identificação molecular de nematódeos, o gene para o RNA da Subunidade Ribossomal Pequena (SSU) foi o primeiro utilizado na tentativa de desenvolver um sistema de classificação, sendo representado pela região 18S rRNA, porém com grandes dificuldades no delineamento de muitas espécies e pouca resolução de aspectos morfológicos importantes uma vez que este gene parece evoluir muito lentamente (Blaxter et al. 1998).

O gene para o RNA da Subunidade Ribossomal Grande (LSU) foi o segundo marcador utilizado para nematódeos, porém não apresenta sinal filogenético suficiente para resolver as relações no nível específico (De Ley et al. 2005; Subbotin et al. 2008). A região do Espaçador Interno Transcrito (ITS) é altamente divergente e de difícil alinhamento entre taxa muito díspares, o que impede seu uso como um marcador universal para Filo Nemata. Além disso, as variações moleculares observadas em nível específico têm demonstrado este segmento como um marcador mais adequado para a identificação de espécies do que para análises filogenéticas de taxa mais abrangentes (Floyd et al. 2002; De Ley et al. 2005).

Por fim, a região Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) que é traduzida em uma proteína evolutivamente conservada sendo, então, um marcador eficiente e abrangente para sistemas de identificação de muitos grupos de metazoários, assim como para o Filo Nemata, e amplamente utilizada em trabalhos filogenéticos e de *barcoding* (Prosser et al. 2013; Palomares-Rius et al. 2017).

Assim, ao considerar a relevância dos genes para a identificação de nematódeos, torna-se evidente que as análises moleculares não estão livres de inconsistências. Adicionalmente, uma das grandes críticas ao DNA *barcoding* está no fato de se tratar de uma abordagem fenética e não-cladística, onde se mede a distância genética através da similaridade das sequências para separar as espécies, com poucas definições gerais que as expliquem. Assim, têm sido sugeridas abordagens integrativas, com o uso combinado de dados de múltiplas fontes, morfológicas, moleculares e ecológicas para a identificação e definição das espécies de forma eficiente e mais abrangente (Ferri et al. 2009; Di Azevedo et al. 2017).

Dentre os helmintos endoparasitos de vertebrados em geral, o Filo Nemata é o mais abundante. Ben Slimane et al. (1996) estudaram vários gêneros de nematódeos parasitos em anfíbios e répteis dentre os Trichostrongylina, definindo como caracteres de maior importância a disposição dos raios bursais caudais, pela morfologia do sinlofe (em cortes transversais na junção esôfago-intestino e no meio do corpo) e pela morfologia dos espículos. Os autores classificaram então as espécies em um grupo de espécies "reliquia" caracterizado pela presença de seis lábios e cápsula bucal bem desenvolvida, condições estas consideradas plesiomórficas, um grupo de espécies "antigas" caracterizadas pela perda da cápsula bucal, porém mantendo ainda caracteres plesiomórficos como o gubernaculum e a corona radiata e por fim um grupo "moderno", composto pelas espécies de *Oswaldocruzia* e caracterizado pela ausência do gubernáculo e da corona radiata.

Dos gêneros de nematódeos parasitos conhecidos para anfíbios e répteis, *Oswaldocruzia* Travassos, 1917 é um dos mais representativos, ocorrendo em diferentes famílias de hospedeiros. Estes helmintos pertencem à Ordem Rhabditida, Subordem Strongylida, caracterizada pela presença da bolsa copuladora nos machos, uma estrutura cuticular sustentada por raios musculares; Superfamília Trichostrongyloidea, caracterizada pela presença das cristas longitudinais compondo o sinlofe e a vesícula cefálica e Família Molineidae cuja diagnose consiste na ausência de anel bucal, padrão de sinlofe e padrão de bolsa com raios seguindo o padrão 2-1-2 (Vicente et al. 1991).

O gênero inclui aproximadamente 90 espécies que são distribuídas mundialmente (Svitin e Kuzmin 2012), sendo 43 espécies ocorrentes na região Neotropical entre as quais 14 espécies ocorrem na América do Sul e oito são relatadas parasitando anfíbios e répteis no Brasil (Guerrero 2013; Campião et al. 2014).

Dentre as características morfológicas representativas para o gênero, Vicente et al. (1991) e Anderson et al. (2009) destacam: a presença de vesícula cefálica com porção anterior mais dilatada e inferior mais estreita, cutícula com finas estriações transversais e com cristas longitudinais percorrendo paralelamente umas às outras por toda a extensão do corpo dos nematódeos. Nas fêmeas a vulva é situada na metade posterior do corpo e o aparelho genital é didelfo (com dois ovários) e anfidelfo (com cada ovário voltado para uma extremidade do corpo) e cauda cônica simples

terminando em um espinho cuticular. Nos machos, destaca-se a ausência do gubernáculo e os espículos robustos divididos em calçadeira, garfo e lâmina, envolvidos por uma membrana hialina.

As espécies do gênero são divididas em cinco grupos, caracterizados pela morfologia dos espículos e distribuição biogeográfica (Fig. 2), sendo estes: Oriente-Etíope, com espículos não-idiomorfos terminando em duas ou três pontas distais (Fig. 3A); Neo-etíope, com espículos não-idiomorfos e três pontas principais, das quais e pelo menos duas são bifurcadas (Fig. 3B); Holártico, com espículos idiomorfos e bifurcação do garfo no terço mediano, correspondendo a mais que 30% de seu comprimento total (Fig. 3C); Neotropical Caribenho, com espículos idiomorfos e bifurcação do garfo no terço distal, correspondendo a menos que 30% de seu comprimento total (Fig. 3D) e Neotropical Caribenho, com espículos idiomórficos apresentando todos os três ramos divididos em numerosas projeções distais (Fig. 3E) (Ben Slimane et al. 1996).

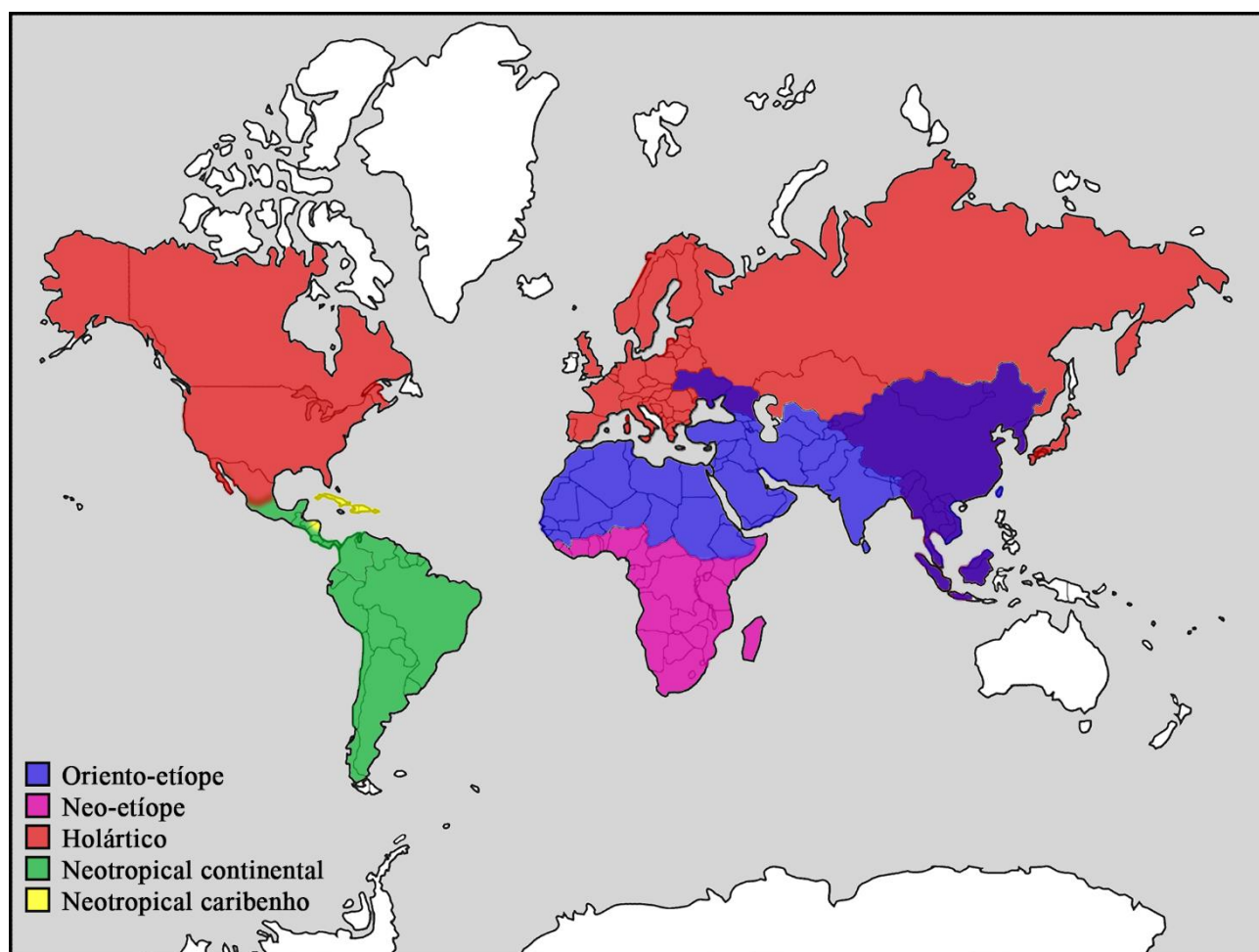


Figura 2 – Distribuição biogeográfica de *Oswaldocruzia* com base na morfologia do espículo: Oriente-etíope (azul); Neo-etíope (roxo); Holártico (vermelho); Neotropical Caribenho (amarelo); Neotropical Continental (verde). Adaptado a partir das informações de Ben Slimane et al. (1996).

Dentro de cada grupo, há um grande número de espécies que são morfologicamente muito semelhantes, cuja sistemática em nível específico é difícil (Ben Slimane et al. 1993). O estudo da

morfologia do sinlofe, da bolsa copuladora e dos espículos dos machos fornecem os caracteres morfológicos mais importantes para a diagnose específica destes helmintos (Ben Slimane et al. 1996). Porém, ocasionalmente há sobreposição destes caracteres, sendo a análise morfométrica utilizada como alternativa para a diagnose nestes casos, o que é um problema visto a variabilidade intraespecífica de caracteres morfológicos e morfométricos para estes nematódeos (Bursey et al. 2007; Bursey e Goldberg 2005; Santos et al. 2008; Guerrero 2013).

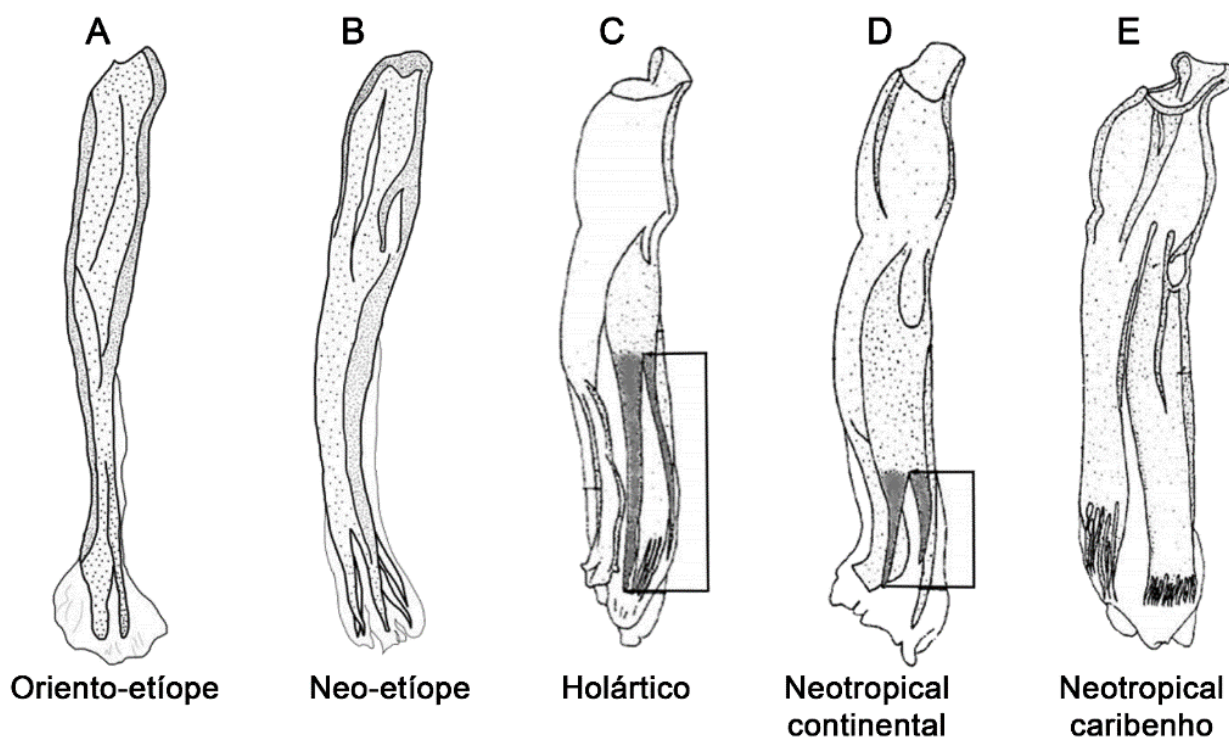


Figura 3 – Caracterização morfológica dos espículos das divisões biogeográficas de *Oswaldocruzia*: A. Oriento-etíope (não-idiomorfo); B. Neo-etíope (não-idiomorfo); C. Holártico (idiomorfo, com bifurcação do garfo no terço mediano); D. Neotropical Continental (idiomorfo, com bifurcação do garfo no terço distal); E. Neotropical Caribenho (idiomorfo, com todos os ramos subdivididos em pequenas projeções). Adaptado a partir das informações de Ben Slimane et al. (1996).

Ben Slimane et al. (1996) também classificam as bolsas copuladoras das espécies do gênero em três tipos morfológicos, baseando-se na origem e disposição relativa dos raios 6 e 8. A bolsa copuladora do Tipo I é considerada a mais primitiva, com o raio oito originando-se dorsalmente em um ramo independente do raio seis e permanecendo sem contato com este em toda sua extensão (Fig. 4A). Na bolsa copuladora de Tipo II, o raio oito nasce livremente na região dorsal, porém, em sua parte mediana sofre sobreposição do raio seis (Fig. 4B). Por fim, na bolsa copuladora do Tipo III, o raio oito pode surgir ou no mesmo ramo (Fig. 4Ca) ou em um ramo independente do raio seis (Fig. 4Cb), sofrendo sobreposição do mesmo em quase toda sua extensão, exceto na porção distal.

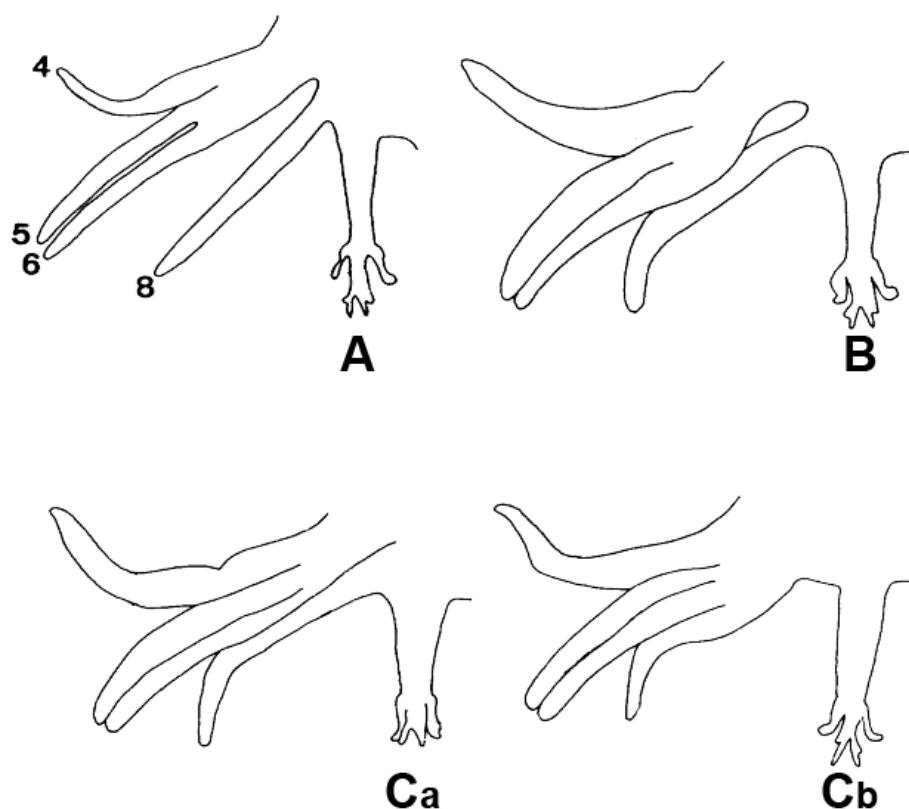


Figura 4 - Tipos de bolsas copuladoras de acordo com a disposição relativa dos raios bursais: A. Tipo I - Raio 8 nascendo em ramo independente e sem contato com o raio 6 por toda sua extensão; B. Tipo II - Raio 8 nascendo em ramo independente e sobrepondo-se ao raio 6 na parte mediana; Ca. Tipo III A - Raio 8 surgindo em ramo independente, porém sobrepondo-se ao raio 6 por quase toda sua extensão, exceto na parte distal; Cb. Tipo III B - Raio 8 surgindo no mesmo ramo do raio 6 e sobrepondo-se ao mesmo por quase toda sua extensão, exceto na parte distal (Ben Slimane et al. 1996).

Além da similaridade morfológica, não existem chaves de identificação recentes e atualizadas para as espécies do gênero *Oswaldocruzia*, visto que a única chave de identificação para o gênero foi proposta por Ben Slimane et al. (1996) constando apenas 29 das 43 espécies reconhecidas atualmente na Região Neotropical. Adicionalmente, estão disponíveis no GenBank apenas 18 sequências de *Oswaldocruzia*, das quais sete pertencem à *Oswaldocruzia filiformis* (Goeze, 1782) parasitos de *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) (Amphibia, Caudata) da Alemanha, nove de uma espécie não identificada parasito de *Trachycephalus typhonius* (Linnaeus, 1758) (Anura, Hylidae) do México, uma de outra espécie também não identificada parasito de *Anaxyrus americanus* (Holbrook, 1836) (Anura, Bufonidae) dos Estados Unidos e uma sequência *Oswaldocruzia chambrieri* Ben Slimane and Durette-Desset, 1993 parasito de *Rhinella margaritifera* (Laurenti, 1768) da Floresta Nacional de Caxiuanã (Flona Caxiuanã), sendo a única sequência disponível para a região Neotropical com diagnose específica. Por fim, não existem trabalhos filogenéticos que confirmem a validade tanto dos agrupamentos biogeográficos e morfológicos quanto as relações de parentesco entre as espécies do gênero.

O principal objetivo deste trabalho é a realização da Taxonomia integrativa de nove espécies de nematódeos do gênero *Oswaldocruzia* parasitos de anfíbios e répteis da Amazônia Oriental. Como objetivos específicos pretendeu-se definir morfologicamente cada espécie de *Oswaldocruzia* utilizada no estudo; inferir parâmetros de infecção a partir dos dados de prevalência, intensidade de infecção e abundância média das espécies; obter as sequências gênicas da região codificante da enzima Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) do DNA mitocondrial para as espécies do presente estudo; realizar a comparação molecular e filogenética das novas sequências de COI obtidas com as sequências disponíveis no banco de dados do GenBank para observar as relações de parentesco entre as mesmas; integrar os dados morfológicos, morfométricos, merísticos e moleculares em redescrições de espécies já definidas e descrever novas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DE HOSPEDEIROS E AMOSTRAS DE PARASITOS

Utilizamos espécimes de *Oswaldocruzia* provenientes de diferentes espécies de anfíbios e répteis hospedeiros. Parte do material é oriunda de diferentes coletas realizadas no Estado do Pará, no município de Melgaço (Floresta Nacional de Caxiuanã - 1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W). Também estão sendo utilizados parasitos provenientes de espécimes de *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) coletados em Salvaterra (Praia Grande - 0°45'52.1"S, 48°30'43.3"W) e nos arredores do Instituto de Ciências Biológicas, no Campus Básico da Universidade Federal do Pará, no município de Belém (1°28'23.6"S 48°27'29.3"W). Todo material coletado foi armazenado no banco de amostras do Laboratório de Biologia Celular e Helmintologia “Prof.^a Dr^a. Reinalda Marisa Lanfredi” (LBCH) (Fig. 5).

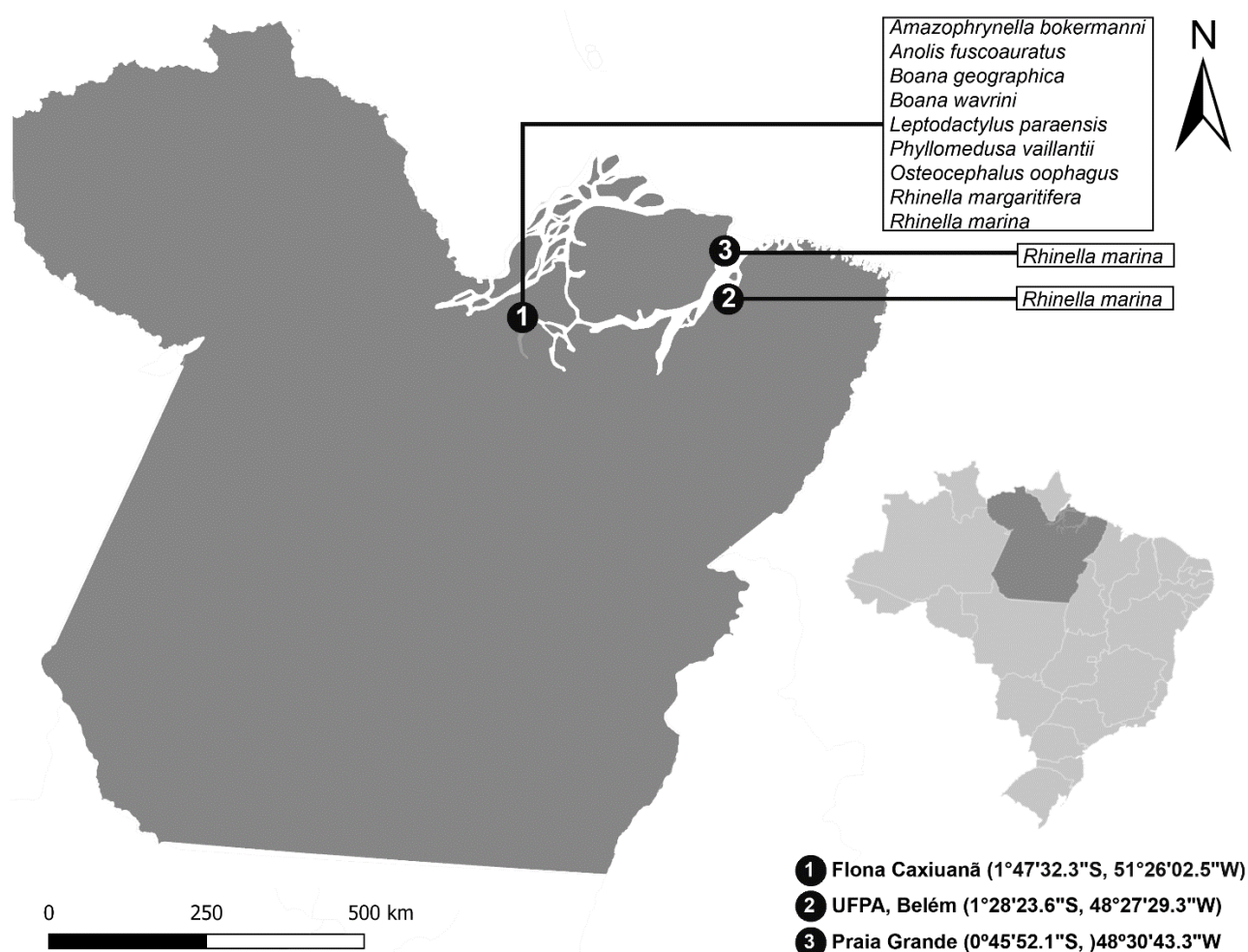


Figura 5 – Localização dos pontos de coleta dos hospedeiros utilizados no presente estudo. 1. Estação Científica Ferreira Penna na Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço; 2. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém; 3. Praia Grande, Salvaterra, Ilha do Marajó.

Os espécimes de anfíbios e répteis foram coletados por busca ativa manualmente, anestesiados através de injeção de 1 mL de lidocaína, pesados e necropsiados de acordo com o protocolo e as normas específicas indicadas para o uso de animais em pesquisa disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Durante a necropsia todos os órgãos internos foram retirados, os segmentos do sistema digestivo foram isolados e colocados em placas de Petri, individualizadas, contendo solução tampão fosfato salino a p.H 7,4 (PBS). Posteriormente todos os órgãos foram analisados em estereomicroscópio ZEISS para a busca de helmintos. Os parasitos encontrados foram coletados, separados em placas de Petri, limpos com auxílio de pincéis, lavados em solução tampão fosfato salino (PBS) p.H 7,4 e fixados em solução de etanol a 70% aquecido a 60°C para a realização do estudo morfológico. Alguns exemplares foram transferidos para Etanol 100% e armazenados em freezer a -20°C para conservação do material genético a ser utilizado em biologia molecular. Dados referentes ao hospedeiro, assim como número de helmintos encontrados e a localização destes, foram registrados em uma ficha de necropsia apropriada, criada para o laboratório.

