

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Taxonomia integrativa de duas espécies de nematoides de *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) coletados no Parque Nacional do Itatiaia, do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

DÉBORA SÁ LEMES
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Taxonomia integrativa de duas espécies de nematoides de *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) coletados no Parque Nacional do Itatiaia, do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

DÉBORA SÁ LEMES

Sob a Orientação da Professora

Raquel de Oliveira Simões

e Coorientação de

Arnaldo Maldonado Jr. e Beatriz Elise de Andrade Silva

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre**
em Ciências, no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L551t LEMES, Débora Sá, 1994-
Taxonomia integrativa de duas espécies de
nematoídeos de *Delomys dorsalis* (Rodentia:
Sigmodontinae) coletados no Parque Nacional do
Itatiaia, do estado do Rio de Janeiro, Brasil /
Débora Sá LEMES. - Nova Iguaçu, 2025.
51 f.

Orientadora: Raquel de Oliveira SIMÕES.
Coorientador: Arnaldo MALDONADO.
Coorientador: Beatriz Elise de Andrade SILVA.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias, 2025.

1. Taxonomia integrativa. I. SIMÕES, Raquel de
Oliveira, 1984-, orient. II. MALDONADO, Arnaldo, -,
coorient. III. SILVA, Beatriz Elise de Andrade, -,
coorient. IV. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias. V. Título.



ATA N° 375 / 2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.007260/2025-03

Seropédica-RJ, 14 de fevereiro de 2025.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DÉBORA SÁ LEMES

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra** em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/09/2024

(Assinado digitalmente em 14/02/2025 12:56)
JOSE LUIS FERNANDO LUQUE ALEJOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PROPPG (12.28.01.18)
Matrícula: 2242796

(Assinado digitalmente em 14/02/2025 13:34)
RAQUEL DE OLIVEIRA SIMOES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 3092534

(Assinado digitalmente em 27/02/2025 13:28)
ANA PAULA NASCIMENTO GOMES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 106.708.017-12

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 375, ano: 2025, tipo: ATA, data de emissão: 14/02/2025 e o código de verificação: **dba5b3dd44**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana e Gutemberg, dedico este trabalho com imensa gratidão. Vocês foram meus maiores incentivadores, oferecendo não apenas apoio, mas também amor incondicional em cada etapa da minha jornada. A vocês, devo tudo o que sou e tudo o que conquistei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof.^a Dra. Raquel de Oliveira Simões, pela oportunidade de ser sua orientanda. Sua acolhida calorosa desde o início, aliada aos seus conselhos e incentivos, foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico. Sou grata por sua confiança e por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos meus coorientadores, Dra. Beatriz Elise de Andrade Silva e Dr. Arnaldo Maldonado Jr., por toda a orientação e suporte oferecidos durante o desenvolvimento deste trabalho. Seus conhecimentos e experiências foram indispensáveis para a minha formação.

Aos meus amigos Arthur Bessi e Taíssa Casanova, dedico um agradecimento especial por todo o apoio, colaboração e por terem sido meus companheiros desde o primeiro dia. Vocês me fizeram sentir em casa.

Aos amigos que a vida me presenteou no LPPMSS, agradeço por cada momento de amizade e companheirismo. Vocês tornaram a jornada mais leve e memorável.

Um agradecimento especial a toda a minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e me compreendendo em todos os momentos, inclusive nos mais corridos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

LEMES, Débora Sá. **Taxonomia integrativa de duas espécies de nematoídeos de *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) coletados no Parque Nacional do Itatiaia, do estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2025. 51p. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