Todos os hospedeiros utilizados no presente estudo estão depositados provisoriamente na coleção do Museu de Zoologia da UFPA. Em Breve serão encaminhados para tombamento definitivo na Coleção de Herpetologia do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG).

Adicionalmente, para cumprir os regulamentos estabelecidos no artigo 8.5 da versão de 2012 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN 2012), informações acerca das novas espécies serão submetidos ao ZooBank, através do código identificador do *Life Science Identifier* (LSID).

MICROSCOPIA DE LUZ

Alguns helmintos fixados foram utilizados em análise direta ao microscópio de luz. Após a fixação, alguns dos exemplares passaram por uma série etanólica crescente, até o etanol 100%. Após a desidratação, o material foi clarificado em Lactofenol de Amann® para a montagem de lâminas temporárias e posterior análise em microscópio de luz. Por fim, após o estudo morfológicos, os espécimes foram armazenados em etanol 70% no banco de amostras do Laboratório de Biologia Celular e Helmentologia “*Profa. Dra. Reinalda Marisa Lanfredi*” (LBCH) - Campus UFPA - Belém.

Para a análise morfológica e a identificação dos caracteres taxonômicos utilizamos o microscópio Olympus BX 41 equipado com câmara clara (sem ajuste de Zoom), no qual realizamos a confecção de desenhos em profundidade dos exemplares. As fotomicrografias foram realizadas em microscópio Olympus BX53 equipado com sistema de captura de imagem e software de análise *Cell Sens Standard*.

TAXONOMIA

Para a identificação dos helmintos utilizamos catálogos como os de Campiao et al. (2014), as chaves de identificação supragenéricas como as de Anderson et al. (2009), a chave de identificação para as espécies do gênero de Ben Slimane et al. (1996) assim como os artigos científicos com as descrições originais. As estruturas de caráter taxonômico foram analisadas e as mensurações conduzidas através dos desenhos feitos em câmara clara e as fotomicrografias obtidas seguindo caracteres estabelecidos por Ben Slimane et al. 1993; Bursey et al. 2007; Bursey e Goldberg 2005; Santos et al. 2008; Guerrero 2013 e . Os dados morfológicos, morfométricos e merísticos utilizados para o gênero estão indicados abaixo.

1. Comprimento total (Distância total entre as extremidades anterior e posterior)
2. Comprimento da vesícula cefálica (Distância do ápice até a base da vesícula cefálica)
3. Número de cristas longitudinais no nível do esôfago (Número de cristas em corte transversal)
4. Número de cristas longitudinais no meio do corpo (Número de cristas em corte transversal)
5. Largura na metade do corpo
6. Comprimento do esôfago (Distância da extremidade apical do esôfago até sua base)
7. Anel nervoso (Distância até a extremidade anterior do esôfago)
8. Deirídios (Distância até a extremidade anterior do esôfago)
9. Poro excretor (Distância até a extremidade anterior do esôfago)
10. Razão poro excretor/esôfago (Divide-se a distância do poro excretor até a extremidade anterior pelo comprimento do esôfago)
11. Distribuição dos raios na bolsa copuladora (Observação da origem e posição relativa dos raios 6 e 8)
12. Tamanho dos espículos (Comprimento total dos mesmos)
13. Divisão do garfo (Cálculo da proporção da divisão do garfo em relação ao tamanho do espículo)
14. Número de projeções distais na lâmina espicular
15. Posição da vulva (Distância até a extremidade anterior do corpo)
16. Oojector (Comprimento total do aparelho genital feminino com exceção dos ovários)
17. Esfíncteres (Comprimento total dos mesmos)
18. Infundíbulos (Comprimento total dos mesmos)
19. Vagina vera (comprimento da mesma)
20. Abertura do ânus ou Tamanho da Cauda (Mede-se sua distância até a extremidade posterior do corpo)
21. Espinho terminal (Comprimento total do mesmo)
22. Dimensões dos ovos (Comprimento e largura dos mesmos)

Dentre os espécimes deste estudo, após as identificações taxonômicas, foram depositados *Oswaldocruzia lanfrediae* Larrat, Melo, Furo, Willkens and Santos, 2018 parasitos de *Leptodactylus paraensis* Heyer, 2005 com o holótipo MPEG 191, o alótipo MPEG 192 e sete parátipos MPEG 193–194 e *O. chambrieri* com os vouchers MPEG NEM 66-67 na coleção invertebrados do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Belém, Pará. Também foram depositados vouchers de *O. chambrieri* CHIOC 38717 (25 machos e 37 fêmeas), *O. chabaudi* CHIOC 38718 (7 machos e 8 fêmeas) e *O. vitti* CHIOC 38719 (7 machos e 17 fêmeas) na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC – Fiocruz), Rio de Janeiro.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a observação de aspectos da ultraestrutura, destinamos alguns espécimes a análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram pós-fixadas em uma solução de Tetróxido de Ósmio a 1%, desidratadas em série etanólica crescente (etanol 70 % a etanol 100%) até o ponto crítico do gás carbônico (CO₂) para desidratação total. Posteriormente, os nematódeos foram montados em stubs metálicos de alumínio, cobertos com uma camada de 5Å de ouro/paládio e observadas em microscópio eletrônico Vega 3 (TESCAN), ajustado à potência de 10 kV, do Laboratório de Embriologia e Histologia Animal (LHEA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Pará, Belém sob coordenação da Dr^a. Elane Guerreiro Giese.

ESTUDO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os helmintos destinados à análises por biologia molecular, após fixados foram transferidos para etanol absoluto e conservados em freezer -70°C. Estas amostras foram submetidas à extração do DNA total utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Cat No.: 51304), QIAGEN ® seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Utilizamos a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar a região codificante da enzima Citocromo c Oxidase Subunidade I do DNA mitocondrial, de acordo com a metodologia e o coquetel de *primers* propostos por Prosser et al. (2013). Observamos os produtos da PCR em eletroforese em gel de agarose e os fragmentos de DNA amplificados com sucesso foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (Cat No.: 28104), QIAGEN ® de acordo com os protocolos do fabricante, e sequenciados em ciclo com o BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Cat No.: 4337455), Applied Biosystems™.

Estes procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios no Instituto Oswaldo Cruz (LABPMR/IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil. O sequenciamento foi conduzido utilizando o 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems™ na plataforma de sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (RPT01A/PDTIS/FIOCRUZ). Os segmentos resultantes foram montados em uma sequência contígua

editada manualmente para a correção de erros e ambiguidades com o programa Geneious 9.1.8 suite (<https://www.geneious.com>).

Comparamos as sequências obtidas com 10 sequências de COI de *Oswaldocruzia* disponíveis publicamente no GenBank. Construímos uma matriz comparativa incluindo nossas novas sequências, uma sequência de *Oswaldocruzia chambrieri* parasito de *Rhinella margaritifera* da Flona de Caxiuanã (número de acesso KU980934), quatro sequências de *Oswaldocruzia* sp. parasito de *T. typhonius* do México (KC130687, KC130698, KC130704 e KC130713), cinco sequências de *Oswaldocruzia* sp. parasito de *Smilisca baudinii* (Duméril and Bibron, 1841) do México (KC130711, KC130712, KC130714, KC130715 e KC130716).

Considerando a ausência de sequências de COI disponíveis para a Família Molineidae, utilizamos também a nova sequência de *Kentropyxia hylae* Feitosa, Furtado, Santos and Melo, 2015 (MK492922), um nematódeo da Família Molineidae parasito de *Osteocephalus taurinus* Steindachner, 1862 (Anura, Hylidae) da Floresta Nacional de Caxiuanã, devido a presença de caracteres plesiomórficos como a corona radiata para definição do grupo externo para os enraizamentos das análises filogenéticas.

Alinhamos as sequências do banco de dados utilizando os parâmetros padrão do programa MUSCLE (Edgar 2004) no software MEGA X. As sequências alinhadas foram trimadas nas extremidades com problemas de alinhamento no pacote Mesquite (Maddison e Maddison 2018). A tradução de aminoácidos foi usada para confirmar as posições do quadro de leitura e encontrar códons de parada inesperados. Para comparações de nucleotídeos pareados, o nível de divergência genética foi calculado (distâncias p) usando o software MEGA X (Kumar et al. 2018).

Realizamos uma reconstrução filogenética utilizando a Máxima Verossimilhança (ML) como critérios de otimização no programa PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010). Modelo evolucionário de nucleotídeos mais adequado foi escolhido pelo critério de informação Akaike (*Akaike Information Criterion* - AIC) com o programa JModelTest (Posada 2008). Determinamos o suporte de nós por teste de razão de verossimilhança aproximada para ramificações, o suporte não-paramétrico de ramificação foi baseado em *Shimodaira-Hasegawa-like* (aLRT SH-like) (Anisimova e Gascuel 2006); e por porcentagens não paramétricas de *bootstrap* (ML-BP) após 1000 pseudoreplicações.

Conduzimos outra análise filogenética por Inferência Bayesiana (BI) utilizando o MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al. 2012). Para levar em conta os diferentes processos evolutivos em cada uma das três posições dos códons, análises de BI foram realizadas com modelos distintos por posição de códon escolhidos pelo Critério de Informação Bayesiano (*Bayesian Information Criterion* - BIC) no programa PAUP* versão 4.0a147 (Swofford 2002). Realizamos amostragens por Cadeias Markovianas Monte Carlo (MCMC) para 10,000,000 gerações em quatro cadeias simultâneas em duas execuções. O suporte dos nós foi determinado por probabilidades Bayesianas *a posteriori* (BPP)

calculadas a partir de amostras de árvores a cada 100 gerações, após a remoção de uma fração de "burn-in" de 25%. A robustez de nossa amostragem foi avaliada usando o software Tracer v1.7.1 (Rambaut et al. 2018) para calcular os Tamanhos Efetivos da Amostra (*Effective Sample Sizes* - ESS) dos parâmetros. Valores acima de 100 de amostras efetivamente independentes foram considerados suficientemente amostrados. Ambas as árvores ML e BI foram visualizadas e editadas usando o FigTree v. 1.4.1 (Rambaut 2018).

RESULTADOS

Obtivemos um total de 393 espécimes de *Oswaldocruzia* em 126 hospedeiros analisados de oito espécies de anfíbios e uma espécie de réptil. Sete espécies de nematódeos foram identificadas, *Oswaldocruzia belenensis* em *R. margaritifera* e *R. marina*, *O. chambrieri* em *R. margaritifera* e *Amazophrynella bokermanni* (Izecksohn, 1994); *Oswaldocruzia chabaudi* Ben Slimane and Durette-Desset, 1996 em *Boana geographica* (Spix, 1824) e *Boana wavrini* (Parker, 1936); *O. lanfrediae* em *L. paraensis*; *Oswaldocruzia vitti* Bursey and Goldberg, 2004 em *Anolis fuscuauratus* D'Orbigny, 1837; *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 em *Phyllomedusa vaillantii* Boulenger, 1882; *Oswaldocruzia* sp. nov. 2 em *Osteocephalus oophagus* Jungfer and Schiesari, 1995, (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies hospedeiras, número de espécimes coletas pelo número de indivíduos parasitados, número de parasitos encontrados e localidade dos nematódeos de *Oswaldocruzia* parasitos intestinais de anfíbios e répteis da Amazônia Oriental, utilizados no presente estudo.

Espécie hospedeira	Coletados/ parasitados	Nº de parasitos encontrados	Nematódeo	Localidade
<i>A. bokermanni</i>	9/8	28	<i>Oswaldocruzia chambrieri</i>	Flona Caxiuanã
<i>B. geographica</i>	18/7	22	<i>Oswaldocruzia chabaudi</i>	Flona Caxiuanã
<i>B. wavrini</i>	3/3	11	<i>Oswaldocruzia chabaudi</i>	Flona Caxiuanã
<i>L. paraensis</i>	9/6	31	<i>Oswaldocruzia lanfrediae</i>	Flona Caxiuanã
<i>A. fuscuauratus</i>	17/14	54	<i>Oswaldocruzia vitti</i>	Flona Caxiuanã
<i>P. vaillantii</i>	18/16	35	<i>Oswaldocruzia</i> sp. nov. 1	Flona Caxiuanã
<i>O. oophagus</i>	8/7	23	<i>Oswaldocruzia</i> sp. nov. 2	Flona Caxiuanã
<i>R. margaritifera</i>	26/15	64	<i>Oswaldocruzia chambrieri</i>	Flona Caxiuanã
<i>R. margaritifera</i>	26/7	18	<i>Oswaldocruzia belenensis</i>	Flona Caxiuanã
<i>R. marina</i>	5/5	42	<i>Oswaldocruzia belenensis</i>	UFPA
<i>R. marina</i>	10/9	53	<i>Oswaldocruzia belenensis</i>	Flona Caxiuanã
<i>R. marina</i>	3/1	12	<i>Oswaldocruzia belenensis</i>	Praia Grande

Os nematódeos intestinais encontrados nos hospedeiros aqui citados podem ser classificados na Subordem Strongylida pela presença da bolsa copuladora nos machos, uma estrutura cuticular sustentada por raios musculares. Superfamília Trichostrongyloidea, pela presença das cristas longitudinais compondo o sinlofe e a vesícula cefálica. Família Molineidae pela ausência de anel bucal, sinlofe sem padrão de angulação com cristas longitudinais perpendiculares à parede do corpo e distribuição dos raios musculares da bolsa copuladora seguindo o padrão 2-1-2 baseando-se em (Vicente et al. 1991).

Em relação às demais características morfológicas observadas, destacam-se a divisão da vesícula cefálica em uma porção anterior mais dilatada e uma inferior mais estreita com finas estriações transversais, cristas longitudinais percorrendo paralelamente umas às outras pela extensão do corpo do nematódeo. Fêmeas com vulva situada na metade posterior do corpo e com o aparelho genital didelfo (com dois ovários) e anfidelfo (cada ovário voltado para uma extremidade do corpo) e cauda terminando com um espinho cuticular. Nos machos, observa-se a ausência de gubernáculo, espículos robustos e complexos, envoltos por uma membrana hialina (Vicente et al. 1991; Anderson et al. 2009). Esses caracteres nos permitiram classificar os nematódeos deste estudo no gênero *Oswaldocruzia*.

Dentre os nematódeos parasitos das nove espécies de anuros hospedeiros do presente estudo, identificamos sete espécies de *Oswaldocruzia*. Destas, duas representam novas espécies morfológicamente distintas e cinco são espécies já descritas, porém representando novos registros geográficos e/ou de novos hospedeiros para as mesmas.

O sequenciamento molecular resultou em sete sequências da região codificadora de COI do DNA mitocondrial: quatro sequências de *O. belenensis* parasitos de *R. marina* (números de acesso MK492916 e MK492917) e *R. margaritifera* (números de acesso MK492915 e MK492918), duas sequências de *O. chabaudi*, de *B. wavrini* (número de acesso MK492919) e *B. geographica* (número de acesso MK492920), uma sequência de *O. chambrieri* parasito de *A. bokermanni* (número de acesso MK492921). Para *Oswaldocruzia* parasitos de *A. fuscauratus*, *L. paraensis*, *O. oophagus* e *P. vaillantii* ainda não foi possível obter sequências de DNA, tanto os resultados da PCR quanto as observações em eletroforese em gel de agarose tiveram resultados negativos.

As descrições morfológicas dos espécimes deste estudo com as respectivas informações acerca dos hospedeiros, sítios de infecção e localidades são apresentadas a seguir, assim como os respectivos identificadores das sequências moleculares obtidas, dos depósitos em coleções e de registro no Zoobank.

***Oswaldocruzia chambrieri* Ben Slimane and Durette-Desset, 1993**

Hospedeiro: *Rhinella margaritifera* e *Amazophrynella bokermanni*

Sítio de Infecção: Intestino delgado

Localidade: Floresta Nacional de Caxiuana (1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W)

Número de acesso no GenBank: KU980934 (*R. margaritifera*) e MK492921 (*A. bokermanni*)

Vouchers: MPEG NEM 66, MPEG NEM 67, CHIOC 38717a e CHIOC 38717b (*R. margaritifera*) MPEG 00224, MPEG 00225 (*A. bokermanni*)

Descrição geral: Helminthos delgados e filiformes. Extremidade anterior com dilatação cuticular vesiculosa bem desenvolvida, dividida em uma parte anterior mais larga e outra posterior mais estreita (Figs. 6A; 7A; 8A). Esôfago claviforme com anel nervoso situado no terço anterior (Figs. 6A; 7A). Poro excretor próximo do nível dos deirídios (Figs. 6A, 7A; 8D, E). Boca guarnecida com três lábios indistintos, dois pares papilas cefálicas e um par de anfídios (Fig. 8B). Cutícula com fina estriação transversal e cristas longitudinais bem desenvolvidas (Figs. 6B, C; 7B, C; 8C). Fêmeas com vulva na metade posterior do corpo, ovojector bem desenvolvido, aparelho genital anfidelfo com úteros repletos de ovos em estágio de mórula (Figs. 6D; 8F) e extremidade posterior terminando em um espinho cuticular simples (Figs. 6E; 8G, H). Machos com bolsa copuladora trilobulada e simétrica de Tipo III, com raio 8 sobrepondo-se ao raio 6 por quase toda sua extensão, exceto na porção distal, sem contato com a extremidade da membrana bursal (Fig. 7D, E; 9A, B). Um par de papilas bursais presente entre os raios 3 e 4 (Fig. 9A). Cone genital bem desenvolvido, abrigando a papila zero na porção anterior e flanqueado pelos raios 7 reduzidos (Fig. 9B). Lobo dorsal dividido em raio 9 (anterior) e 10 (posterior) (Fig. 9C). Espículos iguais, envoltos por membrana hialina e divididos em “garfo”; “calçadeira” e “lâmina” (Figs. 7F, G).

Fêmeas (baseado em 9 espécimes) Comprimento total 7–11 (8) mm, largura na metade do corpo 147–187 (169). Comprimento da vesícula cefálica 61–72 (65). Comprimento do esôfago 440–504 (479). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 152–184 (160), 256–344 (291) e 277–371 (312), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,51–0,76 (0,62). Cutícula com aproximadamente 21 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 33 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 3 espécimes) (Fig. 6B, C). Vulva pós-equatorial a 5–8,2 (5,7) mm da extremidade anterior. Comprimento da vagina vera 139–93 (109). Ovojector dividido em vestíbulo 327–389 (379), esfíncteres anterior 21–53 (41) e posterior 24–56 (35) e infundíbulos anterior 34–53 (40) e posterior 34–53 (43). Ovos em mórula 38–44 (42) × 67–74 (71). Cauda cônica 105–138 (121) terminando em um espinho cuticular 12–24 (15).

Machos (baseado em 9 espécimes) Comprimento total 4–6 (5) mm, largura na metade do

corpo 80–147 (122). Comprimento da vesícula cefálica 61–83 (60). Comprimento do esôfago 396–445 (430). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 140–181 (161), 239–312 (287) e 261–336 (305), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,57–0,79 (0,67). Cutícula com aproximadamente 27 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 41 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 3 espécimes) (Fig. 7B, C). Espículos direito e esquerdo 174–193 (181) e 171–192 (181) respectivamente. Lâmina com cinco a sete processos distais e garfo com bifurcação no terço posterior, correspondendo a aproximadamente 23% do comprimento total do espículo (Fig. 7F).

Destaques: Em comparação com as espécies neotropicais com bolsa copuladora do Tipo III, os nematódeos parasitos de *R. margaritifera* não apresentam aletas laterais, diferindo de *Oswaldocruzia anolisi* Barus and Coy Otero, 1968; *Oswaldocruzia brevispicula* Moravec and Kaiser, 1995; *Oswaldocruzia jeanbarti* Ben Slimane, Durette-Desset and Chabaud, 1995 e *Oswaldocruzia subauricularis* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1917. Também apresentam variação numérica de 5 a 7 processos distais na lâmina espicular, diferindo de *Oswaldocruzia albareti* Ben Slimane and Durette-Desset, 1996 (4 processos); *Oswaldocruzia cassonei* Ben Slimane and Durette-Desset, 1996 (espatulado), *Oswaldocruzia taranchoni* Ben Slimane and Durette-Desset, 1995 (espatulado) e *Oswaldocruzia tcheprakovae* Ben Slimane and Durette-Desset, 1996 (bifurcado). Em comparação com as duas espécies restantes, diferem de *O. chabaudi* em relação ao comprimento total dos espículos (181 µm x 175 µm) e à razão poro excretor/esôfago (0,67 x 0,79). Aproximando-se morfologicamente de *O. chambrieri*, originalmente descrito parasitando de *R. margaritifera* no Equador, com a mesma variação intraespecífica no número de processos e bifurcação do garfo ocupando 27 a 30% do tamanho do espículo (Ben Slimane e Durette-Desset 1993).

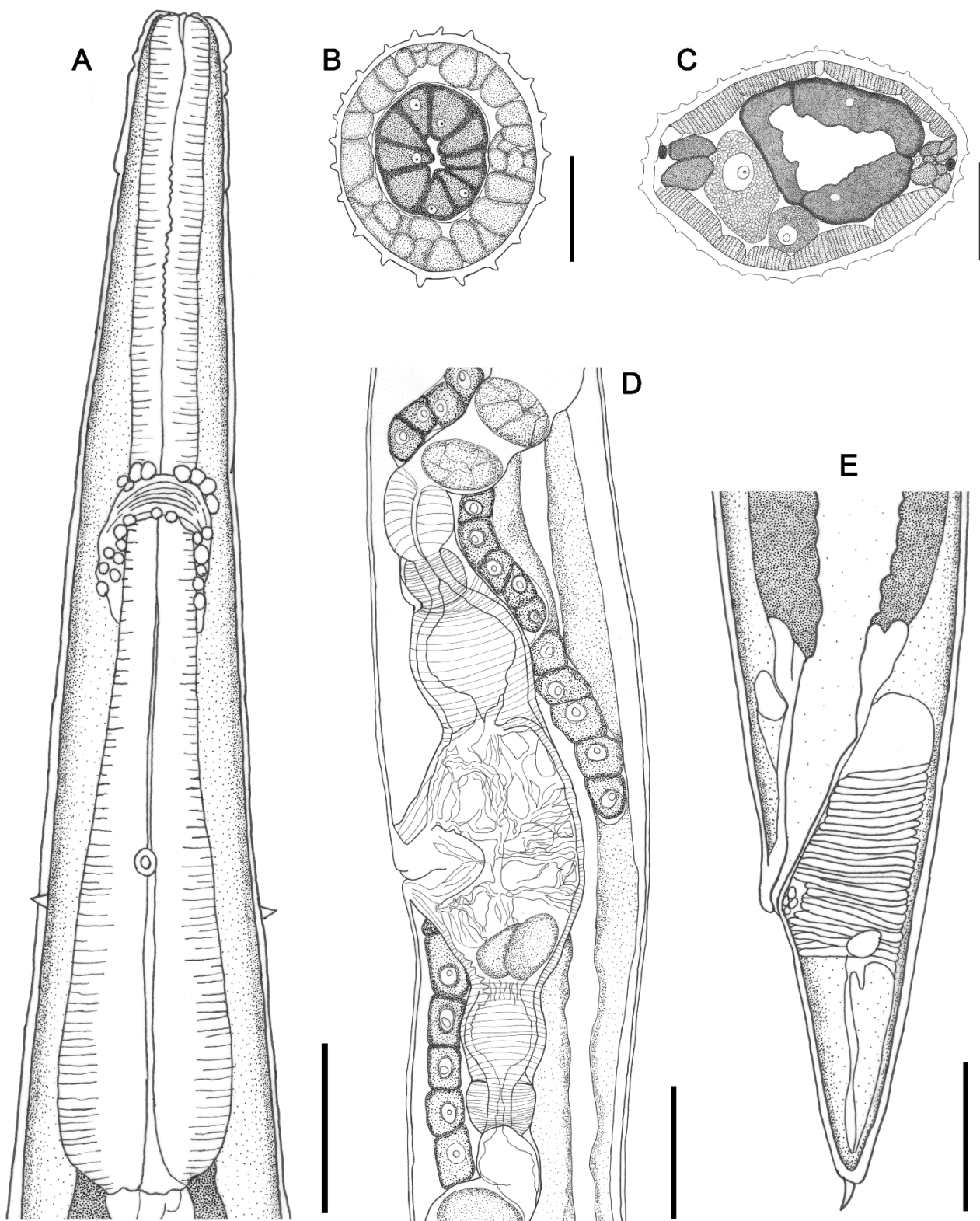


Figura 6 - Microscopia de Luz de *O. chambrieri* fêmea parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da região anterior (Barra = 50 μ m); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 30 μ m); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 μ m); D. Visão lateral da abertura da vulva e do aparelho ovojector (barra = 50 μ m); E. Visão lateral da região posterior, com a abertura do ânus e o espinho caudal (Barra = 100 μ m).