A Mata Atlântica é um dos maiores e principais biomas brasileiros, abrigando muitas espécies endêmicas de fauna e flora. Entretanto, com a urbanização desenfreada e ações antrópicas essas espécies estão cada vez mais correndo risco de extinção. Sendo assim, necessário a criação de áreas de conservação, para garantir a preservação dessas espécies. O Parque Nacional do Itatiaia, localizado entre os estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, faz parte da Mata Atlântica e lá é possível encontrar o roedor cricetídeo *Delomys dorsalis* (Hensel, 1873), objeto de estudo desse trabalho. Apesar da escassez de informações sobre a comunidade parasitária deste pequeno mamífero, este estudo permitiu descrever uma nova espécie de nematoíde e redescrever uma espécie já conhecida, atualizando o conhecimento sobre a helmintofauna desse hospedeiro. *Alippistrongylus itatiaensis* (Lemes *et al.*, 2024) foi descrito utilizando taxonomia integrativa e caracterizado por se diferenciar das outras duas espécies do gênero, por meio do padrão dos raios presentes na bolsa copuladora do macho e apêndice em forma esférica na fêmea. Por outro lado, viu-se a necessidade de contribuir com informações taxonômicas novas e mais atualizadas da espécie de nematoíde *Protospirura numidica* (Seurat, 1914), acrescentando dados morfológicos e moleculares. Desta forma, a taxonomia integrativa foi essencial para descrição e redescrição de espécies.

Palavras-chave: Nematoíde, roedor, taxonomia integrativa, Parque Nacional de Itatiaia.

ABSTRACT

LEMES, Débora Sá. **Integrative taxonomy of two species of *Delomys dorsalis* nematodes (Rodentia: Sigmodontinae) collected in Itatiaia National Park, Rio de Janeiro state, Brazil.** 2025. 51p. Dissertation (master's degree in veterinary sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

The Atlantic Forest is one of the largest and most important biomes in Brazil, home to many endemic species of fauna and flora. However, with rampant urbanization and human activities, these species are increasingly at risk of extinction. Therefore, it is necessary to create conservation areas to ensure the preservation of these species. The Itatiaia National Park, located between the states of Rio de Janeiro and Minas Gerais, is part of the Atlantic Forest and there it is possible to find the cricetid rodent *Delomys dorsalis* (Hensel, 1873), the object of study of this work. Despite the scarcity of information about the parasitic community of this small mammal, this study allowed us to describe a new species of nematode and redescribe an already known species, updating the knowledge about the helminth fauna of this host. *Alippistongylus itatiaensis* (Lemes et al., 2024) was described using integrative taxonomy and characterized by being different from the other two species of the genus, through the pattern of rays present in the male copulatory pouch and the spherical appendage in the female. On the other hand, there was a need to contribute new and more updated taxonomic information on the nematode species *Protospirura numidica* (Seurat, 1914), adding morphological and molecular data. Thus, integrative taxonomy was essential for the description and redescription of species.

Keywords: Nematode, rodent, integrative taxonomy, Itatiaia National Park.

LISTA DE ABREVIASÕES

PNI	Parque Nacional do Itatiaia
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
CHIOC	Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz
AIC	Akaike
SMS	Smart Model
aLRT	Teste de Razão de Verossimilhança Aproximada
BI	Inferência Filogenética Bayesiana
BPP	Probabilidades Posteriorias Bayesianas
MCMC	Amostragens de Monte Carlo de Cadeia de Markov