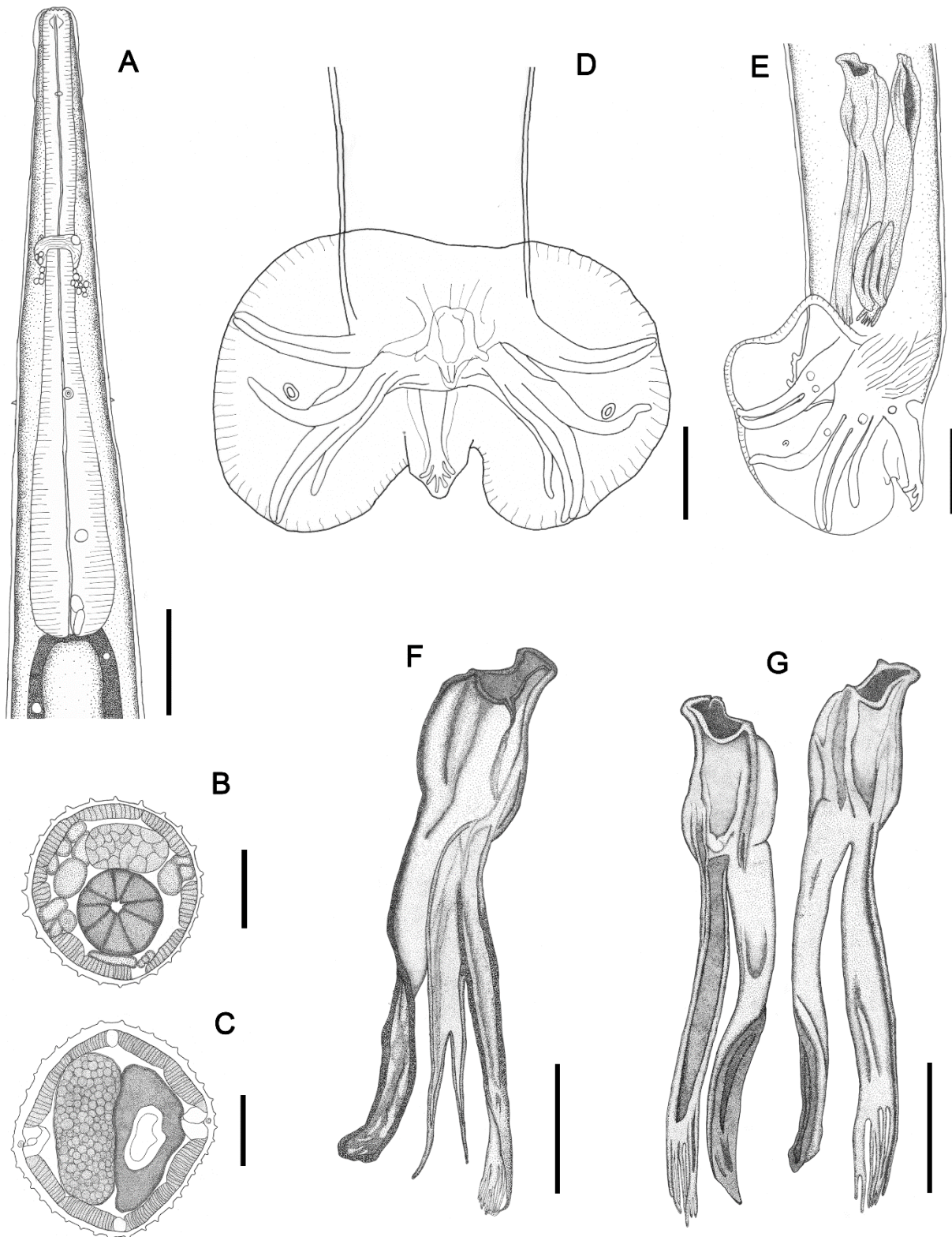


Figura 7 - Microscopia de Luz de *O. chambrieri* macho parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da região anterior (Barra = 75 μ m); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 30 μ m); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 μ m); D. Visão ventral da bolsa copuladora (Barra = 25 μ m); E. Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 50 μ m); F. Visão ventro-lateral do espículo direito, demonstrando a divisão dos três ramos principais (Barra = 40 μ m); G. Visão dorsal dos espículos direito e esquerdo (Barra = 40 μ m).

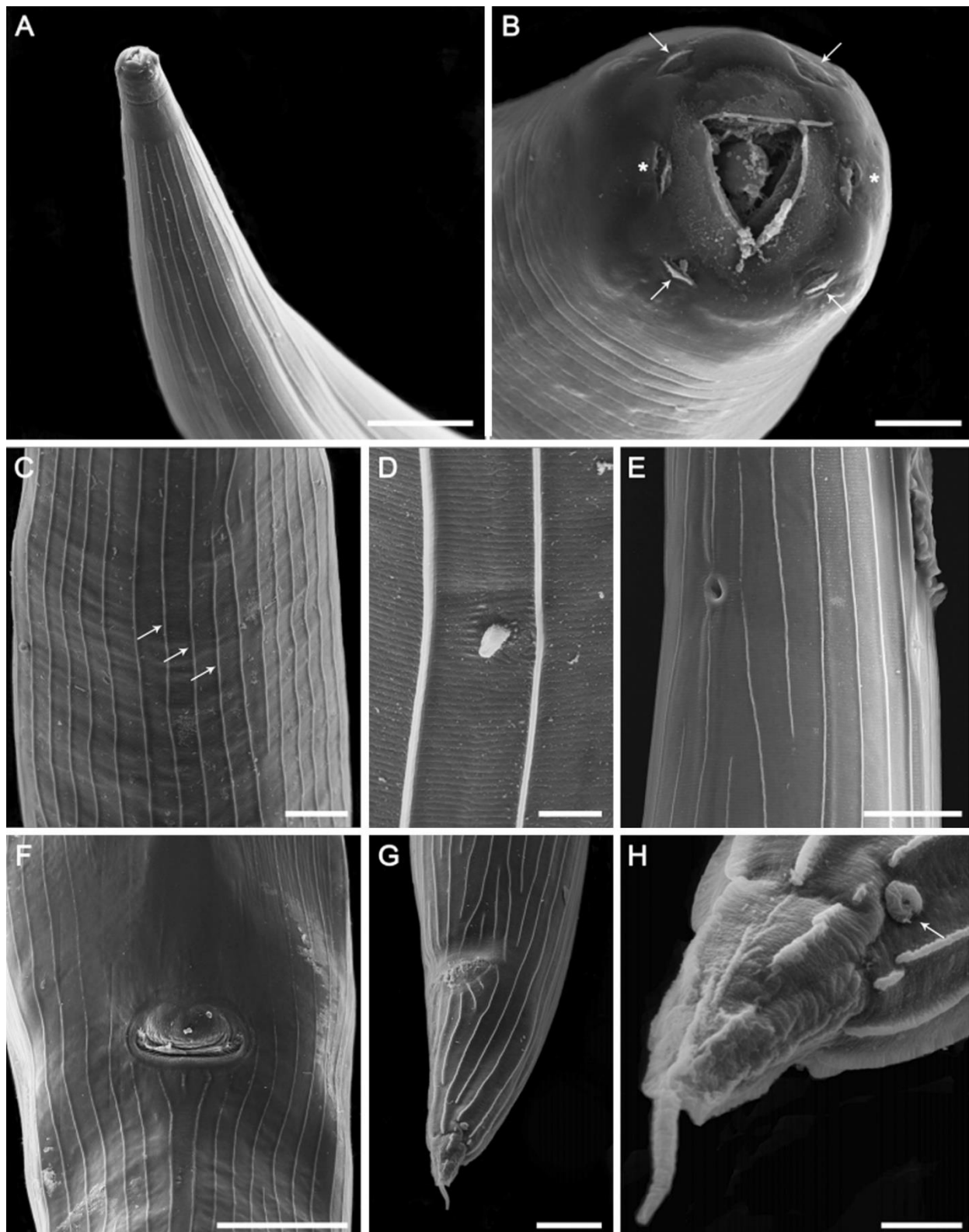


Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. chambrieri* fêmea parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã: A. Detalhes da região anterior (Barra = 50 µm); B. Visão apical da região cefálica, destacando a abertura bucal com um dente esofágico, papilas cefálicas (setas) e anfídios (asteriscos) (Barra = 5 µm); C. Detalhes das cristas longitudinais na superfície cuticular (Barra = 20 µm); D. Detalhes do deirídio (Barra = 5 µm); E. Poro excretor (Barra = 20 µm); F. Visão ventral da abertura da vulva (Barra = 50 µm); G. Visão ventro-lateral da extremidade posterior (Barra = 20 µm); H. Extremidade da cauda com o espinho cuticular, destacando um fasmídio (seta) (Barra = 5 µm).

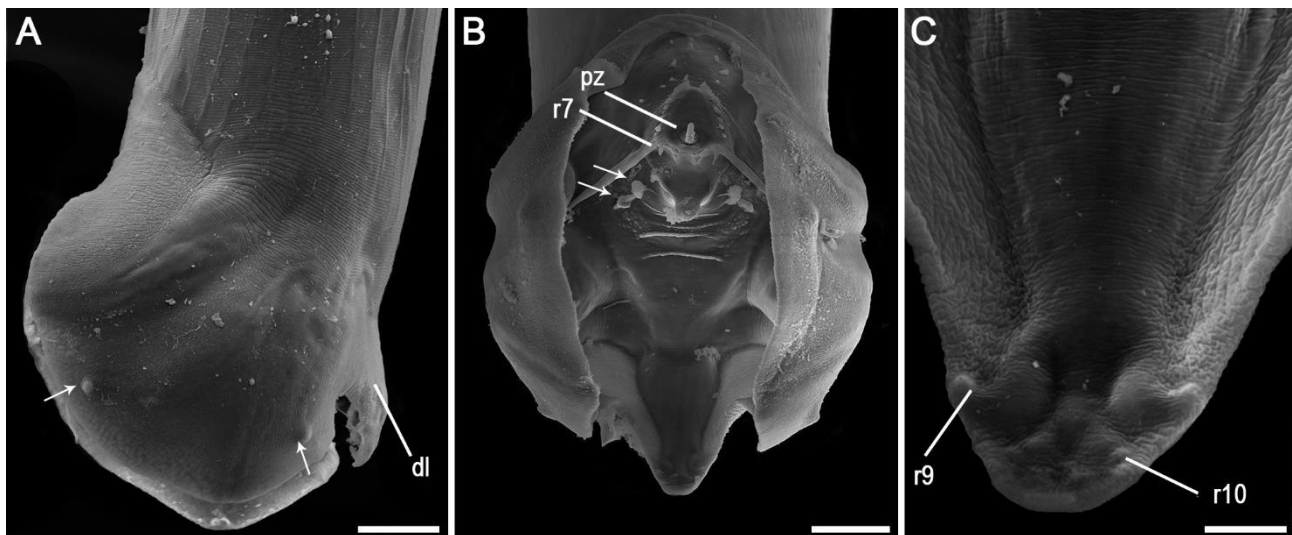


Figura 9 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. chambrieri* macho parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã: A. Visão lateral da bolsa copuladora, destacando papilas bursais (setas) e o lobo dorsal (dl) (Barra = 20 μ m); B. Visão ventral da bolsa copuladora, destacando o cone genital com a papila zero (pz), os raios 7 reduzidos (r7) e papilas genitais (setas) (Barra = 20 μ m); C. Detalhes do lobo dorsal, com a divisão dos raios 9 (r9) e 10 (r10) (Barra = 5 μ m).

***Oswaldocruzia chabaudi* Ben Slimane and Durette-Desset, 1996**

Hospedeiros: *Boana geographica* e *Boana wavrini*

Sítio de Infecção: Intestino delgado

Localidade: Floresta Nacional de Caxiuanã (1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W)

Números de acesso no GenBank: MK492919 (*B. wavrini*) e MK492920 (*B. geographica*)

Vouchers: CHIOC 38718a (machos) e CHIOC 38718b (fêmeas)

Descrição geral: Helmintos delgados e filiformes. Extremidade anterior com dilatação cuticular vesiculosa bem desenvolvida, dividida em uma parte anterior mais larga e outra posterior mais estreita (Fig. 10A). Esôfago claviforme com anel nervoso situado no terço anterior (Fig. 10A, 12A). Poro excretor acima do nível dos deirídios (Fig. 10A, 13C). Boca guarneçada com três lábios indistintos, dois pares papilas cefálicas e um par de anfídios (Fig. 12B, 13B). Cutícula com fina estriação transversal e cristas longitudinais bem desenvolvidas e aletas laterais ausentes (Figs. 10B, C). Fêmeas com vulva na metade posterior do corpo, ovojector bem desenvolvido, aparelho genital anfíelfo com úteros repletos de ovos em estágio de mórula (Fig. 10D) e extremidade posterior terminando em um espinho cuticular simples (Fig. 10E). Machos com bolsa copuladora trilobulada e simétrica de Tipo III, com raio 8 sobrepondo-se ao raio 6 por quase toda sua extensão, exceto na porção distal, sem contato com a extremidade da membrana bursal (Fig. 11A, B, 12D, 13E). Um par de papilas bursais presente entre os raios 3 e 4 (Fig. 12D). Cone genital bem desenvolvido, abrigando a papila zero na porção anterior e flaqueado pelos raios 7 reduzidos (Fig. 11C). Lobo dorsal dividido

em raio 9 (anterior) e 10 (posterior) (Fig. 11E). Espículos iguais, envoltos por membrana hialina e divididos em “garfo”; “calçadeira” e “lâmina” (Fig. 11E, F, 12E).

Fêmeas (baseado em 10 espécimes) Comprimento total 8–11 (10) mm, largura na metade do corpo 112–160 (129). Comprimento da vesícula cefálica 42–61 (50). Comprimento do esôfago 397–479 (426). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 183–355 (225), 261–355 (313) e 334–380 (351), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,7–0,86 (0,82). Cutícula com 45–57 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 59–64 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 3 espécimes). Vulva pós-equatorial a 6,1–8,5 (7,2) mm da extremidade anterior. Comprimento da vagina vera 27–33 (31). Ovejector dividido em vestíbulo 280–411 (322), esfíncteres anterior 24–36 (28) posterior 21–35 (28) e infundíbulos anterior 31–74 (50) e posterior 38–82 (54). Ovos em mórula 42–65 (51) x 29–36 (32). Cauda cônica 75–183 (104) terminando em um espinho cuticular 10–12 (10).

Machos (baseado em 10 espécimes) Comprimento total 4–6 (5) mm, largura na metade do corpo 91–146 (110). Comprimento da vesícula cefálica 50–57 (54). Comprimento do esôfago 339–422 (368). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 116–199 (156), 210–291 (246) e 320–380 (345), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,67–0,79 (0,69). Cutícula com 34–39 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 40–46 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 3 espécimes). Espículos direito e esquerdo 151–170 (157) e 153–172 (158) respectivamente. Lâmina com cinco processos distais e garfo com bifurcação no terço posterior a 43–56 (45) correspondendo a aproximadamente 25% do comprimento total do espículo.

Destaques: Em comparação com as espécies neotrópicas que apresentam bolsa copuladora do Tipo III, os nematódeos parasitos de *B. geographica* e *B. wavrini* diferem de *O. anolisi*, *O. brevispicula*, *O. jeanbarti* e *O. subauricularis* pela ausência de aletas laterais. Em relação as demais espécies, diferem principalmente quanto a morfologia espicular, apresentando a lâmina dividida em 5 processos em sua parte distal, diferentemente de *O. albareti* (4 processos), *O. cassonei* (espatulado), *O. taranchoni* (espatulado) e *O. tcheprakovae* (bifurcado). Dentre as duas espécies restantes, *O. chabaudi* foi originalmente descrito com 5 processos distais na lâmina e *O. chambrieri* com uma variação intraespecífica de 5 a 7 processos. Porém, os parasitos de *B. geographica* e *B. wavrini* do presente estudo diferem de *O. chambrieri*, em relação ao comprimento total dos espículos (160 µm x 190 µm), à razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago (0,69 x 0,62), aproximando-se morfologicamente de *O. chabaudi*.

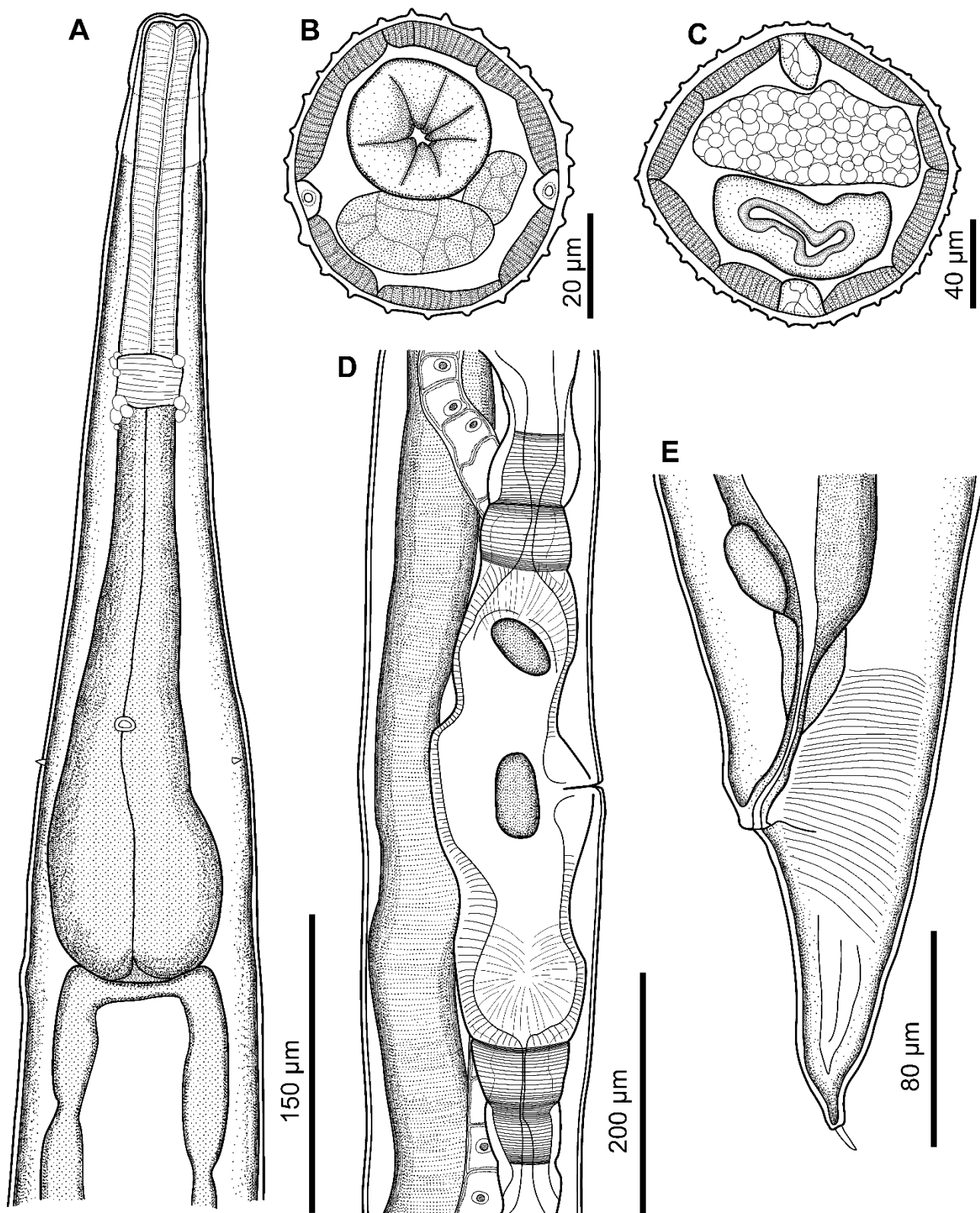


Figura 10 - Microscopia de Luz de *O. chabaudi* fêmea parasito de *B. geographica* e *B. wavrini* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da região anterior, com a vesícula cefálica, o esôfago, o anel nervoso, o poro excretor e deirídios (Barra = 150 µm); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 20 µm); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 µm); D. Visão lateral da abertura da vulva e do ovojector (Barra = 200 µm); E. Visão lateral da região posterior, com o ânus e o espinho caudal (Barra = 80 µm).

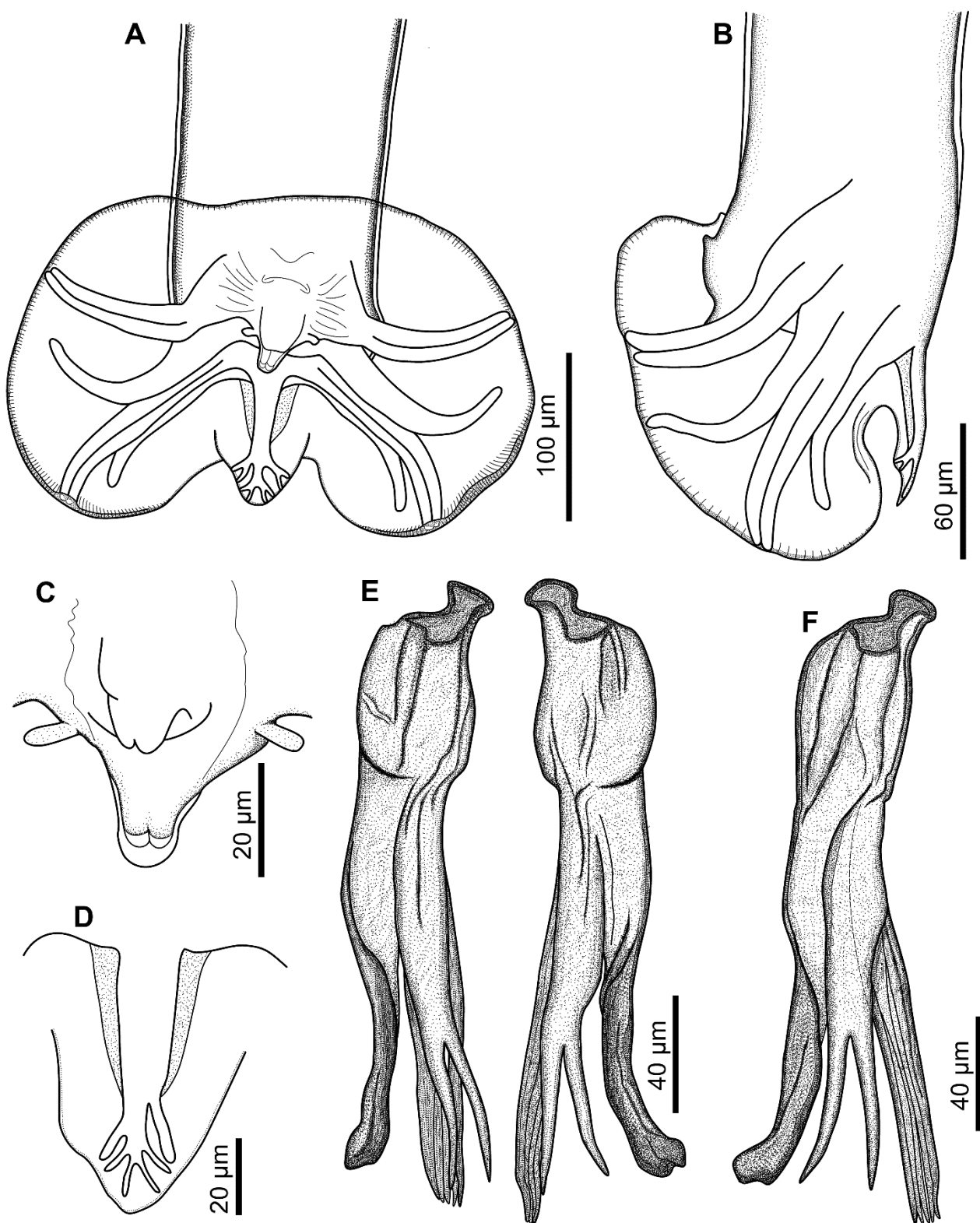


Figura 11 - Microscopia de Luz de *O. chabaudi* macho parasito de *B. geographica* e *B. wavrini* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da bolsa copuladora, demonstrando o padrão de distribuição dos raios bursais (Barra = 100 µm); B. Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 60 µm); C. Detalhes do cone genital (Barra = 20 µm); D. Detalhes do lobo dorsal (Barra = 20 µm); E. Visão ventral dos espículos direito e esquerdo (Barra = 40 µm); F. Visão ventro-lateral do espículo direito, demonstrando a divisão dos três ramos principais (Barra = 40 µm).



Figura 12 - Microscopia de Luz de *O. chabaudi* macho e fêmea parasito de *B. geographica* e *B. wavrini* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior do corpo (Barra = 100 μm); B. Detalhes da vesícula cefálica (Barra = 40 μm); C. Região posterior da fêmea, indicando a abertura do o ânus (a) e o espinho cuticular terminal (seta) (Barra = 40 μm); D. Visão ventral da bolsa copuladora do macho, indicando papilas bursais (seta) (Barra = 40 μm); E. Visão lateral dos espículos dentro do corpo do macho (Barra = 40 μm).