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Morfometria das espécies de <i>Alippistongylus</i>	19
Tabela 2. Dados utilizados na formação da árvore filogenética	36
Tabela 3. Diferença entre as espécies do gênero <i>Protospirura</i> . M - lábio medial. L - lábio lateral.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infográfico da biodiversidade da Mata Atlântica	1
Figura 2. Roedor cricetídeo, <i>Delomys dorsalis</i>	4
Figura 3. Parte baixa do Parque Nacional do Itatiaia.	5
Figura 4. Sínlofe em secções transversais do corpo: (a) entre o derídeo e o esôfago, fêmea e (b) macho; no meio do corpo (c) fêmea e (d) macho; (e) anterior à vulva; (f) anterior à bolsa caudal.	14
Figura 5. <i>Alippistongylus itatiaiaensis</i> (a) Região cefálica, vista apical (b) Vista lateral esquerda da extremidade anterior, mostrando anel nervoso, poro excretor, derídeos e esôfago (c) Vista ventral do macho, bolsa caudal. (d) Vista lateral do lobo esquerdo, macho. (e) Vista lateral do lobo direito, macho. (f) Vista ventral do cone genital, gubernáculo e espículos. (g) Fêmea, extremidade posterior, mostrando útero distal, vestíbulo, esfincter, infundíbulo e ovos. Abreviações: 2l–8l – raios esquerdos 2–8; 2r–8r – raios direitos 2–8.	16
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) <i>Alippistongylus itatiaiaensis</i> (a) espículos passando pelo cone genital, com papila aparente em vista lateral macho. (b) região posterior da fêmea em vista ventral da vulva, (v) vulva.....	17
Figura 7. Árvore filogenética bayesiana para o gene 28S rRNA. Os números nos nós são aLRT (esquerda) e BPPs (direita). A barra de escala representa o número de substituições por sítio.	21
Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) <i>Protospirura numidica</i> , macho, região cefálica. a) Abertura dos lábios com os lobos medial e laterais, as setas indicam a trifurcação dos dentes. b) Par superior de papilas cefálicas.....	31
Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) <i>Protospirura numidica</i> , região posterior macho e fêmea. a) Espículo transpassando a cloaca. b) Abertura da vulva. c) Anus na região terminal.....	32
Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) <i>Protospirura numidica</i> , região posterior macho. Papilas terminais. a) Dois pares de papilas pré-cloacal e papila ímpar. b) Primeiro par de papilas pós-cloacal. c) Vista ventral da região posterior do macho, onde as cabeças de seta indicam as papilas pré-cloacal, as setas indicam as papilas pós-cloacal e “ee” significa espículo esquerdo. d) Vista lateral da região posterior, onde as cabeças de seta indicam as papilas pré-cloacal, as setas indicam as papilas pós-cloacal e * indica o fasmídeo.....	33
Figura 11. Relações filogenéticas entre sequências de espécies selecionadas da família Spirurida, incluindo o espécime de <i>Protospirura numidica</i> aqui sequenciado, com base em análises do gene 18S. A árvore foi inferida utilizando a máxima verossimilhança (ML) e	

inferência bayesiana (BI). O suporte nodal é descrito à esquerda pelos valores obtidos na ML e à direita pelos obtidos na BI. * indica que este valor de nó não foi calculado. - indica valores de suporte nodal inferior a 70 ou 0,7. 34

Figura 12. Relações filogenéticas entre sequências de espécies selecionadas da família Spirurida, incluindo o espécime de *Protospirura numidica* aqui sequenciado, com base em análises do gene CO1. A árvore foi inferida utilizando a máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI). O suporte nodal é descrito à esquerda pelos valores obtidos na ML e à direita pelos obtidos na BI. * indica que este valor de nó não foi calculado. - indica valores de suporte nodal inferior a 60 ou 0,6. 35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 CAPÍTULO I.....	6
Nova espécie do gênero <i>Alippistrongylus</i> (Nematoda: Trichostrongylina) parasitO de <i>Delomys dorsalis</i> (Rodentia: Sigmodontinae) na Mata Atlântica do Rio de Janeiro, Brasil.....	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
2.3 INTRODUÇÃO	9
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
2.5 RESULTADOS.....	12
2.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	17
2.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	21
2.8 DISCUSSÃO.....	22
3 CAPÍTULO II.....	24
Redescrição de <i>Protospirura numidica</i> (Nematoda: Spirurida) parasito de <i>Delomys dorsalis</i> (Rodentia: Sigmodontinae) da Mata Atlântica do Rio de Janeiro, Brasil.....	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
3.3 INTRODUÇÃO	27
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.5 RESULTADOS.....	29
3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	33
3.7 DISCUSSÃO.....	37
4. CONCLUSÕES GERAIS	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
6. ANEXO.....	51