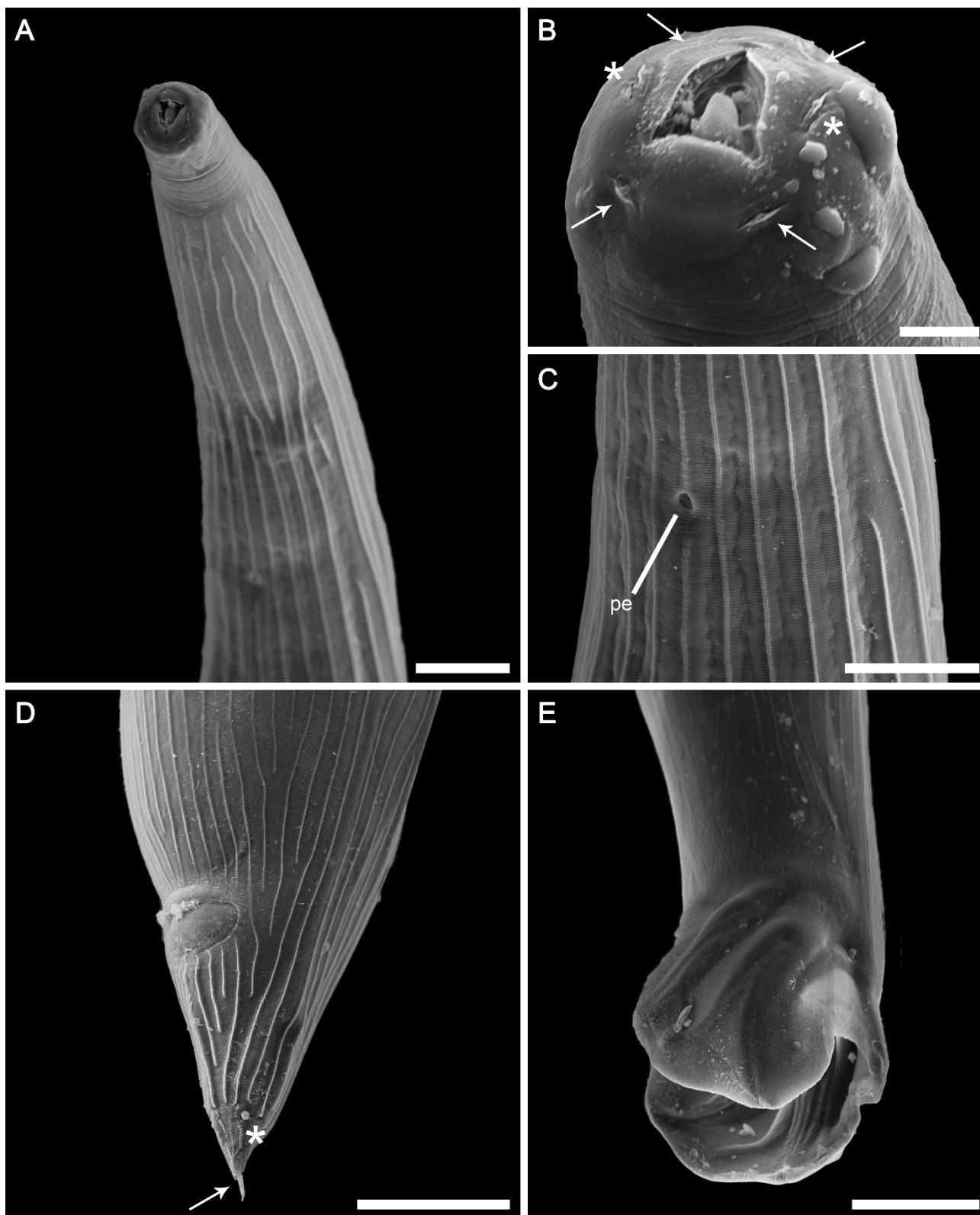


Figura 13 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. chabaudi* fêmea parasito de *B. geographica* e *B. wavrini* da Flona de Caxiuanã: A. Detalhes da região anterior (Barra = 50 µm); B. Visão apical da região cefálica, destacando a abertura bucal com um dente esofágico, papilas cefálicas (setas) e anfídios (asteriscos) (Barra = 5 µm); C. Detalhes das cristas longitudinais na superfície cuticular e do poro excretor (pe) (Barra = 20 µm); D. Visão ventro-lateral da extremidade posterior, indicando o espinho cuticular e um fasmídio (asterisco) (Barra = 50 µm); E. Visão lateral da bolsa copuladora do macho (Barra = 50 µm).

***Oswaldocruzia lanfrediae* Larrat, Melo, Furo, Willkens and Santos, 2018**

Hospedeiro: *Leptodactylus paraensis*

Sítio de Infecção: Intestino delgado

Localidade: Floresta Nacional de Caxiuana (1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W)

Material tipo: Holótipo MPEG 191, alótipo MPEG 192 e parátipos MPEG 193–194

Descrição geral: Helmintos delgados e filiformes. Extremidade anterior com dilatação cuticular vesiculosa bem desenvolvida, dividida em uma parte anterior mais larga e outra posterior mais estreita (Fig. 14B). Esôfago claviforme com anel nervoso situado no terço anterior (Figs. 14A, 16A). Poro excretor acima do nível dos deirídios (Fig. 14D). Boca guarnecida com três lábios indistintos, um dorsal abrigando um par de papilas e dois lábios ventrolaterais abrigando uma papila e um anfídio cada (Fig. 17B). Cutícula com fina estriação transversal e cristas longitudinais bem desenvolvidas e aletas laterais presentes (Figs. 16B, C, 17A), iniciando logo após a vesícula cefálica e terminando acima do nível do ânus. Fêmeas com vulva na metade posterior do corpo (Figs. 14E, 16D, 17 D), ovojector bem desenvolvido, aparelho genital anfídelfo com úteros repletos de ovos em estágio de mórula e extremidade posterior terminando em um espinho cuticular simples (Figs. 14F, 16E, 17E). Machos com bolsa copuladora trilobulada e simétrica de Tipo II, com raio 8 sobrepondo-se ao raio 6 apenas na porção mediana, sem contato com a extremidade da membrana bursal (Figs. 15A, 16G, H, 18A, B). Um par de papilas bursais presente entre os raios 3 e 4 (Figs. 15B, 16G, 18A). Cone genital bem desenvolvido, abrigando a papila zero na porção anterior e flaqueado pelos raios 7 reduzidos (Fig. 18B). Lobo dorsal dividido em raio 9 (anterior) e 10 (posterior) (Fig. 15C, 18B). Espículos iguais, envoltos por membrana hialina e divididos em “garfo”; “calçadeira” e “lâmina” (Fig. 15E, F).

Fêmeas (baseado em 10 espécimes) Comprimento total 6–10 (8) mm, largura na metade do corpo 113–170 (135). Comprimento da vesícula cefálica 60–82 (68). Comprimento do esôfago 423–504 (455) e largura de 88–112 (99) no nível do bulbo. Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 179–250 (214), 277–371 (312) e 302–411 (351), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,65–0,74 (0,68). Cutícula com 22–25 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 38–42 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em dois espécimes). Vulva pós-equatorial a 2,1–3,3 (2,5) mm da extremidade anterior. Comprimento da vagina vera 17–43 (28). Ovojector dividido em vestíbulo 208–320 (251), esfíncteres anterior 26–53 (38) posterior 32–43 (38) e infundíbulos anterior 30–68 (48) e posterior 39–60 (49). Úteros didelfos e anfídelfos, repleto de ovos. Ovos em mórula 36–41 (38) × 55–66 (60). Cauda cônica 126–172 (147) terminando em um espinho cuticular 6–13 (11).

Machos (baseado em 9 espécimes) Comprimento total 4,9–5,7 (5,3) mm, largura na metade do corpo 99–109 (106). Comprimento da vesícula cefálica 59–74 (70). Comprimento do esôfago 386–

416 (404) e largura de 42–59 (49) no nível do bulbo. Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 187–286 (207), 215–344 (308) e 312 (298–325), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,55–0,82 (0,71). Cutícula com 22–25 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 39–42 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em dois espécimes). Espículos direito e esquerdo 154–173 (162) e 152–168 (160) respectivamente. Lâmina com 2 à 3 processos distais e garfo com bifurcação no terço posterior correspondendo a aproximadamente 25% do comprimento total do espículo.

Destaques: *O. lanfrediae* parasito de *L. paraensis* estão entre as 22 espécies com bolsa copuladora do Tipo II na região Neotropical. Dentre estas espécies, *Oswaldocruzia barusi* Ben Slimane and Durette-Desset, 1995; *Oswaldocruzia dorsarmata* Ben Slimane, Durette-Desset and Chabaud, 1995; *Oswaldocruzia marechali* Ben Slimane, Durette-Desset and Chabaud, 1995; *Oswaldocruzia mauleoni* Ben Slimane, Durette-Desset and Chabaud, 1995; *Oswaldocruzia moravecii* Ben Slimane and Durette-Desset, 1995 e *Oswaldocruzia nicaraguensis* Bursey, Goldberg, and Vitt, 2006 apresentam espículos característicos do grupo Neotropical Caribenho, com todos os três ramos subdivididos em vários processos pequenos, diferindo bastante de *O. lanfrediae*. Das espécies com espículos característicos do grupo Neotropical Continental, *O. belenensis*; *Oswaldocruzia lescurei* Ben Slimane and Durette-Desset, 1996; *Oswaldocruzia mazzai* Travassos, 1935 e *Oswaldocruzia proencai* Ben Slimane and Durette-Desset, 1995 diferem de *O. lanfrediae* pela ausência de aletas laterais. Em relação à morfologia do espículo, *O. lanfrediae* apresenta de 2 à 3 processos distais na lâmina, diferentemente de *Oswaldocruzia benslimanei* Durette-Desset, Alves dos Anjos, and Vrcibradic, 2006 (espatulado); *Oswaldocruzia burseyi* Durette-Desset, Alves dos Anjos, and Vrcibradic, 2006 (5–6 processos); *Oswaldocruzia dlouhyi* Ben Slimane and Durette-Desset, 1995 (9 processos); *Oswaldocruzia fredii* Durette-Desset, Alves dos Anjos and Vrcibradic, 2006 (6 processos); *Oswaldocruzia manuensis* Guerrero, 2013 (5–7 processos); *Oswaldocruzia panamaensis* Bursey, Goldberg and Telford, 2007 (inúmeros processos); *Oswaldocruzia peruensis* Ben Slimane, Verhaagh and Durette-Desset, 1995 (três processos subdivididos em processos menores); *Oswaldocruzia vaucheri* Ben Slimane and Durette-Desset, 1993 (5 processos) e *Oswaldocruzia venezuelensis* Ben Slimane, Guerrero, and Durette-Desset, 1996 (6 processos). Por fim, diferem de *Oswaldocruzia costaricensis* Bursey and Goldberg, 2005 e *Oswaldocruzia touzeti* Ben Slimane and Durette-Desset, 1993 em relação à extensão das aletas laterais, que estão restritas à região anterior de ambas as espécies, iniciando após a vesícula cefálica e terminando próximo ao nível da junção esôfago-intestinal, enquanto em *O. lanfrediae* a aleta se estende próximo ao nível do ânus. Assim, os nematódeos parasitos de *L. paraensis* representam uma espécie morfologicamente distinta dos demais congêneres, e se encontra descrita em publicação científica (anexo 3).



Figura 14 - Microscopia de Luz de *O. lanfrediae* fêmea parasito de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior, destacando o esôfago (Barra = 100 μ m); B. Detalhes da vesicular cefálica (Barra = 20 μ m); C. Detalhes do anel nervoso indicado na seta (Barra = 20 μ m); D. Posição do poro excretor (pe) e do deirídio (d) (Barra = 20 μ m); E. Detalhes do sistema reprodutor feminino com a vulva indicada na seta (Barra = 100 μ m); F. Região posterior evidenciando o ânus, a cauda e o espinho cuticular terminal indicado na seta (Barra = 50 μ m).

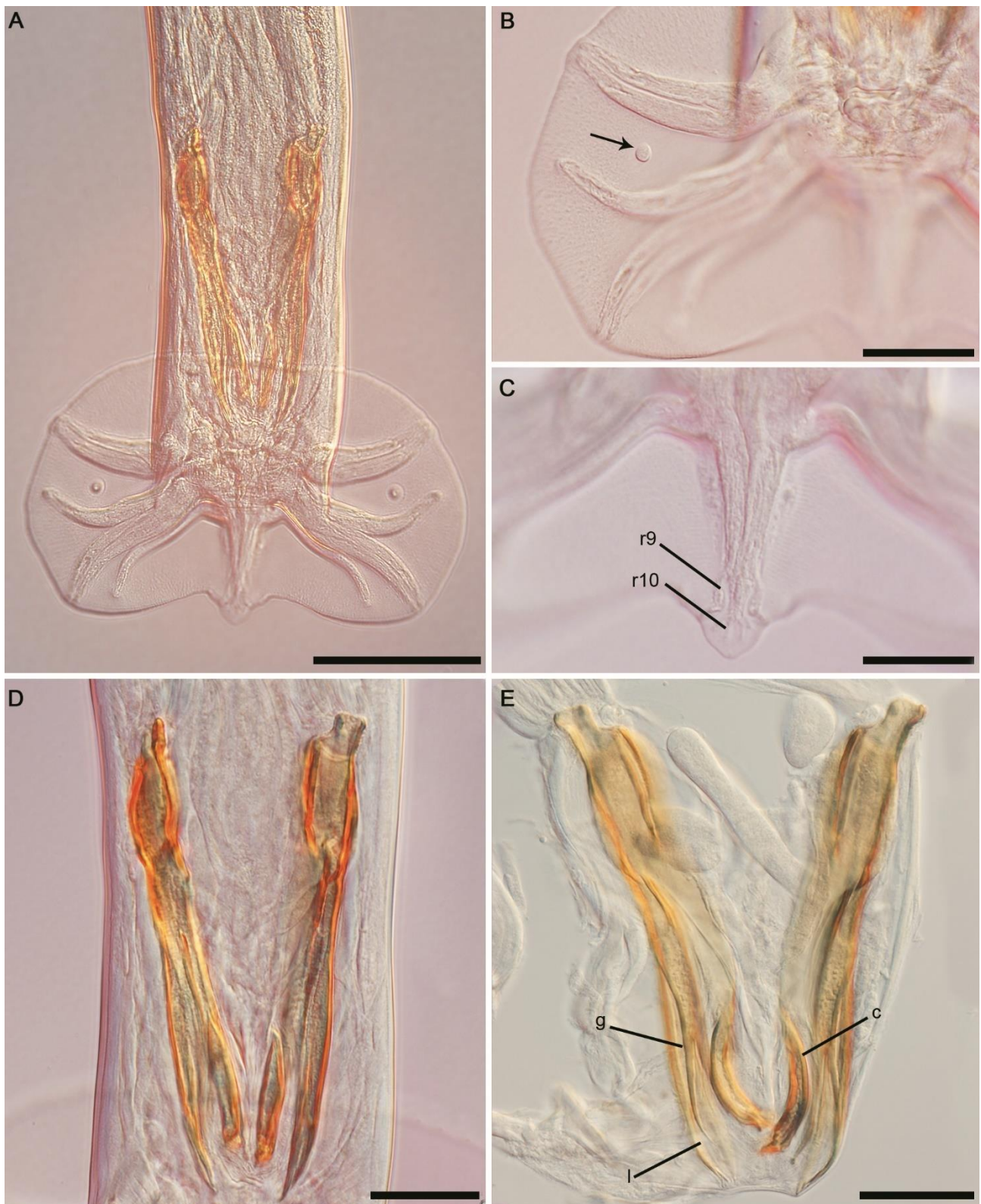


Figura 15 - Microscopia de Luz de *O. lanfrediae* macho parasito de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A. Região posterior, destacando a bolsa copuladora em visão ventral (Barra = 150 µm); B. Detalhes da distribuição dos raios e posição das papilas bursais (Barra = 40 µm); C. Detalhes dos raios 9 e 10 no lobo dorsal da bolsa copuladora (Barra = 20 µm); D. Visão geral dos espículos no interior do corpo (Barra = 40 µm); E. Detalhes da estrutura espicular destacando o “garfo” (g), a “calçadeira” (c) e a “lâmina” (l) (Barra = 40 µm).

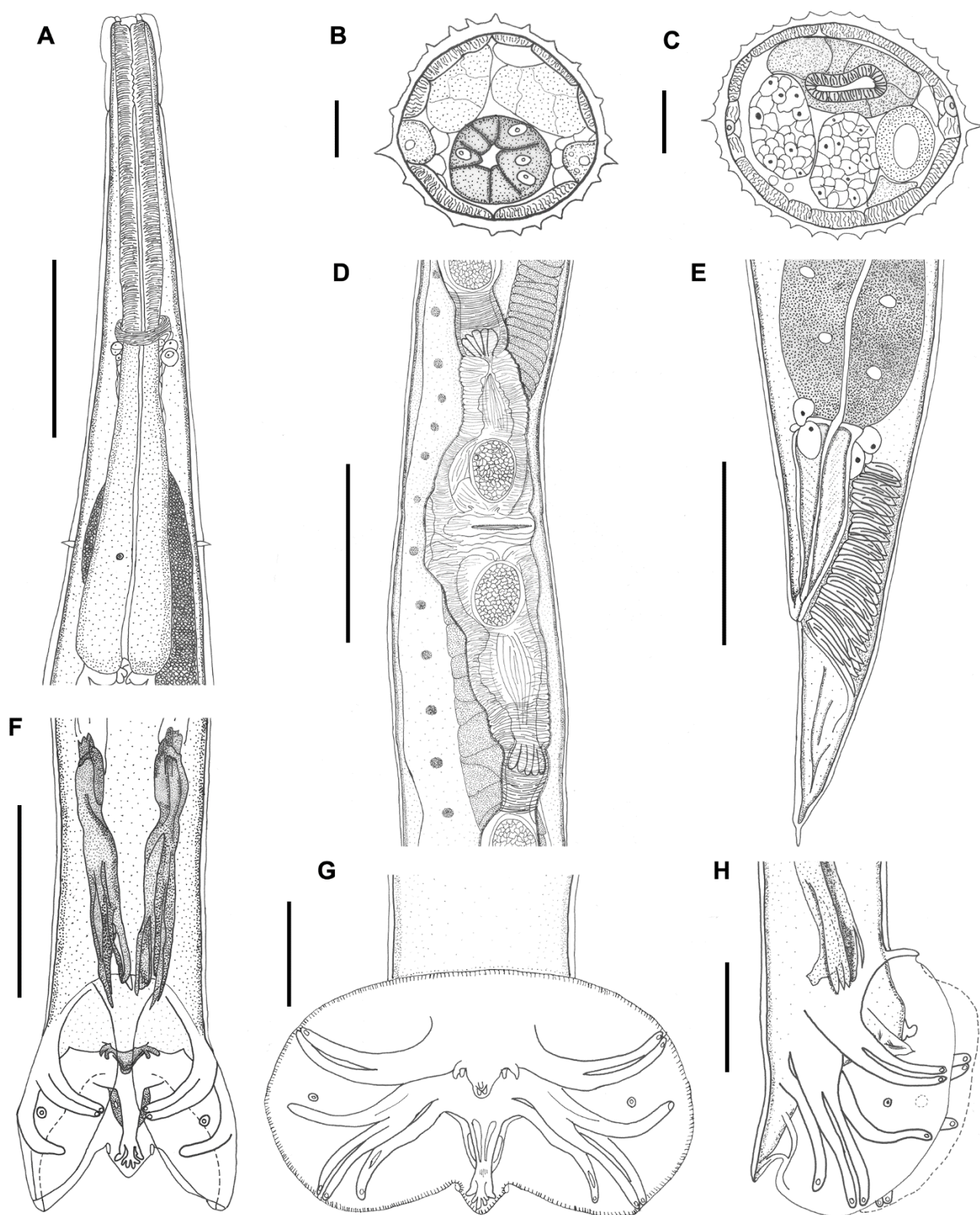


Figura 16 - Microscopia de Luz de *O. lanfrediae* macho e fêmea parasitos de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A. Visão lateral da região anterior, indicando o esôfago, o anel nervoso, o poro excretor e deirídios (Barra = 100 μ m); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 20 μ m); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 30 μ m); D. Visão lateral da vulva da fêmea e do ovojector (Barra = 150 μ m); E. Visão lateral da região posterior da fêmea, destacando o ânus e o espinho caudal (Barra = 100 μ m); F. Região posterior do macho, destacando os espículos (Barra = 100 μ m); G. Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 50 μ m); H. Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 50 μ m).



Figura 17 – Imagens capturadas em Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. lanfrediae* fêmea parasito de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior, evidenciando a presença das aletas laterais (Barra = 50 µm); B. Detalhes da região cefálica, destacando a posição das papilas (setas) e anfídios (*) (Barra = 8 µm); C. Detalhes do deirídio (Barra = 5 µm); D. Detalhes da abertura da vulva (Barra = 20 µm); E. Visão geral da região posterior do corpo, evidenciando a abertura do ânus e o espinho caudal (seta) (Barra = 20 µm).

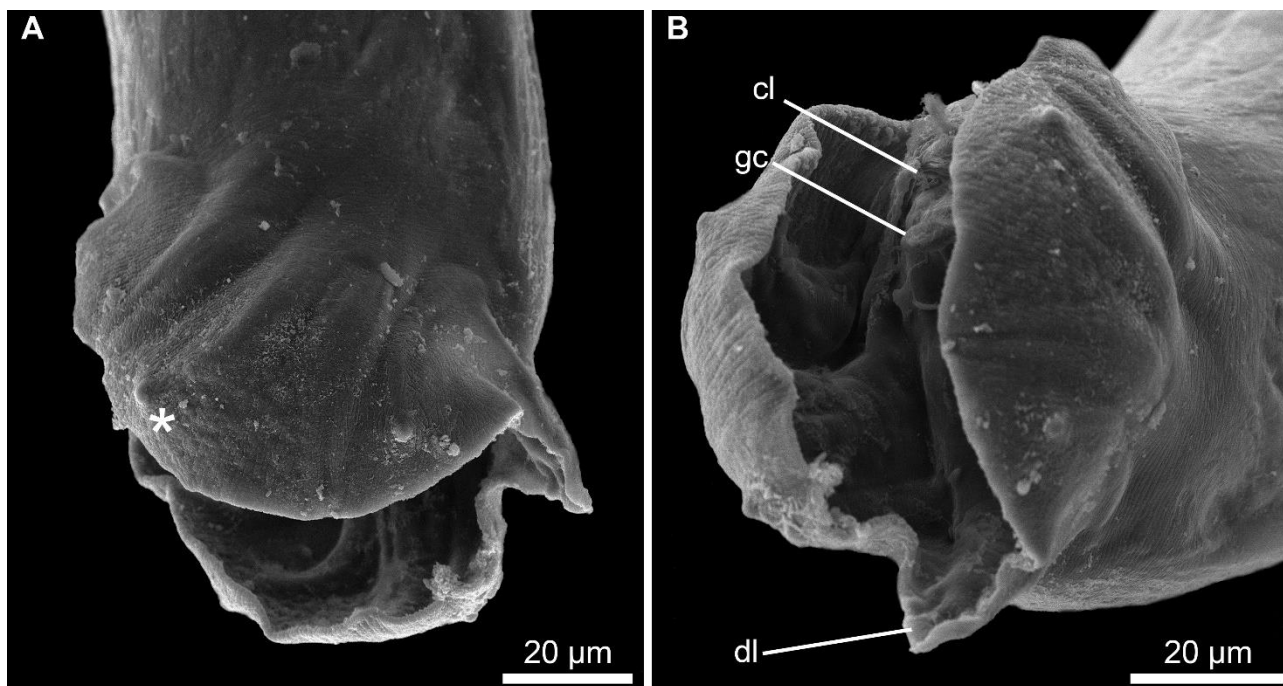


Figura 18 – Imagens capturadas em Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. lanfrediae* macho parasito de *Leptodactylus paraensis* da Flona de Caxiuanã: A. Visão lateral da região posterior do corpo, demonstrando o arranjo dos raios e a presença de papilas (*) na bolsa copuladora (Barra = 20 µm); F. Visão ventrolateral da região posterior, evidenciando o lobo dorsal da bolsa copuladora e o cone genital (Barra = 20 µm).

***Oswaldocruzia belenensis* Santos, Giese, Maldonado and Lanfredi, 2008**

Hospedeiro: *Rhinella marina* e *Rhinella margaritifera*

Sítio de Infecção: Intestino delgado

Localidade: Floresta Nacional de Caxiuanã (1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W), Praia Grande (0°45'52.1"S, 48°30'43.3"W), Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Belém (1°28'23.6"S 48°27'29.3"W).

Números de acesso no GenBank: MK492916 e MK492917 (*R. marina*) e MK492915 e MK492918 (*R. margaritifera*)

Vouchers: MPEG 00226, MPEG 00227 (*R. margaritifera* - Flona Caxiuanã), MPEG 00228, MPEG 00229 (*R. marina* - Praia Grande).

Descrição geral: Helmintos delgados e filiformes. Extremidade anterior com dilatação cuticular vesiculosa bem desenvolvida, dividida em uma parte anterior mais larga e outra posterior mais estreita (Fig. 19B). Esôfago claviforme com anel nervoso situado no terço anterior (Figs. 19A). Poro excretor acima do nível dos deirídios. Boca guarnecida com três lábios indistintos, dois pares de papilas e um par de anfídios. Cutícula com fina estriação transversal e cristas longitudinais bem desenvolvidas e aletas laterais ausentes (Fig. 19C). Fêmeas com abertura da vulva na metade posterior do corpo, ovojector bem desenvolvido, aparelho genital anfidelfo com úteros repletos de ovos em estágio de mórula (Fig. 19D). Extremidade posterior cônica terminando em um espinho cuticular

simples (Fig. 19E). Machos com bolsa copuladora trilobulada e simétrica de Tipo II, com raio 8 sobrepondo-se ao raio 6 apenas na porção mediana, sem contato com a extremidade da membrana bursal e papilas bursais ausentes entre os raios 3 e 4 (Fig. 20A). Cone genital bem desenvolvido e bobo dorsal dividido em raios 9 (anterior) e 10 (posterior). Espículos iguais, envoltos por membrana hialina e divididos em “garfo”; “calçadeira” e “lâmina” (Fig. 20B).

Fêmeas (baseado em 10 espécimes) Comprimento total 6,3–11,1 (8,8) mm, largura na metade do corpo 103–160 (128). Comprimento da vesícula cefálica 74–107 (82). Comprimento do esôfago 466–546 (525). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 202–288 (224), 321–453 (392) e 355–500 (419), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,65–0,74 (0,68). Cutícula com 27–35 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 39–45 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 3 espécimes). Vulva pós-equatorial a 4,1–7,8 (6,1) mm da extremidade anterior. Comprimento da vagina vera 23–40 (28). Oojector dividido em vestíbulo 200–418 (342), esfíncteres anterior 34–51 (37) posterior 32–49 (35) e infundíbulos anterior 30–38 (35) e posterior 27–39 (35). Úteros didelfos e anfidelfos, repleto de ovos. Ovos em mórula 34–45 (37) × 64–73 (68). Cauda cônica 131–182 (175) terminando em um espinho cuticular 7–10 (9).

Machos (baseado em 12 espécimes) Comprimento total 6,1–7,5 (5,7) mm, largura na metade do corpo 87–119 (102). Comprimento da vesícula cefálica 64–93 (77). Comprimento do esôfago 389–503 (442) e largura de 42–59 (49) no nível do bulbo. Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 180–251 (210), 246–390 (320) e 380 (299–428), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,55–0,82 (0,71). Cutícula com 30–37 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 39–45 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 3 espécimes). Espículos direito e esquerdo 151–178 (161) e 152–181 (162) respectivamente. Extremidade da lâmina com 4 processos distais, dos quais dois são bifurcados (Fig. 20C) e garfo com bifurcação no terço posterior correspondendo a aproximadamente 23% do comprimento total do espículo.

Destaques: Dentre as 22 espécies com bolsa copuladora do Tipo II da região Neotropical, os parasitos de *R. marina* diferem de *O. barusi*, *O. dorsarmata*, *O. marechali*, *O. mauleoni*, *O. moravecii* e *O. nicaraguensis* que apresentam morfologia espicular característica do grupo Neotropical Caribenho. Das espécies restantes, os parasitos de *R. marina* não apresentam aletas laterais, diferindo de *benslimanei*, *O. burseyi*, *O. costaricensis*, *O. dlouhyi*, *O. fredii*, *O. lanfrediae*, *O. manuensis*, *O. panamaensis*, *O. peruensis*, *O. touzeti*, *O. vaucheri* e *O. venezuelensis*. Diferem também de *O. lescurei* e pela disposição das papilas cefálicas. Em relação ao número de projeções da lâmina, os parasitos de *R. marina* se diferenciam de *O. lescurei* (6 processos), *O. mazzai* (10 processos) e *O. proencai* (3 processos). Aproximando-se morfometricamente e morfologicamente de

O. belenensis, principalmente em relação à morfologia espicular a qual já foi previamente descrita parasitando *R. marina* na região metropolitana de Belém.

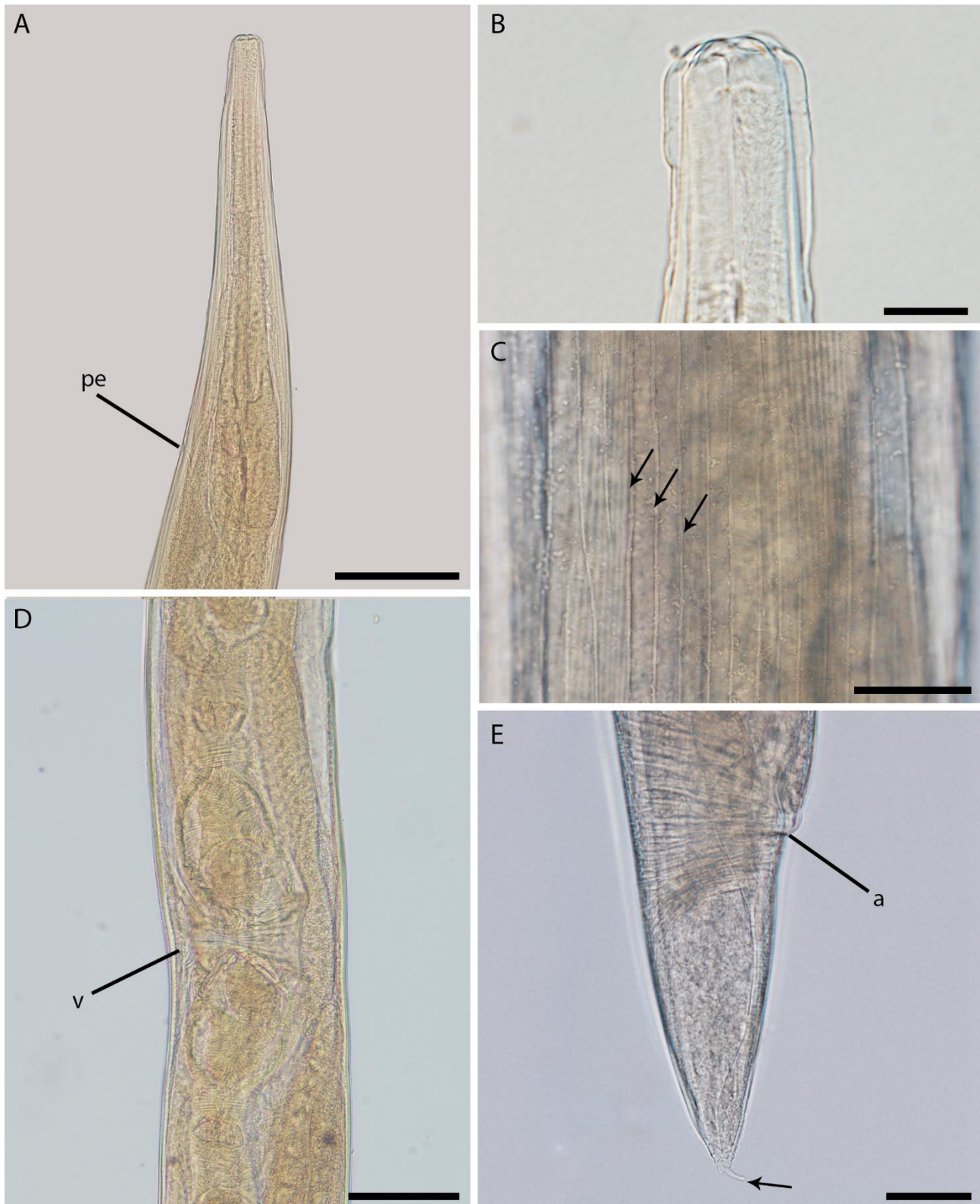


Figura 19 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia belenensis* parasito de *R. marina*: A. Visão lateral da região anterior, indicando o poro excretor (pe) (Barra = 100 μ m); B. Detalhes da vesícula cefálica (Barra = 20 μ m); C. Detalhes das cristas longitudinais na superfície cuticular (setas) (Barra = 40 μ m); D. Visão lateral da abertura vulvar (v) e do ovojector (Barra = 100 μ m); E. Visão lateral da região posterior, destacando o ânus (a) e o espinho caudal (seta) (Barra = 40 μ m).



Figura 20 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia belenensis* parasito de *R. marina*: A. Visão ventral da bolsa copuladora, mostrando o padrão de distribuição dos raios bursais (Barra = 40 µm); B. Visão ventral do espículo esquerdo, mostrando a divisão nos três ramos principais (Barra = 20 µm); C. Extremidade da lâmina espicular, demonstrando os processos distais (Barra = 10 µm).

***Oswaldocruzia vitti* Bursey and Goldberg, 2004**

Hospedeiro: *Anolis fuscusauratus*

Sítio de Infecção: Intestino delgado

Localidade: Floresta Nacional de Caxiuanã (1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W)

Vouchers: CHIOC 38719a (machos) e CHIOC 38719b (fêmeas)

Descrição geral: Helmintos delgados e filiformes. Extremidade anterior com dilatação cuticular vesiculosa bem desenvolvida, dividida em uma parte anterior mais larga e outra posterior mais estreita. Esôfago claviforme com anel nervoso situado no terço anterior (Figs. 21A, 22A). Cutícula com fina estriação transversal, cristas longitudinais bem desenvolvidas e aletas laterais presentes, surgindo logo após a vesícula cefálica, estendendo-se até o nível da junção esôfago

intestinal (Figs. 21B, C, 22A). Boca guarnecida com lábios indistintos, cavidade não-quitinizada, dois pares papilas cefálicas e um par de anfídios. Fêmeas com vulva na metade posterior do corpo (Figs. 21D, 22D). Ovojector bem desenvolvido, aparelho genital anfidelfo, útero com ovos em estágio de mórula (Fig. 21D) e extremidade posterior terminando com um espinho cuticular simples (Figs. 21E, 22E, F). Machos com bolsa copuladora trilobulada e simétrica de Tipo I, com raio 8 em um ramo independente e totalmente separado do raio 6, sem contato com a extremidade da membrana bursal (Fig. 21F, G, 23A, B). Lobo dorsal dividido em raio 9 (anterior) e 10 (posterior) com padrão de distribuição aleatório. Cone genital bem desenvolvido, abrigando a papila zero na porção anterior e flaqueado pelos raios 7 reduzidos (Fig. 23C). Espículos iguais, envoltos por membrana hialina e divididos em “garfo”; “calçadeira” e “lâmina” (Fig. 21H).

Fêmeas (baseado em 20 espécimes) Comprimento total 7,5–12,5 (10) mm, largura na metade do corpo 157–264 (204). Comprimento da vesícula cefálica 53–78 (67). Comprimento do esôfago 373–526 (418). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 125–196 (166), 260–396 (327) e 175–477 (298), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,67–0,79 (0,76). Cutícula com 57–61 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 64–68 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 3 espécimes). Vulva pós-equatorial a 2,3–4,3 (3,3) mm da extremidade anterior. Comprimento da vagina vera 40–75 (66). Ovojector dividido em vestíbulo 328–555 (414), esfíncteres anterior 43–69 (44) posterior 35–80 (49) e infundíbulos anterior 44–72 (55) e posterior 38–69 (64). Úteros didelfos e anfidelfos, repleto de ovos. Ovos em mórula 61–86 (68) x 44–53 (47). Cauda cônica 100–173 (130) terminando em um espinho cuticular 9–12 (10).

Machos (baseado em 20 espécimes) Comprimento total 3–6 (4) mm, largura na metade do corpo 78–195 (118). Comprimento da vesícula cefálica 35–73 (61). Comprimento do esôfago 299–539 (360). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 73–161 (135), 197–403 (272) e 175–313 (249), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,67–0,78 (0,76). Cutícula com 31–39 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 40–50 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 5 espécimes). Espículos direito e esquerdo 140–163 (156) e 141–164 (156) respectivamente. Lâmina com cinco processos distais e garfo com bifurcação no terço posterior, correspondendo a aproximadamente 25% do comprimento total do espículo.

Destaques: Oito espécies neotropicais apresentam bolsa copuladora do Tipo I: *Oswaldocruzia bonisi* Ben Slimane and Durette-Desset, 1993; *Oswaldocruzia brasiliensis* Lent and Freitas, 1935; *Oswaldocruzia cartagoensis* Bursey and Goldberg, 2011; *Oswaldocruzia lamotheargumedoi* Ruiz-Torres, García-Prieto, Osorio-Sarabia and Violante-González, 2013; *Oswaldocruzia lopesi* Freitas and Lent, 1938; *Oswaldocruzia neghmei* Puga, 1981; *Oswaldocruzia*

urububaensis Guerrero, 2013 e *O. vitti*. Em comparação com estas, os nematódeos parasitos de *A. fuscuauratus* apresentam aletas laterais na região anterior do corpo, diferindo de *O. bonisi*, *O. brasiliensis*, *O. lopesi* e *O. neghmei* que não possuem aletas. Em relação as demais espécies, os espécimes deste estudo diferem principalmente quanto ao comprimento e a morfologia da lâmina espicular, apresentando 140–160 micrômetros de comprimento dos espículos e lâmina dividida em 3 processos distais que se bifurcam, diferentemente de *O. cartagoensis* (110–122 e 8 processos), *O. lamotheargumedei* (190–230 e 12 processos) e *O. urububaensis* (190–209 e 6–9 processos). A única espécie restante, *O. vitti*, é caracterizada pelo mesmo número de processos com bifurcação e é morfometricamente semelhantes aos espécimes encontrados em *A. fuscuauratus*. Adicionalmente, dentre as espécies com bolsa copuladora do Tipo I da região Neotropical, são relatadas em répteis apenas *O. brasiliensis* em *Mastigodryas bifossatus* (Raddi, 1820) (Colubridae) e *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnès, 1818) (Gekkonidae) no Brasil (RJ) e *O. vitti* em *Alopoglossus angulatus* (Linnaeus, 1758), *Alopoglossus atriventris* Duellman, 1973 (Alopoglossidae), *Anolis fuscuauratus*, *Anolis punctatus* Daudin, 1802 (Dactyloidae), *Cercosaura eigenmanni* (Griffin, 1917) e *Cercosaura oshaugnessyi* (Boulenger, 1885) (Gymnophthalmidae) no Brasil (AC, AM, PA, RO), no Equador e no Peru.

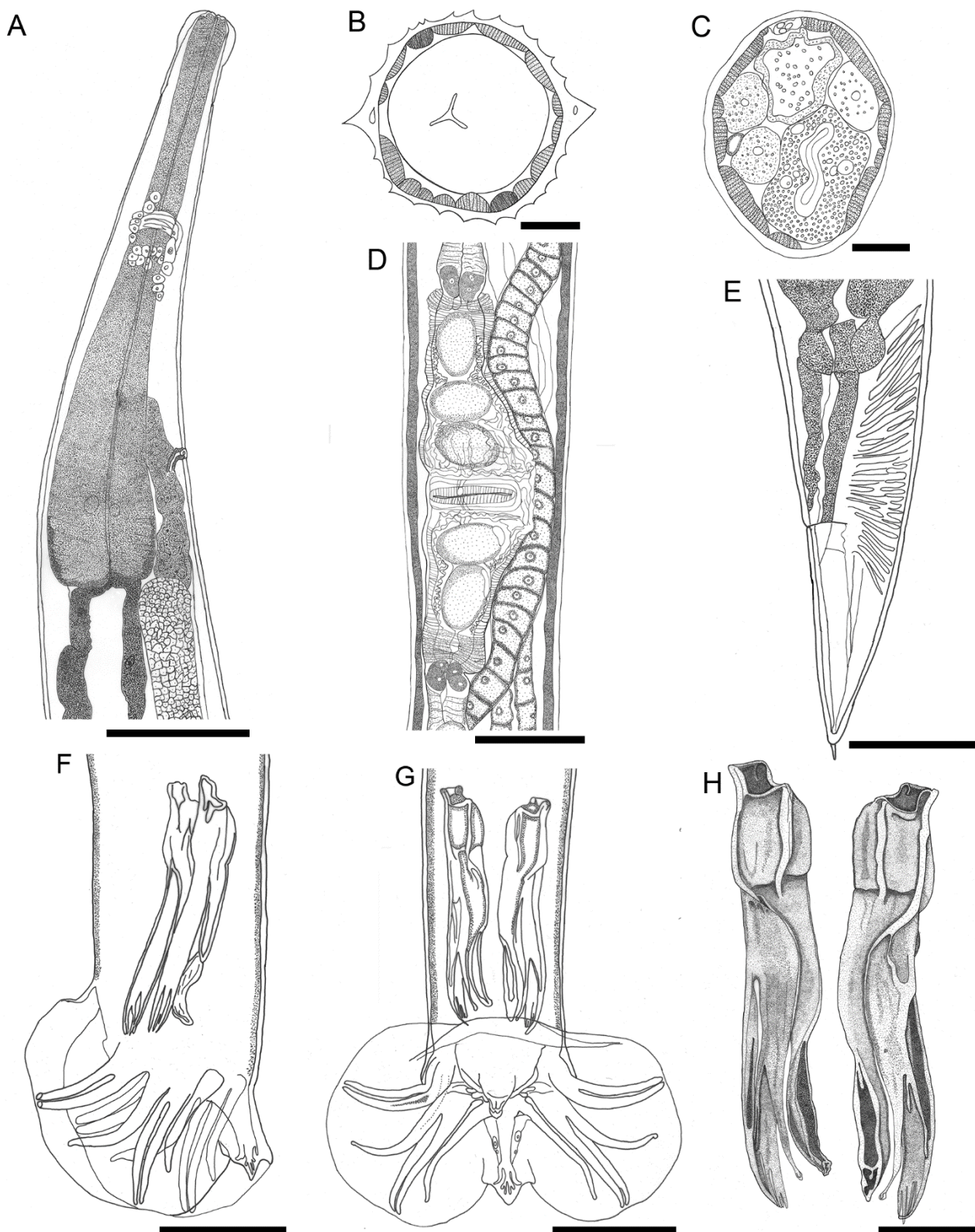


Figura 21 - Microscopia de Luz de *O. vitti* macho e fêmea parasito de *A. fuscauratus* da Flona de Caxiuanã: A. Visão lateral da região anterior (Barra = 100 μ m); B. Corte transversal na altura do esôfago, demonstrando a presença de aletas laterais (Barra = 20 μ m); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 μ m); D. Visão ventral da abertura da vulva e do ovojector (Barra = 100 μ m); E. Visão lateral da cauda da fêmea (Barra = 70 μ m); F. Visão lateral da bolsa copuladora do macho (Barra = 80 μ m); G. Visão ventral da bolsa copuladora (Barra = 80 μ m); H. Visão ventral dos espículos direito e esquerdo (Barra = 40 μ m).

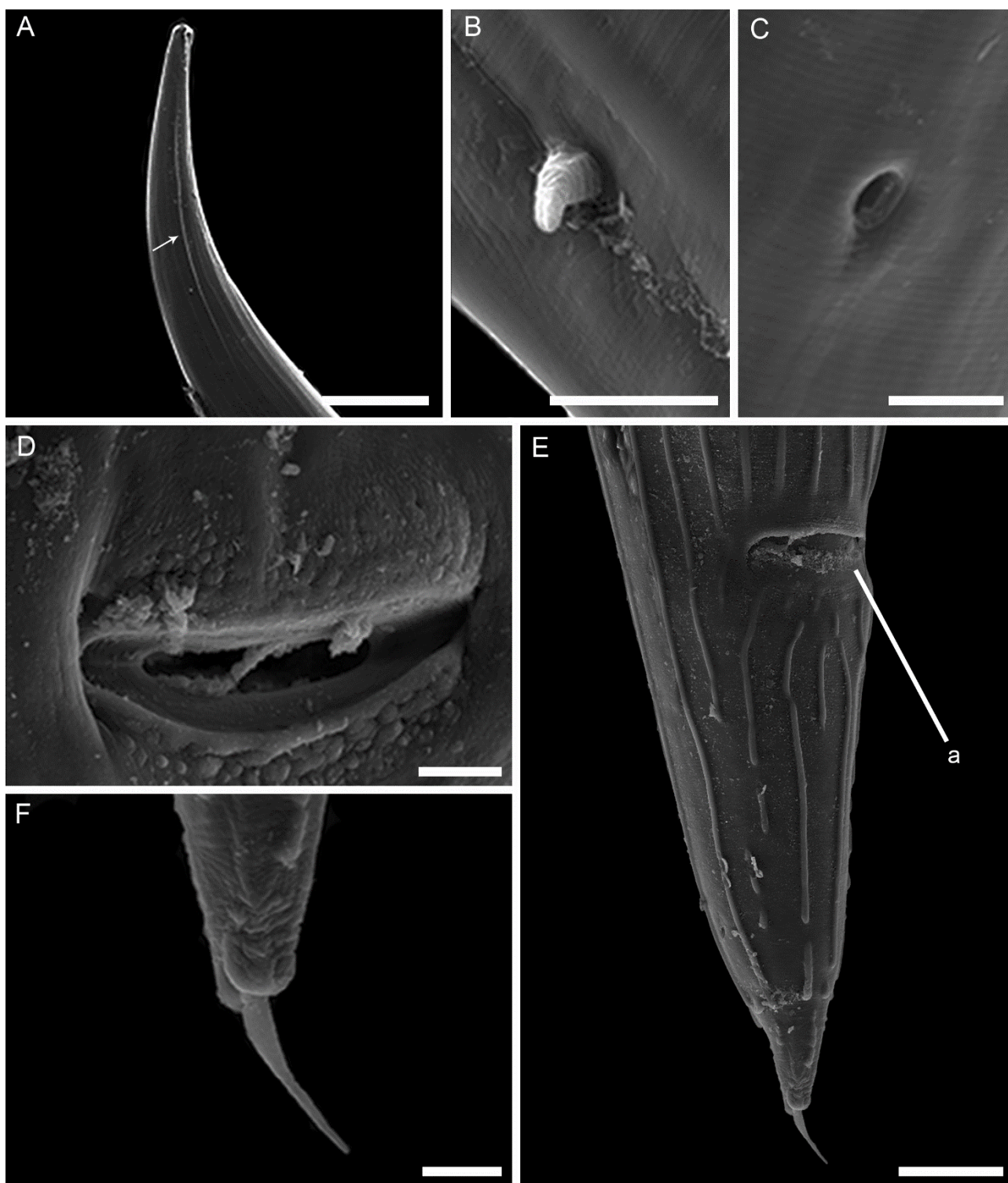


Figura 22 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. vitti* fêmea parasito de *A. fuscuauratus* da Flona de Caxiuanã: A. Detalhes da região anterior, indicando a presença de aleta lateral (seta) (Barra = 100 μ m); B. Detalhes do deirídio (Barra = 5 μ m); C. Poro excretor (Barra = 5 μ m); D. Detalhes da abertura da vulva (Barra = 5 μ m); E. Visão ventro-lateral da extremidade posterior, indicando a abertura do ânus (a) (Barra = 20 μ m); F. Detalhes do espinho cuticular na extremidade da cauda (Barra = 5 μ m).

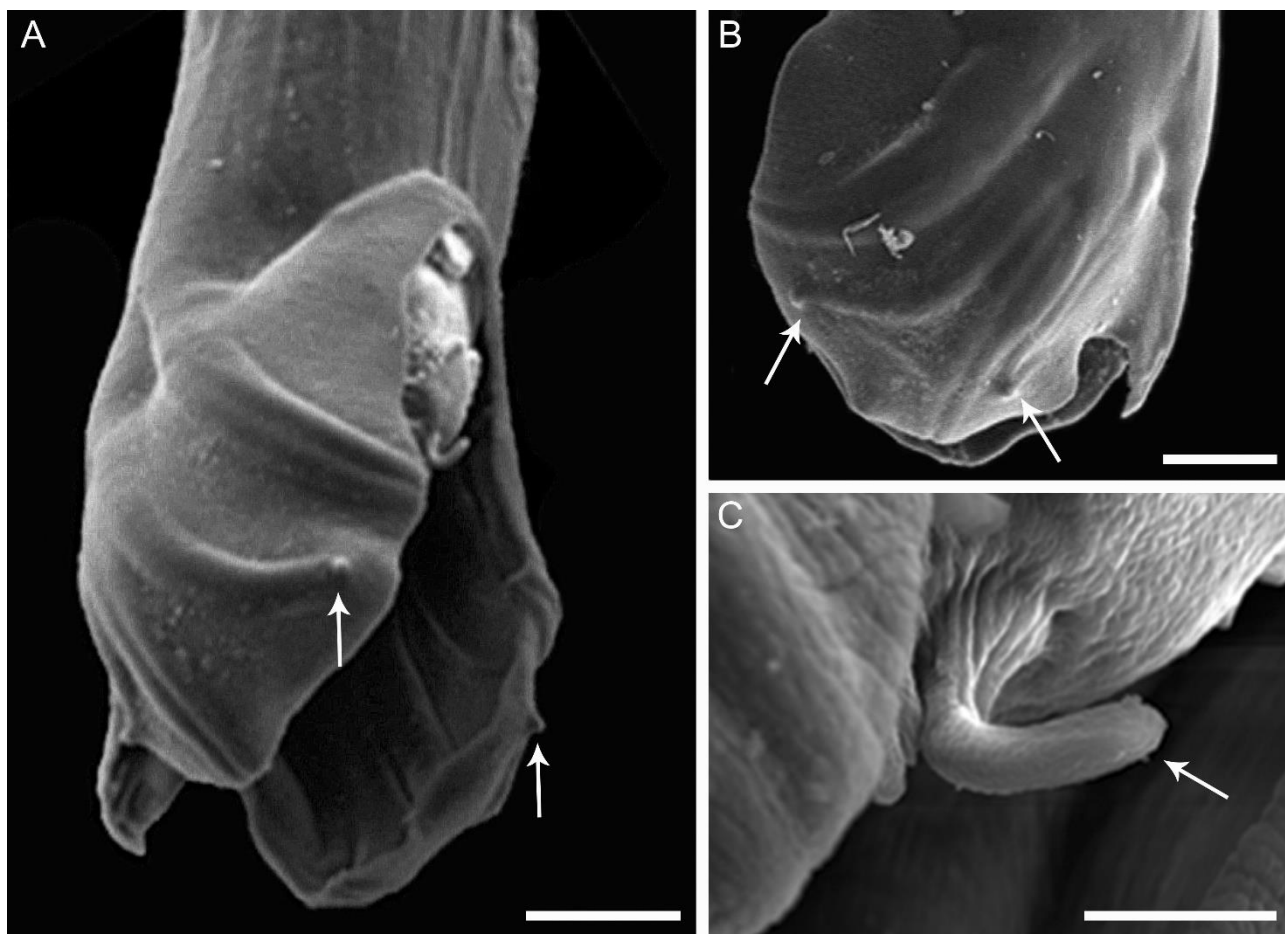


Figura 23 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *O. vitti* macho parasito de *A. fuscuauratus* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventrolateral da bolsa copuladora, indicando papilas bursais na extremidade dos raios 4 (setas) (Barra = 20 µm); B. Visão lateral da bolsa copuladora, indicando papilas bursais nas extremidades dos raios 4 e 8 (Barra = 20 µm); C. Detalhes da a papila zero (seta) na margem superior do cone genital (Barra = 5 µm).

***Oswaldocruzia* sp. nov. 1**

Hospedeiro: *Phyllomedusa vaillantii*

Sítio de Infecção: Intestino delgado

Localidade: Floresta Nacional de Caxiuanã (1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W)

Descrição geral: Helminthos delgados e filiformes. Extremidade anterior com dilatação cuticular vesiculosa bem desenvolvida, dividida em uma parte anterior mais larga e outra posterior mais estreita (Fig. 23A, B). Esôfago claviforme com anel nervoso situado no terço anterior (Figs. 23A, 26A, 27A). Poro excretor próximo do nível dos deirídios (Figs. 23A, D, 26A, 27A). Boca guarnecida com três lábios indistintos, cavidade não-quitinizada, dois pares papilas cefálicas e um par de anfídios. Cutícula com fina estriação transversal e cristas longitudinais bem desenvolvidas e aletas laterais ausentes (Figs. 23C, 26B, C, 27B, C). Fêmeas com vulva na metade posterior do corpo, ovojector bem desenvolvido, aparelho genital anfidelfo e úteros com ovos em estágio de mórula (Fig. 23E, 26D). Extremidade posterior cônica terminando com um espinho cuticular simples (Fig. 23F,

26E). Machos com bolsa copuladora trilobulada e simétrica de Tipo I, com raio 8 em um ramo independente do raio 6, sobrepondo-se ao mesmo por quase toda sua extensão, exceto na porção distal, sem contato com a extremidade da membrana bursal (Figs. 25A, B, 27D, F). Um par de papilas bursais presente entre os raios 3 e 4 (Fig. 25A). Cone genital bem desenvolvido, abrigando a papila zero na porção anterior e flaqueado pelos raios 7 reduzidos (Fig. 25C, 27E). Lobo dorsal dividido em raio 9 (anterior) e 10 (posterior) (Fig. 25D). Espículos iguais, envoltos por membrana hialina e divididos em “garfo”; “calçadeira” e “lâmina” (Figs. 25E, 27G, H, I, J).

Fêmeas (baseado em 20 espécimes) Comprimento total 6,2–11 (8,5) mm, largura na metade do corpo 91–148 (132). Comprimento da vesícula cefálica 68–80 (68). Comprimento do esôfago 379–485 (433). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 173–229 (200), 259–347 (311) e 293–363 (329), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,67–0,80 (0,78). Cutícula com 34–40 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 57–61 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 5 espécimes). Vulva pós-equatorial a 4,2–7,5 (6,1) mm da extremidade anterior. Comprimento da vagina vera 16–36 (24,3). Ovojector dividido em vestíbulo 229–427 (326), esfíncteres anterior 24–40 (32) posterior 24–38 (30) e infundíbulos anterior 42–48 (44) e posterior 38–45 (42). Úteros didelfos e anfidelfos, repleto de ovos. Ovos em mórula 59–73 (65) x 44–35 (40). Cauda cônica 110–166 (130) terminando em um espinho cuticular 8–13 (10).

Machos (baseado em 12 espécimes) Comprimento total 4,3–7 (5,7) mm, largura na metade do corpo 77–157 (127). Comprimento da vesícula cefálica 58–79 (68). Comprimento do esôfago 328–459 (382). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 157–203 (178), 256–347 (303) e 280–360 (319), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,67–0,81 (0,74). Cutícula com 31–37 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 35–42 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 5 espécimes). Espículos direito e esquerdo 123–155 (144) e 126–154 (144) respectivamente. Lâmina com cinco processos distais e garfo com bifurcação no terço posterior, correspondendo a aproximadamente 23% do comprimento total do espículo.

Destaques: Os nematódeos parasitos de *Phyllomedusa vaillantii* estão entre as dez espécies neotropicais continentais que apresentam bolsa copuladora do Tipo III: *O. albareti*; *O. anolisi*; *O. baina*; *O. brevispicula*; *O. cassonei*; *O. chabaudi*; *O. chambrieri*; *O. jeanbarti*; *O. lenteixeirai*; *O. petterae*; *O. subauricularis*; *O. taranchoni*; *O. tcheprakovae*. Dentre estas espécies, apenas *O. albareti*, *O. chabaudi* e *O. lenteixeirae* já foram reportados parasitando anuros da Família Hylidae (Ben Slimane et al. 1996; Campiao et al. 2014). Os nematódeos encontrados parasitando *P. vaillantii* diferem de *O. anolisi*, *O. brevispicula*, *O. jeanbarti* e *O. subauricularis* por não apresentar aletas laterais e de *O. baina*, *O. cassonei*, *O. lenteixeirae*, *O. taranchoni* e *O. tcheprakovae* em

relação à morfologia lâmina espicular, considerando que estas espécies apresentam lâmina bifurcada ou espatulada. Ainda considerando a morfologia espicular, os parasitos de *P. vaillantii* diferem de *O. petterae* que apresenta 6 processos distais na lâmina e de *O. albareti*, *O. chabaudi*, *O. chambrieri*, em relação ao tamanho dos espículos. Desta forma, ao considerar a morfologia e a especificidade das espécies para as famílias de anfíbios, consideramos que os nematódeos parasitos de *P. vaillantii* sejam de uma nova espécie ainda não descrita.

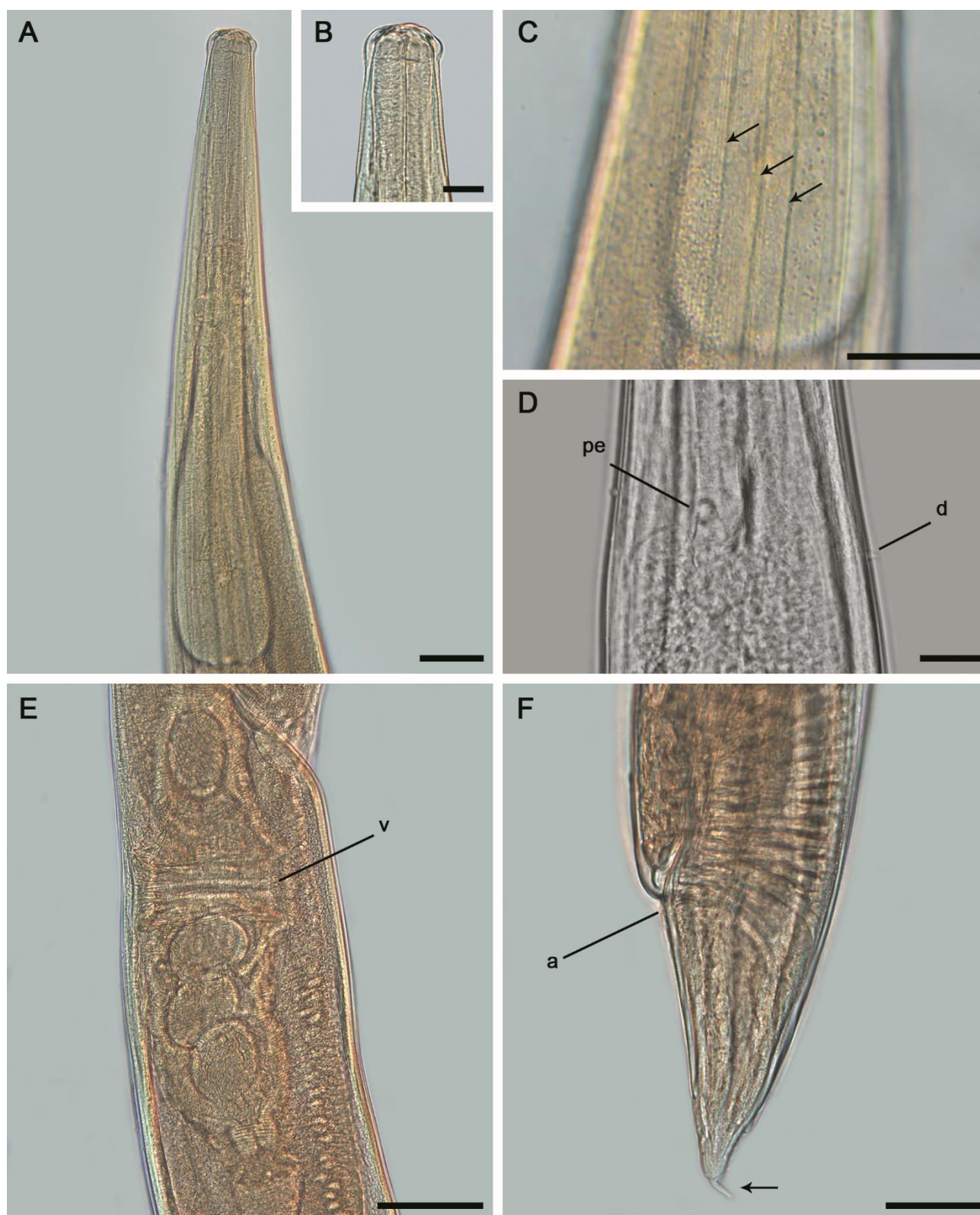


Figura 24 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 fêmea parasito de *P. vaillantii* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior do corpo, demonstrando o esôfago claviforme (Barra = 50 µm); B. Detalhes da vesícula cefálica (Barra = 20 µm); C. Cristas longitudinais na superfície cuticular (Barra = 50 µm); D. Detalhes do poro excretor (pe) e do deirídio (d) (Barra = 20 µm); E. Visão ventral da abertura da vulva (v) e do ovojector (Barra = 100 µm); F. Visão lateral da extremidade posterior, indicando a abertura do ânus (a) e o espinho cuticular terminal (seta) (Barra = 40 µm).

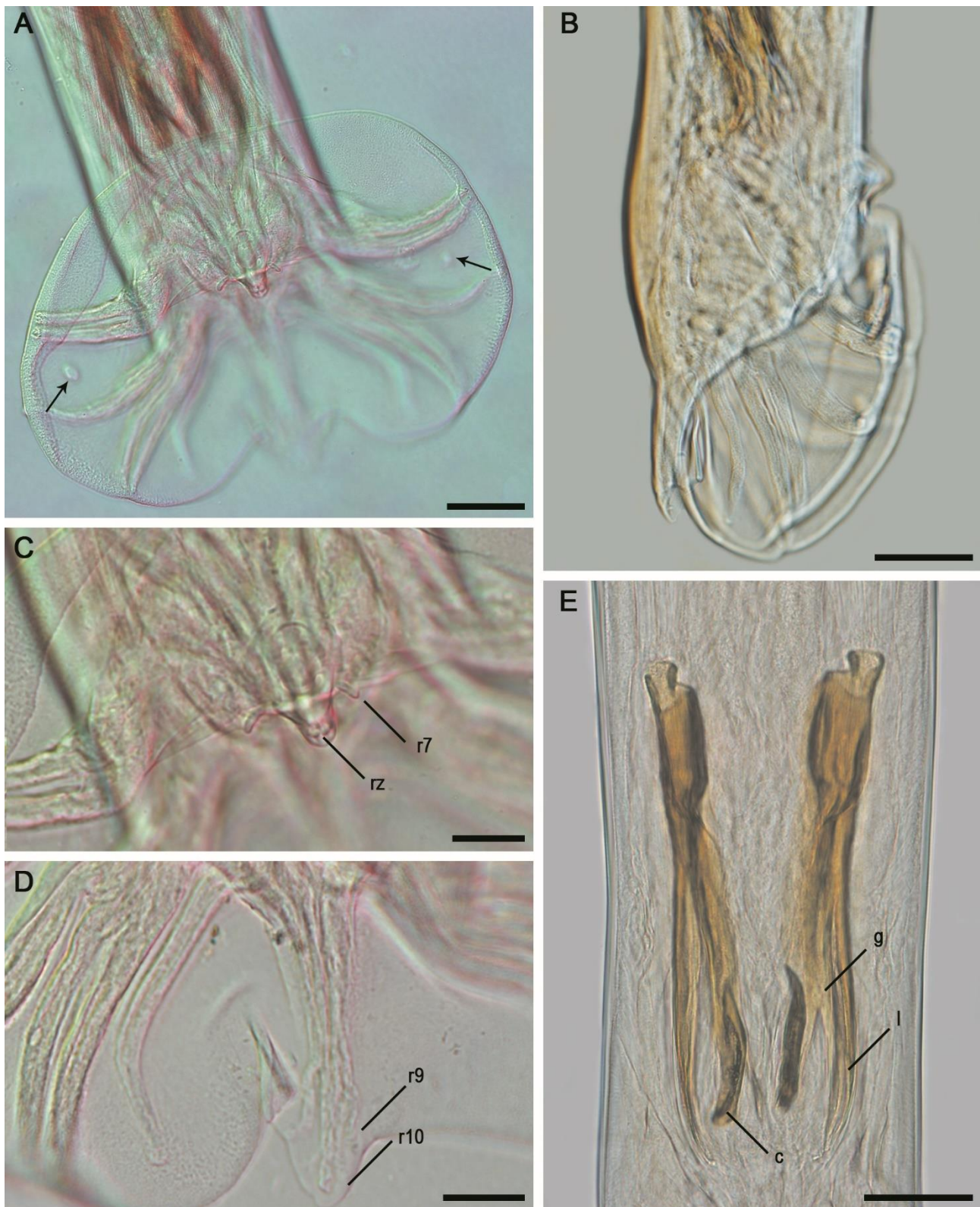


Figura 25 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov 1 macho parasito de *P. vaillantii* da Flona de Caxiuana: A. Visão ventral da bolsa copuladora, indicando a presença de papilas bursais (Barra = 40 μ m); B. Visão lateral da bolsa copuladora, demonstrando a distribuição dos raios bursais (Barra = 40 μ m); C. Detalhes do cone genital, destacando os raios sete (r7) e zero (rz) (Barra = 20 μ m); D. Visão do lobo dorsal destacando os raios 9 (r9) e 10 (r10) (Barra = 20 μ m); E. Visão ventral dos espículos, indicando a lâmina (l), garfo (g) e calçadeira (c) (Barra = 40 μ m).

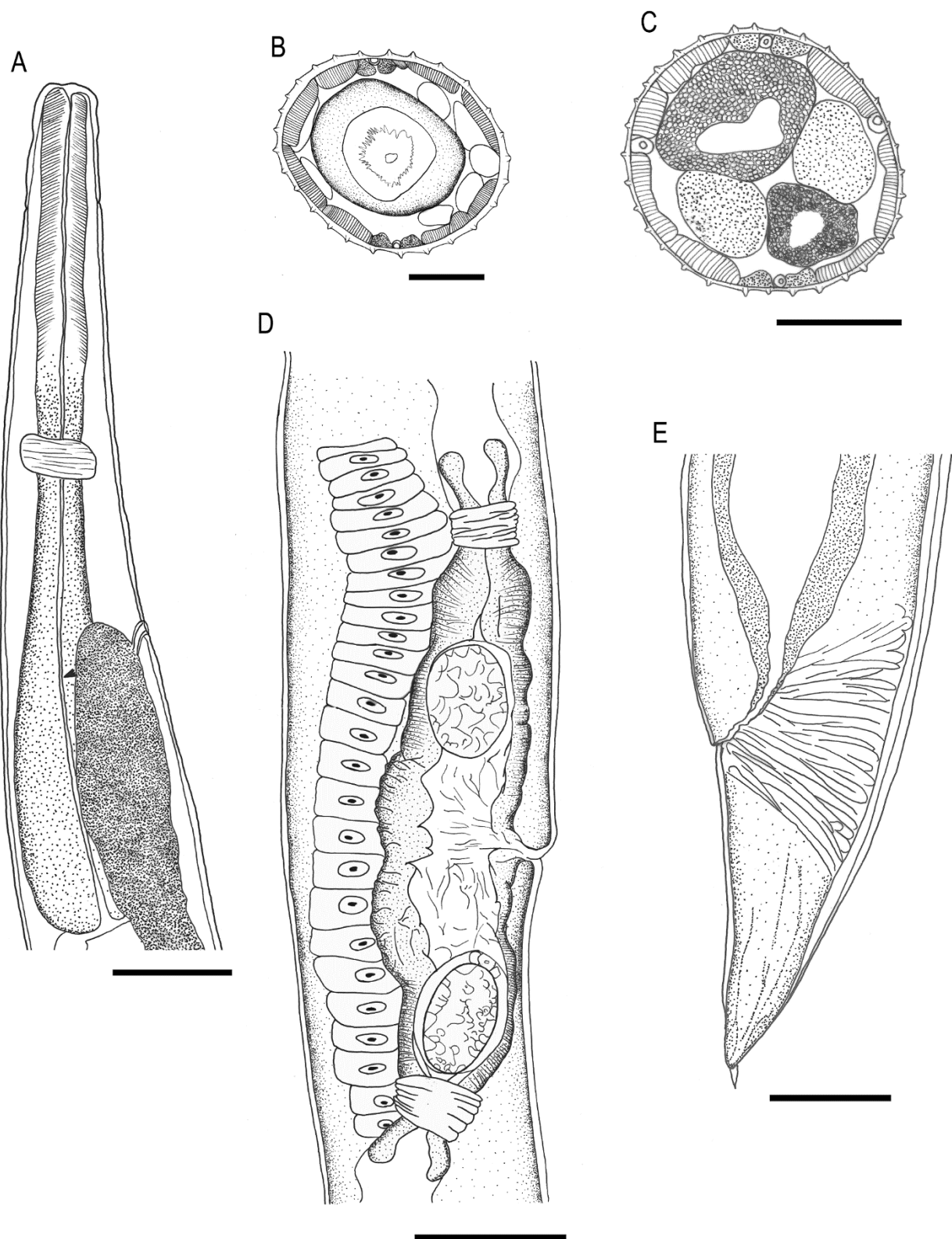


Figura 26 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 fêmea parasito de *P. vaillantii* da Flona de Caxiuana: A. Visão lateral da região anterior do corpo, indicando o esôfago, o anel nervoso, o poro excretor e deirídios (Barra = 50 μ m); B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 30 μ m); C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 μ m); D. Visão lateral da abertura vulva e do ovojector (Barra = 100 μ m); E. Visão lateral da região posterior, destacando o ânus e o espinho caudal (Barra = 50 μ m).

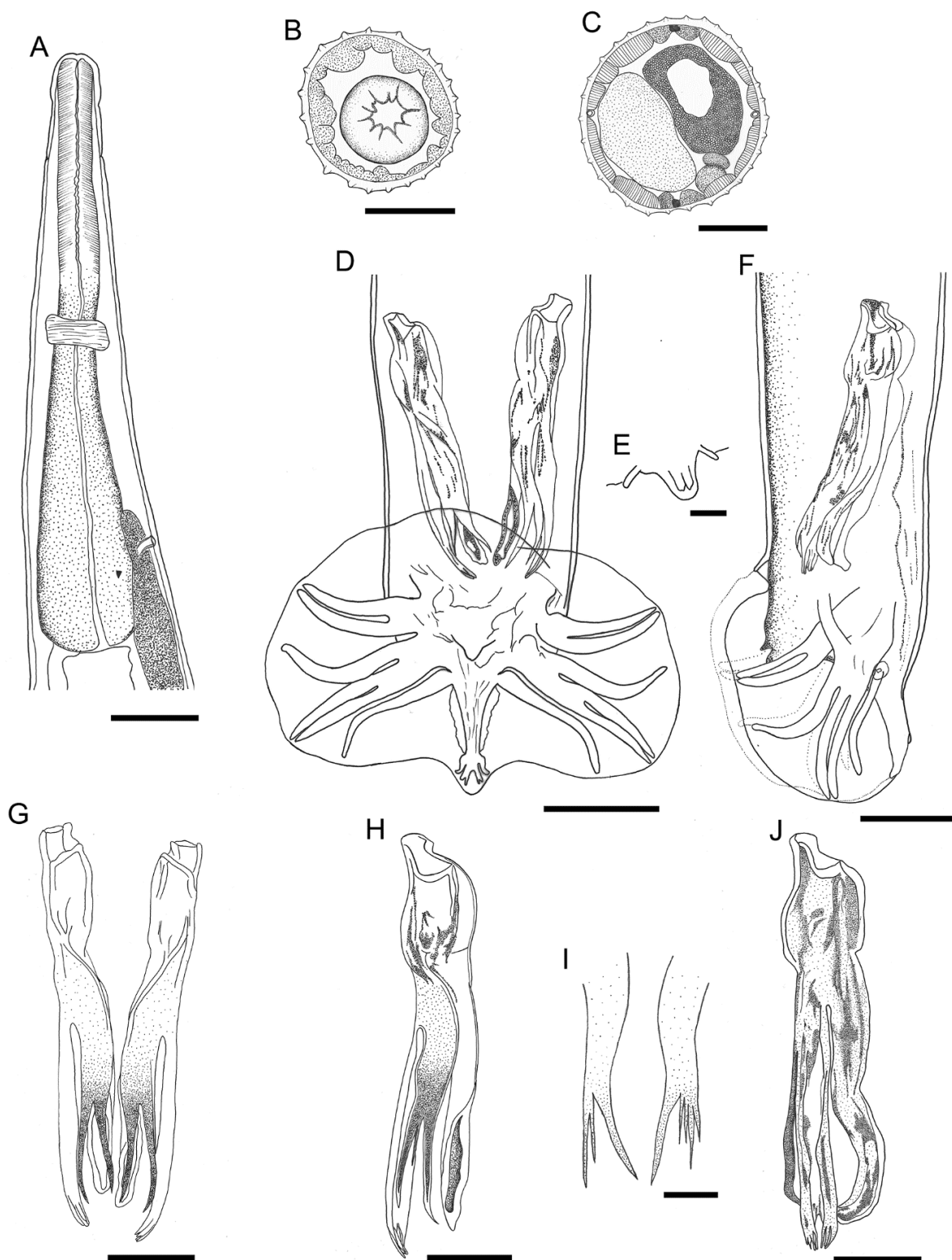


Figura 27 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 macho parasito de *P. vaillantii* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior, destacando o esôfago, o anel nervoso, o poro excretor e os deirídios (Barra = 75 μ m). B. Corte transversal na altura do esôfago (Barra = 30 μ m). C. Corte transversal na metade do corpo (Barra = 40 μ m). D. Visão ventral da bolsa copuladora (Barra = 25 μ m). E. Cone genital (Barra = 5 μ m). F. Visão lateral da bolsa copuladora (Barra = 50 μ m). G. Visão ventral dos espículos direito e esquerdo (Barra = 40 μ m). H. Detalhes do espículo direito, demonstrando a divisão dos três ramos principais (Barra = 40 μ m). I. Detalhes do garfo, destacando as projeções secundárias (Barra = 5 μ m). J. Visão dorsal do espículo direito (Barra = 40 μ m).

***Oswaldocruzia* sp. nov. 2**

Hospedeiros: *Osteocephalus oophagus*

Sítio de Infecção: Intestino delgado

Localidade: Floresta Nacional de Caxiuanã (1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W)

Descrição geral: Helmintos delgados e filiformes. Extremidade anterior com dilatação cuticular vesiculosa bem desenvolvida, dividida em uma parte anterior mais larga e outra posterior mais estreita (Fig. 28A, B). Esôfago claviforme com anel nervoso situado no terço anterior (Fig. 28A). Poro excretor próximo do nível dos deirídios (Fig. 28C). Boca guarnecida com três lábios indistintos, cavidade não-quitinizada, dois pares papilas cefálicas e um par de anfídios. Cutícula com fina estriação transversal e cristas longitudinais bem desenvolvidas e aletas laterais ausentes. Fêmeas com vulva na metade posterior do corpo, ovojector bem desenvolvido, aparelho genital anfidelfo e úteros com ovos em estágio de mórula (Fig. 28D). Extremidade posterior cônica terminando com um espinho cuticular simples (Fig. 28E). Machos com bolsa copuladora trilobulada e simétrica de Tipo II, com raio 8 em um ramo independente do raio 6, sobrepondo-se ao mesmo por quase toda sua extensão, exceto na porção distal, sem contato com a extremidade da membrana bursal (Fig. 29A). Papilas bursais entre os raios 3 e 4 ausentes. Cone genital bem desenvolvido, abrigando a papila zero na porção anterior e flaqueado pelos raios 7 reduzidos. Lobo dorsal dividido em raio 9 (anterior) e 10 (posterior) (Fig. 14D). Espículos iguais, envoltos por membrana hialina e divididos em “garfo”; “calçadeira” e “lâmina” (Fig. 29B, C, D).

Fêmeas (baseado em 10 espécimes) Comprimento total 9,3–15,2 (12) mm, largura na metade do corpo 137–165 (157). Comprimento da vesícula cefálica 56–72 (63). Comprimento do esôfago 373–461 (428). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 133–205 (178), 297–384 (338) e 336–411 (363), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,79–0,83 (0,81). Cutícula com aproximadamente 29 cristas em secção transversal no nível do esôfago, 50 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 1 espécime). Vulva pós-equatorial a 6,6–10,5 (8,5) mm da extremidade anterior. Comprimento da vagina vera 20–35 (22). Ovojector dividido em vestíbulo 300–379 (339), esfíncteres anterior 24–39 (30) posterior 21–38 (33) e infundíbulos anterior 22–51 (42) e posterior 39–45 (42). Úteros didelfos e anfidelfos, repleto de ovos. Ovos em mórula 48–59 (53) x 32–37 (34). Cauda cônica 107–179 (141) terminando em um espinho cuticular 11–16 (12).

Machos (baseado em 10 espécimes) Comprimento total 4,9–7,2 (6) mm, largura na metade do corpo 91–149 (108). Comprimento da vesícula cefálica 40–56 (51). Comprimento do esôfago 312–387 (350). Anel nervoso, poro excretor e deirídios à 139–160 (151), 256–315 (281) e 264–333 (295), respectivamente da extremidade anterior. Razão entre a distância do poro excretor e o comprimento do esôfago 0,82–0,81 (0,8). Cutícula com 21 cristas em secção transversal no nível do esôfago,

aproximadamente 30 na metade do corpo e aletas laterais ausentes (observado em 1 espécime). Espículos direito e esquerdo 134–162 (147) e 134–164 (145) respectivamente. Lâmina com 3 processos distais e garfo com bifurcação no terço posterior, correspondendo a aproximadamente 24% do comprimento total do espículo.

Destaques: Dentre as 22 espécies com bolsa copuladora do Tipo II da região Neotropical, os parasitos de *R. marina* diferem de *O. barusi*, *O. dorsarmata*, *O. marechali*, *O. mauleoni*, *O. moravecii* e *O. nicaraguensis* que apresentam morfologia espicular característica do grupo Neotropical Caribenho. Das espécies restantes, os parasitos de *O. oophagus* não apresentam aletas laterais, diferindo de *O. benslimanei*, *O. burseyi*, *O. costaricensis*, *O. dlouhyi*, *O. fredii*, *O. lanfrediae*, *O. manuensis*, *O. panamaensis*, *O. peruensis*, *O. touzeti*, *O. vaucheri* e *O. venezuelensis*. Diferem também de *O. lescurei* e pela disposição das papilas cefálicas. Em relação ao número de projeções da lâmina, os parasitos de *O. oophagus* apresentam 3 processos distais na lâmina espicular diferentemente de *O. belenensis* (4 processos), *O. lescurei* (6 processos), *O. mazzai* (10 processos) e *O. proencai* (numerosos processos). Desta forma, os espécimes de *Oswaldocruzia* parasitos de *O. oophagus* representam uma nova espécie ainda não descrita.

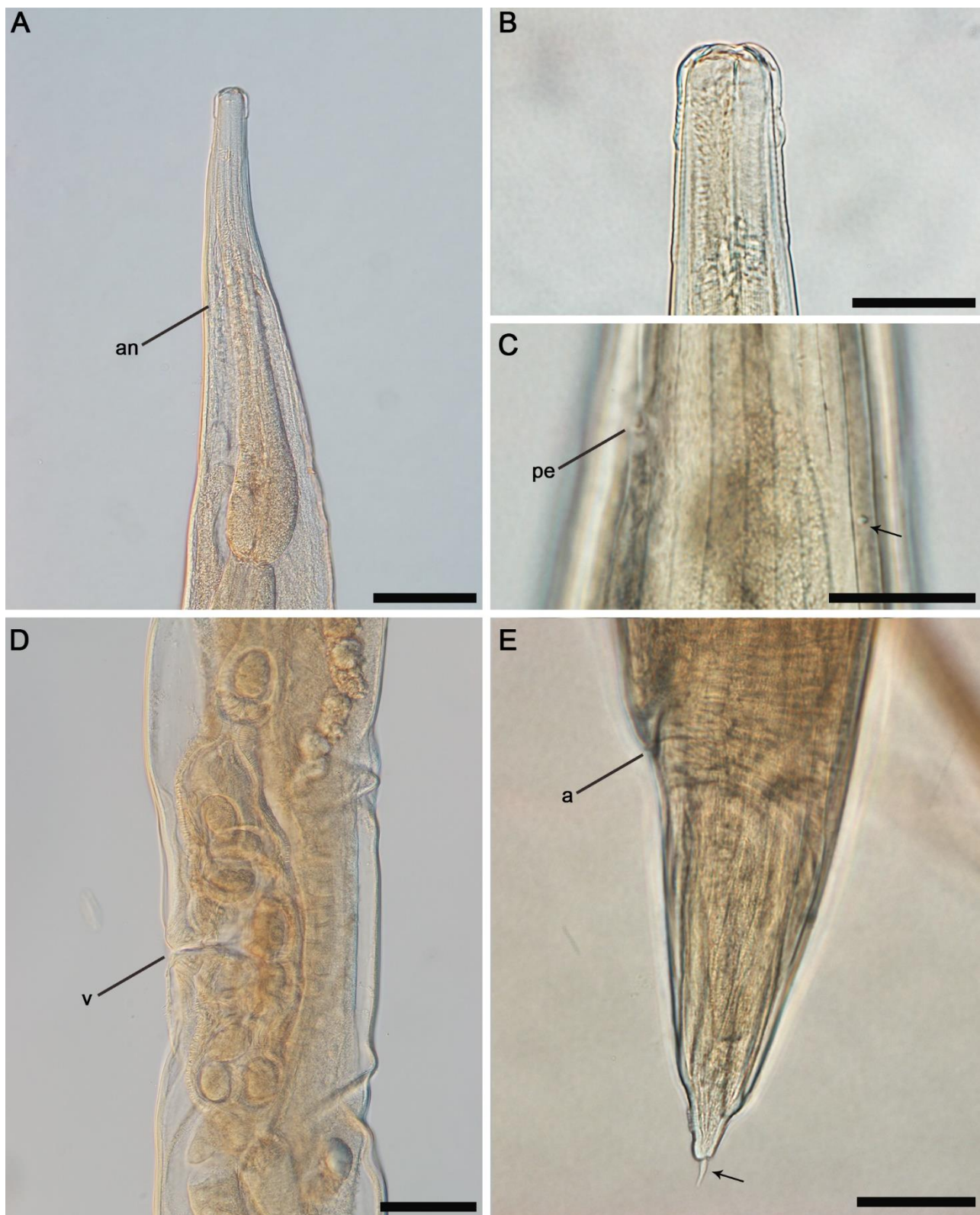


Figura 28 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. 2 fêmea parasito de *O. oophagus* da Flona de Caxiuanã: A. Região anterior, indicando o anel nervoso (an) (Barra = 100 μ m); B. Detalhes da vesícula cefálica (Barra = 40 μ m); C. Detalhes da superfície cuticular, destacando o poro excretor (pe) e o deirídio (seta) (Barra = 40 μ m); D. Detalhes do sistema reprodutor feminino indicando a abertura da vulva (v) e o ovojector (Barra = 100 μ m); E. Região posterior, indicando a abertura do o ânus (a) e o espinho cuticular terminal (seta) (Barra = 50 μ m).

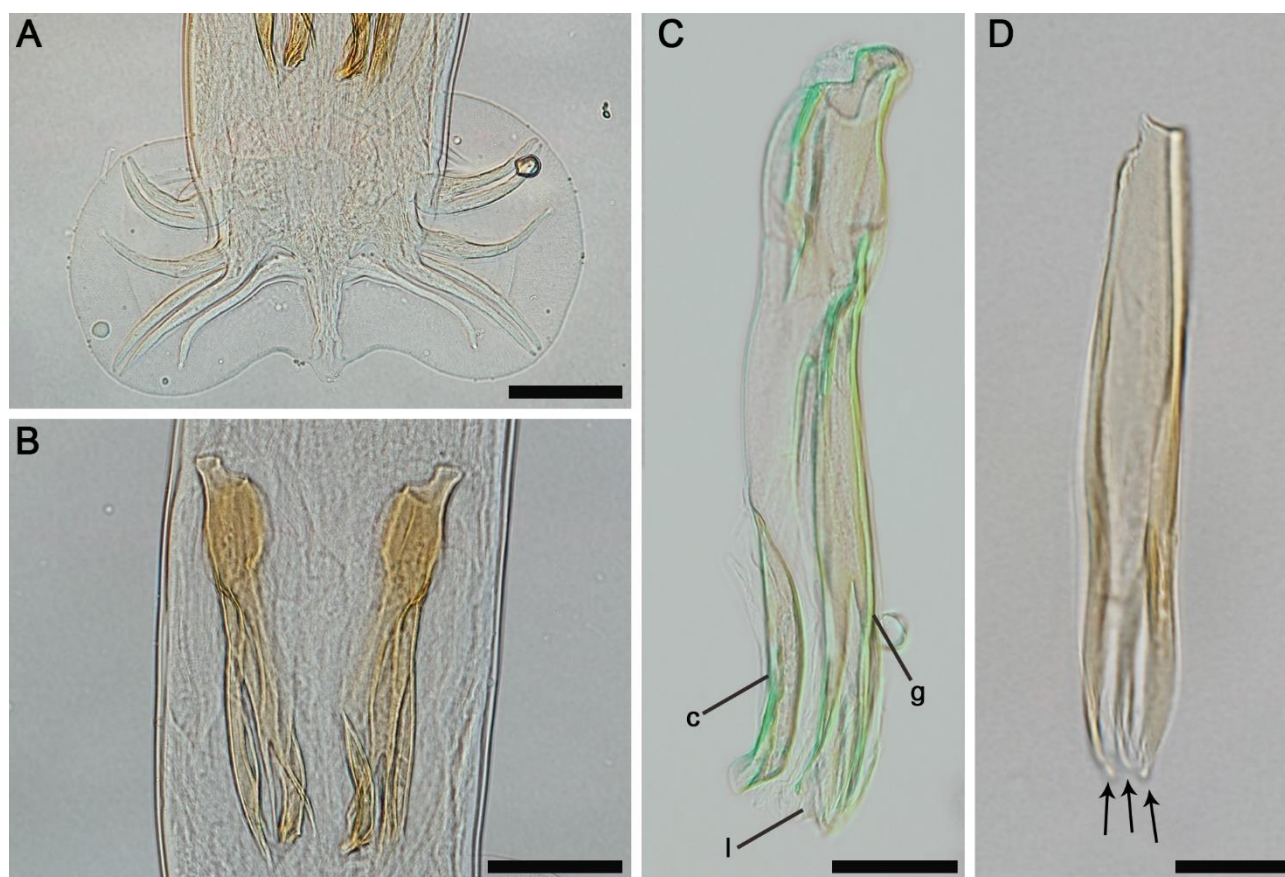


Figura 29 - Microscopia de Luz de *Oswaldocruzia* sp. nov. ♂ macho parasito de *O. oophagus* da Flona de Caxiuanã: A. Visão ventral da bolsa copuladora (Barra = 40 µm); B. Visão ventral dos espículos dentro do corpo (Barra = 40 µm); C. Detalhes da estrutura do espículo direito, destacando o “garfo” (g), a “calçadeira” (c) e a “lâmina” (l) (Barra = 20 µm); D. Lâmina espicular isolada demonstrando as projeções na porção distal (Barra = 10 µm).

O alinhamento das sequências de COI teve um comprimento total de 654 pares de base (bp) com o comprimento das sequências variando entre 654 bp nas sequências dos nematódeos parasitos de *T. typhoni* and *S. baudinii* e 747 bp nos nematódeos parasitos de *B. wavrini*. A análise comparativa por alinhamento pareado das sequências de *Oswaldocruzia* demonstra diferenças significativas entre as novas sequências obtidas e a maioria das sequências disponíveis publicamente no GenBank.

Nossas sequências de *Oswaldocruzia* apresentam elevados valores de divergência genética (distância-p) em comparação com as sequências de parasitos de anfíbios do México depositadas por Prosser et al. (2013), variando entre 11,5 a 13,8% de divergência. A sequência obtida para *K. hylae* também apresentou altos níveis de divergência genética, variando entre 12 e 13,2% comparadas às sequências de Prosser et al (2013) e entre 11,7 a 13,2% comparadas as demais sequências do conjunto de dados (Tabela 2).

Tabela 2 – Estimativas de divergência genética (distâncias-p) entre as sequências de Citocromo c Oxidase Subunidade I de *Oswaldocruzia* e *Kentropyxia*, parasitos de anfíbios e répteis.

Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>O. belenensis</i> MK492915	-																	
2. <i>O. belenensis</i> MK492916	0.03	-																
3. <i>O. belenensis</i> MK492917	0.01	0.03	-															
4. <i>O. belenensis</i> MK492918	0.00	0.03	0.01	-														
5. <i>O. chabaudi</i> MK492919	0.07	0.08	0.07	0.07	-													
6. <i>O. chabaudi</i> MK492920	0.07	0.08	0.07	0.07	0.01	-												
7. <i>O. chambrieri</i> KU980934	0.02	0.03	0.03	0.03	0.07	0.07	-											
8. <i>O. chambrieri</i> MK492921	0.03	0.04	0.03	0.03	0.07	0.07	0.00	-										
9. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130687	0.13	0.14	0.12	0.12	0.13	0.14	0.13	0.13	-									
10. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130698	0.12	0.13	0.12	0.12	0.13	0.13	0.12	0.12	0.01	-								
11. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130704	0.13	0.14	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.01	0.01	-							
12. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130711	0.13	0.14	0.13	0.12	0.12	0.13	0.12	0.13	0.02	0.02	0.02	-						
13. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130712	0.12	0.14	0.12	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.01	0.01	0.01	0.01	-					
14. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130713	0.13	0.14	0.12	0.12	0.12	0.13	0.13	0.13	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	-				
15. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130714	0.13	0.14	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	-			
16. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130715	0.13	0.14	0.13	0.12	0.13	0.14	0.13	0.13	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	-		
17. <i>Oswaldocruzia</i> sp. KC130716	0.13	0.14	0.13	0.12	0.13	0.13	0.12	0.13	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	-	
18. <i>K. hylae</i> MK492922	0.12	0.13	0.13	0.12	0.13	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	-

O modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais adequado escolhido tanto pelo AIC quanto pelo BIC para a Máxima Verossimilhança (ML) foi o TPMluf+G com parâmetros de frequência otimizados, categorias de quatro taxas, e parâmetros *Gamma shape* parameter estimados (0.0630). O critério de ML resultou em uma topologia com o *score* $-\ln L = 2021,5783$ (Fig. 30).

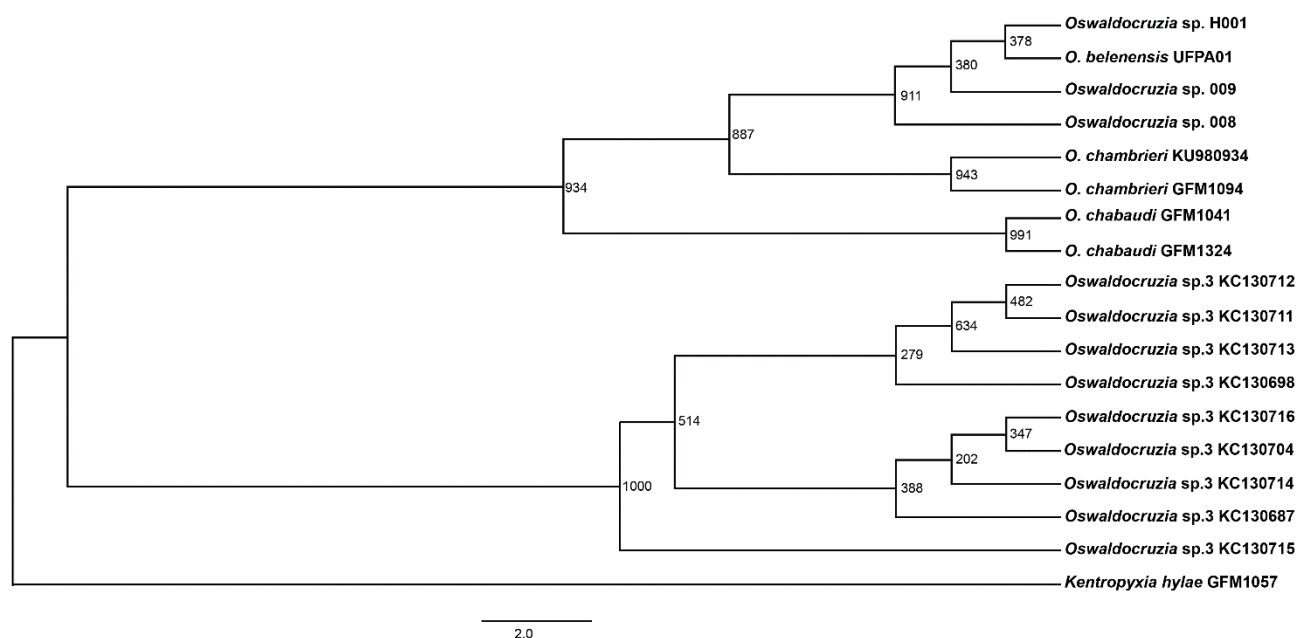


Figura 30 – Árvore filogenética por critério de Máxima Verossimilhança (ML) de *Oswaldocruzia* baseada na região codificante da enzima Citocromo c Oxidase Subunidade I do DNA mitocondrial.

Os modelos evolutivos escolhidos para a Inferência Bayesiana foram: TrN+I+G para a

primeira posição do códon, F81+I para a segunda posição do códon, and HKY+G para a terceira posição do códon, todos os modelos com desvios de frequência e parâmetros de estado. As cadeias Markovianas forneceram tamanhos amostrais estimados altamente significativos (ESS) para todos os parâmetros. (Fig. 31)

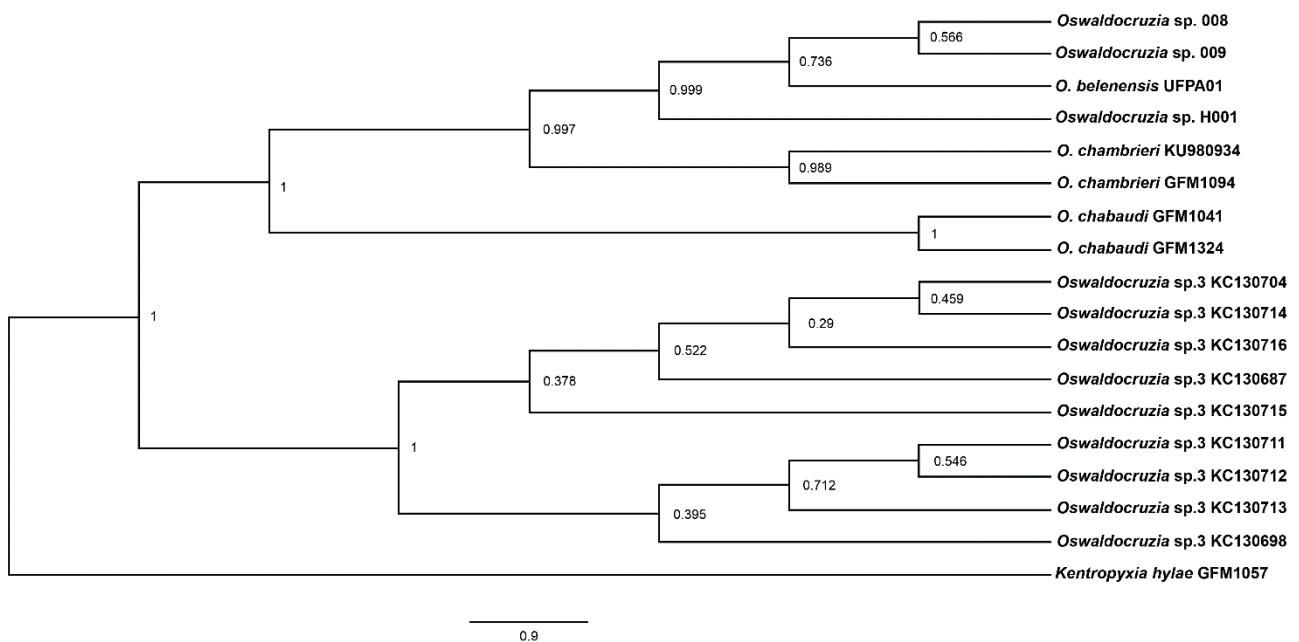


Figura 31 - Árvore filogenética por Inferência Bayesiana (BI) de *Oswaldocruzia* baseada na região codificante da enzima Citocromo c Oxidase Subunidade I do DNA mitocondrial.

Ambas as topologias, baseadas em COI, inferidas com dois métodos diferentes (ML e BI), resultaram em topologias similares com pequenas variações na organização dos nós e em seus respectivos valores de suporte.

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas têm sido levantadas preocupações quanto ao ‘impedimento taxonômico’ na zoologia, um problema causado pela potencial diminuição global de profissionais em sistemática e taxonomia, resultado de vários fatores como o não reconhecimento da importância da taxonomia na ciência básica, o corte de investimentos governamentais, a diminuição do interesse de algumas revistas e no decréscimo do número de jovens pesquisadores que ingressam na pesquisa taxonômica (Wägele et al. 2011).

Vários dos problemas que estão associados ao impedimento taxonômico na zoologia em geral, afetam também a sistemática parasitológica: A existência de uma lacuna temporal entre a coleta e a descrição formal de novas espécies, que varia para cada táxon e é influenciada pela disponibilidade de profissionais e material em coleções e abundância dos taxa (Fontaine et al. 2012). A irreprodutibilidade de alguns trabalhos que não fornecem informações que justifiquem as decisões taxonômicas ou garantam a identificação correta dos organismos em estudo, que é frequente em trabalhos ecológicos (Vink et al. 2012). A existência de classificações e nomenclaturas que não seguem os procedimentos e regras apropriadas estabelecidas nos respectivos códigos internacionais de nomenclatura (Bortolous 2008) e, por fim, a instabilidade taxonômica (Morrison et al. 2009), que pode afetar não somente as pesquisas em diferentes áreas da ciência que utilizam os trabalhos taxonômicos, como também decisões políticas para a conservação.

Brooks e Hoberg (2001) ao fazerem uma análise das oportunidades e obstáculos para a sistemática parasitológica no século XXI, apontam que o aumento do número de estudos utilizando informações filogenéticas no final do século XX não trouxe, necessariamente, um aumento similar na robustez destas análises. Segundo os autores o entusiasmo e a demanda do uso deste tipo de informação se tornaram muito superiores ao número de sistematistas profissionais, com conhecimento teórico suficientemente abrangente e capazes de combinar dados de diferentes fontes, para gerar interpretações filogenéticas mais robustas ou até reinterpretar os resultados obtidos.

Em contraste, para uma ampla gama de taxa, o número de pesquisadores envolvidos em descrições taxonômicas está aumentando mais rápido que o número de novas espécies descritas por ano e o número médio de novas espécies descritos para cada taxonomista por ano tem diminuído de forma constante, o que está relacionado ao aumento do esforço para alcançar descrições de espécies cada vez mais abrangentes (Poulin 2014). Para helmintos parasitos em particular, o número médio de novas espécies descritas anualmente por autor aumentou de forma constante nas últimas três décadas, impulsionado por avanços tecnológicos em estudos moleculares e o aumento na disponibilidade de Microscopia Eletrônica de Varredura (Poulin e Presswell 2016).

Além disso, estudos com vários grupos de nematódeos parasitos têm demonstrado alta

eficiência na utilização do gene mitocondrial COI para distinguir espécies e inferir relações filogenéticas (Chaudhary et al. 2017; Machado et al. 2018, Müller et al. 2018).

O gênero *Oswaldocruzia* foi criado por Travassos em 1917 ao remover algumas espécies do gênero *Strongylus*, propondo novas combinações taxonômicas e estabelecendo *Oswaldocruzia subauricularis* como espécie tipo do gênero, entretanto não foram estabelecidos caracteres diagnóticos para o gênero. Posteriormente, Travassos (1922) realocou várias outras espécies para o gênero a partir de outros gêneros taxonomicamente mal resolvidos, porém ainda sem claras definições morfológicas para o gênero. Além disso, parte dos trabalhos posteriores que descreviam novas espécies para o gênero limitaram-se apenas a definição de caracteres de delimitação específica.

Vicente (1991), Ben Slimane et al. (1996) e Anderson et al. (2009) compilaram as principais características morfológicas utilizadas para a diagnose do gênero, tais como o esôfago claviforme, a vesícula cefálica dividida em duas porções, a presença de cristas longitudinais compondo o sinlofe na cutícula, ausência de gubernáculo no macho e os espículos robustos divididos em três partes que são envolvidas por uma membrana hialina. Com base nestes trabalhos, atribuímos as espécies do presente estudo ao gênero *Oswaldocruzia*.

As filogenias inferidas usando ML e BI resultaram em topologias semelhantes. Duas grandes linhagens foram recuperadas em *Oswaldocruzia* com pequena variação nos nós e os respectivos valores de suporte: um clado na qual estão incluídas as sequências do México (KC130687, KC130698, KC130704, KC130711, KC130712, KC130713, KC130714, KC130715 e KC130716) e outro clado da Amazônia na qual estão incluídas nossas novas sequências (MK492915, MK492916, MK492917, MK492918, MK492919, MK492920 e MK492921) e a sequência de *O. chambrieri* parasito de *R. margaritifera* da Flona de Caxiuanã (KU980934).

As novas sequências de *Oswaldocruzia* obtidas também apresentaram elevados valores de divergência genética em comparação com as sequências de parasitos de anfíbios do México, variando entre 12 a 14% assim como em relação à sequência de *K. hylae*, variando entre 11 a 12%. Assim, distância filogenética e os altos valores de divergência observados entre as novas sequências de *Oswaldocruzia* e as sequências do México, bem como a nova sequência de *K. hylae*, sugerem que esse nível de diferenças pode exceder a variabilidade genética existente em *Oswaldocruzia*.

Um fator que poderia refletir nas diferenças observadas entre os dois cladogramas seria a existência de caracteres morfológicos muito conservados compartilhados entre os gêneros *Kentropyxia* e *Oswaldocruzia*, como indicado por Feitosa et al. (2015), que destacaram a semelhança da morfologia das cristas longitudinais do sinlofe e a presença de bolsa copuladora de tipo I, apontada como um estado plesiomórfico pelos autores, e que podem levar a diagnoses equivocadas.

O estudo da morfologia espicular dos espécimes o clado de sequências do México poderia esclarecer aspectos importantes da taxonomia de *Oswaldocruzia*. Entretanto, essas sequências foram

depositadas por Prosser et al. (2013) como resultado do desenvolvimento de um coquetel de *primers* para amplificação de DNA mitocondrial e os autores não forneceram nenhum dado morfológico referente aos espécimes utilizados. Para este clado, ambas as topologias demonstraram baixa resolução, arranjos incongruentes de nós e baixos valores de suporte.

Assim, distância filogenética e os altos valores de divergência observados entre o clado do México e o clado da Amazônia poderiam ser explicados ou por problemas na identificação dos espécimes ou pela distância geográfica entre estes táxons, uma vez que a maioria das sequências publicamente disponíveis foram obtidas de espécimes parasitos em anfíbios hospedeiros da região de Colima, México, na região e Neártica. Estes resultados juntamente com as diferenças existentes na morfologia espicular de cada grupo biogeográfico, podem ser indicativos da existência de diferenças supragenéricas entre ambas as linhagens ou que a distância evolutiva pode ter desempenhado um papel muito importante nas divergências observadas entre as sequências, refletindo as diferenças entre os grupos Holártico e Neotropical continental.

Ben Slimane et al. (1996) consideraram aspectos biogeográficos e da morfologia para sugerir uma origem antiga de *Oswaldocruzia*, provavelmente no sudeste da Ásia, seguida de eventos de dispersão para a África durante o período entre o Eoceno superior e o Mioceno, resultando nos grupos Oriente-etíope e Neo-etíope, conservando o estado plesiomórfico de espículo “não-idiomorfo” e eventos de dispersão durante grande parte do período Terciário para a Ásia, Europa e região Neártica resultando no grupo de espécies Holártico. Esta hipótese também considera que as espécies neotropicais surgiram após a migração das espécies estabelecidas na região Neártica para a região Neotropical durante o Plioceno. O grupo caribenho por sua vez teria surgido pela expansão do grupo Neotropical para o arquipélago do caribe.

Nossos resultados não podem confirmar ou questionar o monofiletismo do gênero, uma vez que não há dados disponíveis das espécies de *Oswaldocruzia* de diferentes continentes e nosso conjunto de dados comporta apenas espécies Amazônicas e do México. No entanto, os valores de distância genética observados e as topologias mostram uma grande separação entre as principais linhagens deste estudo. O sequenciamento de espécies adicionais de diferentes continentes e hospedeiros permitirá elucidar as interrelações entre as espécies do gênero, suas distribuições e associações com seus hospedeiros.

Dentro do clado das espécies amazônicas, observamos uma forte relação entre as sequências dos parasitos de *B. wavrini* (MK492919) e *B. geographica* (MK492920) com altos níveis de suporte. Este resultado é congruente com nossas observações morfológicas, que mostram uma forte similaridade entre os espécimes dos dois hospedeiros e com a análise molecular que revela alta similaridade entre ambas as sequências. De acordo com os registros na literatura, *O. chabaudi* parece estar exclusivamente ou principalmente associado a anfíbios da Família Hylidae, sendo relatado em

Boana boans, *Boana fasciata* e *Boana geographica* no Equador. Nossos resultados representam um novo hospedeiro (*B. wavrini*) e o primeiro registro desta espécie para o Brasil na Amazônia Oriental e apresentam fortes indícios de coevolução.

No clado das espécies amazônicas também observamos um clado bem suportado compreendendo as sequências de espécimes parasitos de Bufonidae (*O. belenensis* e *O. chambrieri*). Neste clado uma forte relação foi observada entre a nova sequência dos espécimes encontrados em *A. bokermanni* (GFM1094) e uma sequência obtida do GenBank de *O. chambrieri* parasito de *R. margaritifera* (KU980934). Ambas as sequências são geneticamente similares e formam um clado bem suportado. A sequência de *O. chambrieri* (KU980934) depositada por Willkens et al. (2015) foi a única dentre as sequências publicamente disponíveis demonstrar relação mais próxima com as novas sequências deste estudo, o que pode estar relacionado à proximidade geográfica visto que o referido estudo também utilizou espécimes de nematódeos provenientes da Flona Caxiuanã.

Neste clado de espécimes parasitos de Bufonidae também foi observada uma forte relação entre as quatro sequências de *O. belenensis* parasitos de *R. marina* (MK492916 e MK492917) e *R. margaritifera* (MK492915 e MK492918) juntamente com níveis de divergência genética variando entre 1 a 3%. *O. belenensis* difere morfológicamente da maioria de seus congêneres do grupo Neotropical continental com bolsa copulatória de Tipo II em relação à ausência de aletas laterais e difere de *O. lescurei*, *O. mazzai* e *O. proencai* em relação ao número de processos distais da lâmina, sendo então caracterizados pela existência de 4 processos distais na lâmina, dos quais dois são bifurcados de acordo com Santos et al. (2008).

Apesar das similaridades morfológicas e filogenéticas, ambas as filogenias de ML e BI demonstraram pouca resolução entre as sequências de *O. belenensis*, com variação nos nós e baixos valores de suporte, que juntamente com os baixos valores de divergência genética e a proveniência dos hospedeiros, podem ser indicativos de uma distribuição geográfica mais ampla e que as distâncias geográficas ainda não estabeleceram grandes distâncias evolutivas. As sequências obtidas de *R. margaritifera* representam um novo hospedeiro e localidade registrados para *O. belenensis*.

CONCLUSÃO

A partir dos objetivos estabelecidos neste trabalho, realizamos a definição morfológica de *O. chambrieri*, *O. chabaudi*, *O. lanfrediae*, *O. belenensis*, *O. vitti* e de duas novas espécies *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 e *Oswaldocruzia* sp. nov. 2 a serem descritas. Destas, foram obtidas sequências gênicas da região codificante do Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) do DNA mitocondrial de *O. chambrieri*, *O. chabaudi* e *O. belenensis*; com as quais realizamos a comparação molecular e filogenética com as sequências publicamente disponíveis para o gênero *Oswaldocruzia* no GenBank e uma nova sequência de *K. hylae*, integrando dados morfológicos, morfométricos, merísticos e moleculares às descrições. Identificamos dois grandes clados em *Oswaldocruzia* com elevados valores de divergência genética, um clado na qual estão incluídas as sequências do México e outro com sequências da Amazônia. Indícios de diferenças supragenéricas relacionadas a problemas de identificação com nematódeos do México, ou a existência de supragenéricas entre ambas as linhagens.

Este estudo adiciona dados à diversidade de helmintos parasitos de anfíbios e répteis da Amazônia, com a descrição de *Oswaldocruzia lanfrediae* em *Leptodactylus paraensis* (anexo 3) e as descrições de *Oswaldocruzia* sp. nov. 1 e *Oswaldocruzia* sp. nov. 2, representa um novo registro geográfico de *O. chabaudi* para o Brasil e amplia as distribuições geográficas conhecidas de *O. belenensis* e *O. vitti*.

Considerando o número reduzido de dados moleculares de *Oswaldocruzia* bem como dos demais gêneros de nematódeos da Família Molineidae publicamente disponíveis, nós endossamos a possibilidade de mais espécies e novos registros geográficos serem relatados. Adicionalmente, o sequenciamento de espécies adicionais de *Oswaldocruzia* de diferentes continentes e diferentes hospedeiros, permitirá elucidar as interrelações entre as espécies do gênero, suas distribuições, associações com seus hospedeiros bem como a hipótese de origem do grupo e detalhes das divisões morfológicas e biogeográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson RC, Chabaud AG, Willmott S, Helminthology CI (2009) Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates: Archival volume. CABI, Wallingford.
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology* 55 (4): 539–552. doi: 10.1080/10635150600755453
- Ben Slimane B, Chabaud AG, Durette-Desset MC (1996) Les nématodes trichostrongylinea parasites d'amphibiens et de reptiles: Problèmes taxonomiques, phylétiques et biogéographiques. *Systematic Parasitology* 35: 179–206. doi: 10.1007/BF00009639
- Ben Slimane B, Durette-Desset M-C (1993) Quatre nouvelles espèces du genre *Oswaldocruzia* Travassos, 1917 (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasites d'Amphibiens d'Equateur. *Revue Suisse de Zoologie*. 100: 113–136. Available from: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/82503>
- Ben Slimane B, Verhaagh M, Durette-Desset MC (1995) *Oswaldocruzia peruensis* n. sp. (Nematoda: Trichostrongylinea) parasite d'un Iguanidae de Pérou. *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle* 17: 77–82
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Llu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71–75. doi: 10.1038/32160
- Bortolus A (2008) Error Cascades in the Biological Sciences: The Unwanted Consequences of Using Bad Taxonomy in Ecology. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 37(2) 114–118. doi: 10.1579/0044-7447(2008)37[114:ECITBS]2.0.CO;2
- Brooks DR, Hoberg EP (2000) Triage for the biosphere: the need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. *Comparative Physiology* 67 (1): 1–25
- Brooks DR, Hoberg EP (2007) How will global climate change affect parasite-host assemblages? *Trends in Parasitology* 23 (12): 571–574. doi: 10.1016/j.pt.2007.08.016
- Brooks DR, Hoberg EP (2001) Parasite Systematics in the 21st Century: Opportunities and Obstacles. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (1): 99–107. doi: 10.1590/S0074-02762000000700018

- Campião KM, Morais DH, Dias OT, Aguiar A, De Melo Toledo G, Tavares LER, Da Silva RJ (2014) Checklist of Helminth parasites of Amphibians from South America. *Zootaxa* 3843: 1–93. doi: 10.11646/zootaxa.3843.1.1
- De Ley P, Tandingan De Ley I, Morris K, Abebe E, Mundo-Ocampo M, Yoder M, Heras J, Waumann D, Rocha-Olivares A, Burr AHJ, Baldwin JG, Thomas WK (2005) An integrated approach to fast and informative morphological vouchers of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1945–1958: Biological Sciences. doi: 10.1098/rstb.2005.1726
- Di Azevedo MIN, Carvalho VL, Iñiguez AM (2017) Integrative taxonomy of anisakid nematodes in stranded cetaceans from Brazilian waters: an update on parasite's hosts and geographical records. *Parasitology Research* 116 (11): 3105–3116. doi: 10.1007/s00436-017-5622-8
- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Elsasser SC, Floyd R, Hebert PDN, Schulte-Hostedde AI (2009) Species identification of North American guinea worms (Nematoda: *Dracunculus*) with DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 9 (3): 707–712. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02393.x.
- Feitosa LA, Furtado AP, Santos JN, Melo FTV (2015). A new species of *Kentropyxia* Baker, 1982 parasitic in the small intestine of *Osteocephalus taurinus* Steindachner (Anura: Hylidae) from the Brazilian Eastern Amazon. *Systematic Parasitology* 92 (3):251–9. doi: 10.1007/s11230-015-9600-1.
- Ferri E, Barbuto M, Bain O, Galimberti A, Uni S, Guerrero R, Ferté H, Bandi C, Martin C, Casiraghi M (2009) Integrated taxonomy: Traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* 6 (1). doi: 10.1186/1742-9994-6-1
- Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* 11 (4): 839–850. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x
- Fontaine B, Perrard A, Bouchet P (2012) 21 years of shelf life between discovery and description of new species. *Current Biology* 22 (22): R943-R944. doi: 10.1016/j.cub.2012.10.029

- Guerrero R (2013) Two new species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Trichostrongylina: Molineoidea) parasites of the cane toad *Rhinella marina* (Amphibia: Anura) from Peru. *Acta Parasitologica* 58: 30–36. doi: 10.2478/s11686-013-0103-4
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59 (3): 307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Hajibabaei M, Singer GAC, Clare EL, Hebert PDN (2007) Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology* 5 (24). doi: 10.1186/1741-7007-5-24
- Hammond P (1992) Species Inventory. In: *Global Biodiversity*. doi: 10.1007/978-94-011-2282-5_4
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B Volume* 270 (1512). doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert PDN, Gregory TR (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54 (5): 852–859. doi: 10.1080/10635150500354886
- Hyman BC (1988) Nematode Mitochondrial DNA: Anomalies and Applications. *Journal of Nematology* 130 (51): 17362–17371. doi: 10.1021/ja803102y
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Maddison WP, Maddison DR (2018) Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Available from: [http:// mesquiteproject.wikispaces.com/home](http://mesquiteproject.wikispaces.com/home). doi: <http://mesquiteproject.org>
- Morrison WR, Lohr JL, Duchon P, Wilches R, Trujillo D, Mair M, Renner SS (2009) The impact of taxonomic change on conservation: Does it kill, can it save, or is it just irrelevant? *Biological Conservation* 142 (2009): 3201–3206. doi: 10.1016/j.biocon.2009.07.019
- Palomares-Rius JE, Cantalapiedra-Navarrete C, Archidona-Yuste A, Subbotin SA, Castillo P (2017) The utility of mtDNA and rDNA for barcoding and phylogeny of plant-parasitic nematodes from Longidoridae (Nematoda, Enoplea). *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-11085-4

- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. doi: 10.1093/molbev/msn083
- Poulin R (1999) The functional importance of parasites in animal communities: Many roles at many levels? In: *International Journal for Parasitology*. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00045-4
- Powers T (2004) Nematode Molecular Diagnostics: From Bands to Barcodes. *Annual Review of Phytopathology*. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140348
- Prosser SWJ, Velarde-Aguilar MG, León-Règagnon V, Hebert PDN (2013) Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12082
- Rambaut A (2018) FigTree v. 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018) Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic biology*. doi: 10.1093/sysbio/syy032
- Ronquist F, Van Der Mark E, Teslenko M, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. doi: 10.1093/sysbio/sys029
- Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G, Reyes A (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. *Gene*. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00270-X
- Siddall ME, Kvist S, Phillips A, Ocegüera-Figuero A (2012) DNA Barcoding of Parasitic Nematodes: Is it Kosher? *Journal of Parasitology*. doi: 10.1645/GE-2994.1
- Subbotin SA, Ragsdale EJ, Mullens T, Roberts PA, Mundo-Ocampo M, Baldwin JG (2008) A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.ympev.2008.04.028
- Svitin R, Kuzmin Y (2012) *Oswaldocruzia duboisi* (Nematoda, Molineidae): Morphology, Hosts and Distribution in Ukraine. *Vestnik Zoologii* 46.

- Swofford DL (2002) Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Journal of Molecular Evolution. doi: 10.1007/BF02198856
- Vicente JJ, Rodrigues HDO, Gomes DC, Pinto RM (1990) Nematoides do Brasil 2ª parte: nematoides de anfíbios. Revista Brasileira de Zoologia 7: 549–626. doi: 10.1590/S0101-81751990000400015
- Vink CJ, Paquin P, Cruickshank RH (2012) Taxonomy and Irreproducible Biological Science. BioScience 62: 451–452. doi: 10.1525/bio.2012.62.5.3
- Wägele H, Klusmann-Kolb A, Kuhlmann M, Haszprunar G, Lindberg D, Koch A, Wägele JW (2011) The taxonomist - an endangered race. A practical proposal for its survival. Frontiers in Zoology. doi: 10.1186/1742-9994-8-25

ANEXOS

Anexo 1 - Autorização 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: 47271-2	Data da Emissão: 08/06/2015 14:44	Data para Revalidação*: 07/07/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gleomar Fabiano Maschio	CPF: 644.021.779-87
Título do Projeto: Padronização de análise de nematódeos Rhabdiasidae, parasitos de anfíbios e répteis na Amazônia Oriental, por taxonomia descritiva e sistemática molecular	
Nome da Instituição: MUSEU PARAENSE EMILIO GOELDI	CNPJ: 04.108.782/0001-38

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Identificação de nematódeos do gênero Rhabdias parasito de répteis	01/2015	12/2015
2	Identificação de nematódeos do gênero Rhabdias parasito de anfíbios	01/2015	12/2015
3	Coleta de amostras de hospedeiros/helmintos em expedições à FLONA CAXIUANA e região urbana de Belém	01/2015	12/2015
4	Coleta de helmintos em espécimes da Coleção herpetológica (MPEG), mediante seleção do curador respon	01/2015	12/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, 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- Recomendamos ao pesquisador que tenha parcimônia nas coletas dos animais, pois as COLETAS serão efetuadas dentro de uma Unidade de Conservação Federal. 2- Sugerimos parceria com outros pesquisadores que fazem pesquisa na FLONA com o intuito de minimizar o impacto de coleta, especialmente em serpentes. 3- O quantitativo poderá ser acordado e readequado pelos gestores da UC que detém o conhecimento das espécies e de todas pesquisas realizadas na região.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ADRIANO PENHA FURTADO	Pesquisador	659.602.622-15	2744980 SSP-PA	Brasileira
2	Teresa Cristina Sauer de Ávila Pires	Pesquisadora	362.929.317-49	2647253 IFP-RJ	Brasileira
3	Lilian Cristina Macedo	Pesquisadora	307.477.318-96	85898043 SSP-PR	Brasileira
4	Jeannie Nascimento dos Santos	Coordenadora	333.013.012-15	1466123 SEGUP-PA	Brasileira

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

Código de autenticação: 21589631



Página 1/4



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: 47271-2	Data da Emissão: 08/06/2015 14:44	Data para Revalidação*: 07/07/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gleomar Fabiano Maschio	CPF: 644.021.779-87
Título do Projeto: Padronização de análise de nematódeos Rhabdiasidae, parasitos de anfíbios e répteis na Amazônia Oriental, por taxonomia descritiva e sistemática molecular	
Nome da Instituição: MUSEU PARAENSE EMILIO GOELDI	CNPJ: 04.108.782/0001-38

5	Francisco Tiago de Vasconcelos Melo	Pesquisador	897.806.552-04	5001115 SSP-PA	Brasileira
6	EVONNILDO COSTA GONÇALVES	Pesquisador	452.016.252-15	2411687 SSP-PA	Brasileira
7	Luisa Maria Viegas Becerra Uriaga	Pesquisadora	126.343.127-50	271379091 DETRAN-RJ	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PA	FLORESTA NACIONAL DE CAXIUNA	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Caudata, Gymnophiona, Anura, Squamata
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Squamata, Gymnophiona, Caudata, Anura
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Caudata (*Qtde: 5), Squamata (*Qtde: 15), Anura (*Qtde: 15), Gymnophiona (*Qtde: 5)

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Outras amostras biológicas(Endoparasitas), Ectoparasita, Fezes
2	Amostras biológicas (Répteis)	Outras amostras biológicas(Endoparasitas), Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Ectoparasita
3	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Armadilha de queda "pit fall", Captura manual
4	Método de captura/coleta (Répteis)	Coleta manual, Captura manual, Armadilha de queda "pit fall"

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	MUSEU PARAENSE EMILIO GOELDI	coleção

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: 21589631



Página 2/4



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: 47271-2	Data da Emissão: 08/06/2015 14:44	Data para Revalidação*: 07/07/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gleomar Fabiano Maschio	CPF: 644.021.779-87
Título do Projeto: Padronização de análise de nematódeos Rhabdiasidae, parasitos de anfíbios e répteis na Amazônia Oriental, por taxonomia descritiva e sistemática molecular	
Nome da Instituição : MUSEU PARAENSE EMILIO GOELDI	CNPJ: 04.108.782/0001-38

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

Código de autenticação: 21589631



Página 3/4



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: 47271-2	Data da Emissão: 08/06/2015 14:44	Data para Revalidação*: 07/07/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gleomar Fabiano Maschio	CPF: 644.021.779-87
Título do Projeto: Padronização de análise de nematódeos Rhabdiasidae, parasitos de anfíbios e répteis na Amazônia Oriental, por taxonomia descritiva e sistemática molecular	
Nome da Instituição : MUSEU PARAENSE EMILIO GOELDI	CNPJ: 04.108.782/0001-38

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 21589631



Página 4/4

Anexo 2 – Licença permanente para coleta de material zoológico.



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 53557-1	Data da Emissão: 03/05/2016 11:19
Dados do titular	
Nome: Francisco Tiago de Vasconcelos Melo	CPF: 897.806.552-04
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

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

Outras ressalvas

1	1-Uma Licença Permanente(LP) não é válida para: (I)manutenção temporária de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; (II)coleta/transporte de espécies constantes em listas oficiais de animais ameaçados de extinção; (III)recebimento ou envio de material biológico ao exterior;(IV)realização de pesquisa em UC Federal ou caverna (exceto em UCs do tipo APA e RPPN); 2-Uma LP não visa contemplar os grupos taxonômicos de orientandos do titular da mesma; 3-Orientandos de titular de LP poderão solicitar autorizações específicas para as atividades pertinentes aos seus próprios projetos.
---	---

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	CLASSE	Amphibia
2	FILÓ	Nematoda, Acanthocephala, Platyhelminthes
3	ORDEM	Squamata, Rodentia, Rhynchocephalia
4		

Destino do material biológico coletado

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) 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: 53927464



Página 1/3



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 53557-1		Data da Emissão: 03/05/2016 11:19	
Dados do titular			
Nome: Francisco Tiago de Vasconcelos Melo		CPF: 897.806.552-04	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ		CNPJ: 34.621.748/0001-23	
#	Nome local destino	Tipo Destino	
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	coleção	
2	Museu Paraense Emílio Goeldi	coleção	

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) 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: 53927464



Página 2/3



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 53557-1	Data da Emissão: 03/05/2016 11:19
Dados do titular	
Nome: Francisco Tiago de Vasconcelos Melo	CPF: 897.806.552-04
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) 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: 53927464



Página 3/3



***Oswaldocruzia lanfrediae* n. sp. (Strongylida: Molineidae), a parasite of *Leptodactylus paraensis* Heyer (Anura: Leptodactylidae) in Brazil**

Yago Moises Larrat · Francisco Tiago de Vasconcelos Melo · Tássia Fernanda Furo Gomes ·
Yuri Wilkens · Jeannie Nascimento dos Santos

Received: 14 May 2018 / Accepted: 10 August 2018 / Published online: 20 August 2018
© Springer Nature B.V. 2018

Abstract *Leptodactylus paraensis* Heyer, is a Neotropical anuran species that inhabits Rainforest habitats in the eastern Amazon, but because it has only been recently separated from the *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti) species group, little is known about its helminth fauna. This study describes a new species of *Oswaldocruzia* Travassos, 1917 and records the first occurrence of this genus parasitising *L. paraensis* and the second species for the Caxiuanã National Forest in the eastern Amazon, Brazil. *Oswaldocruzia lanfrediae* n. sp. is characterised by having an anterior extremity with a smooth cephalic vesicle divided into two portions, a claviform oesophagus, well-developed cuticular longitudinal ridges and

lateral alae. Females have a well-developed ojector, with didelphic and amphidelphic uteri. Males show complex robust spicules divided into a slightly curved shoe, a bifurcated fork and a blade terminating in 2–3 processes. The new species differs from its congeners especially regarding the lateral alae and the morphology of the spicules, in addition to morphometric characters such as body size, oesophagus length, deirid position, nerve-ring position and relative position of the vulva in females.

Introduction

The family Leptodactylidae Werner comprises four genera and 204 species, of which approximately 74 are included in the genus *Leptodactylus* Fitzinger (see Frost, 2018). The *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti) species group is composed of several species of medium to large-sized frogs. One of the species in this group, *Leptodactylus paraensis* Heyer, is a large-sized species distributed in the rainforest habitats in eastern Amazonia, in Pará and Mato Grosso states, Brazil (Rodrigues et al., 2010). However, since this species was recently separated from the *L. pentadactylus* species group, little is known about its helminth fauna. Only two species of helminth have been reported parasitising *L. paraensis*: the nematode *Rhabdias stenocephala* Kuzmin, Melo, Silva Filho & Santos, 2016 and the trematode *Choledocystus elegans*

This article was registered in the *Official Register of Zoological Nomenclature* (ZooBank) as 7A27C67E-87E4-490C-907A-12006B4C8EC2. This article was published as an Online First article on the online publication date shown on this page. The article should be cited by using the doi number. This is the Version of Record.

This article is part of the Topical Collection Nematoda.

Y. M. Larrat · F. T. de Vasconcelos Melo ·
T. F. Furo Gomes · Y. Wilkens ·
J. Nascimento dos Santos (✉)
Laboratory of Cellular Biology and Helminthology
“Profª. Drª. Reinalda Marisa Lanfredi”, Institute of
Biological Sciences, Federal University of Pará, Av.
Augusto Corrêa 01, Guamá, Belém, Pará 66075-110,
Brazil
e-mail: jeannie@ufpa.br