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica, um dos principais *hotspots* de biodiversidade no mundo, abriga uma vasta comunidade ecológica que se desenvolveu ao longo dos anos. Com uma flora e fauna extremamente diversificadas, incluindo muitas espécies endêmicas dessa região, além de outras que compartilham o ecossistema com biomas distintos do Brasil (MMA, 2025), esse bioma resulta em uma rede complexa de interações biológicas, muitas vezes dependentes e interrelacionadas, para que as espécies possam sobreviver (MARQUES & GRILLES, 2021). A Mata Atlântica se estende por uma vasta área geográfica, com variações significativas de altitude e relevo, que vão das planícies litorâneas até as montanhas da Serra do Caparaó (IBGE, 2008).

O crescimento econômico da região Sudeste, impulsionado pela expansão urbana e industrial, causou um desequilíbrio ambiental, levando à degradação de grandes porções de mata nativa (MARQUES & GRILLES, 2021). Esse desequilíbrio resultou em um aumento significativo do contato entre seres humanos e animais silvestres, o que favoreceu a disseminação de doenças zoonóticas emergentes e reemergentes, que anteriormente estavam restritas ao meio selvagem (LAFFERTY, 1997; GIRAUDOUX *et al.*, 2003). Muitas dessas doenças originam-se no ambiente natural e representam uma ameaça global à saúde humana, como as hantaviroses, SARS, rickettsioses, COVID-19, entre outras (WOOLHOUSE & GOWTAGE-SEQUERIA, 2005; HAIDER *et al.*, 2020).

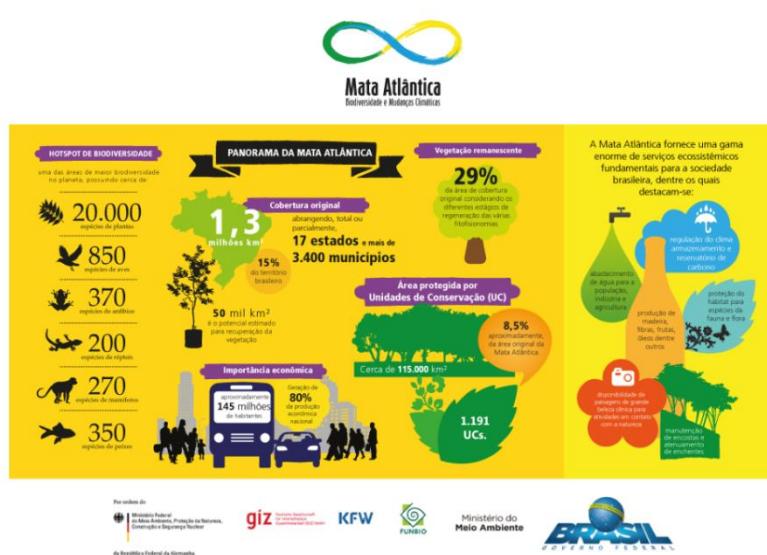


Figura 1. Infográfico da biodiversidade da Mata Atlântica.

A presença de parasitos em populações de pequenos mamíferos silvestres é um desafio considerável para a saúde pública, uma vez que esses mamíferos frequentemente atuam como reservatórios de patógenos zoonóticos, tornando essencial o entendimento e monitoramento das interações entre parasitos e hospedeiros (NIELSEN, 1995; HERRERA *et al.*, 2005). Os roedores representam a ordem de mamíferos mais numerosa e com maior diversidade de espécies. Aproximadamente 10,7% das espécies de roedores (244 de 2220) atuam como hospedeiros de 85 doenças zoonóticas distintas. Esses roedores, que servem como reservatórios dessas doenças, se distinguem por um ciclo de vida caracterizado pela reprodução precoce e frequente. Adicionalmente, a grande diversidade de espécies, o ciclo de vida curto e a facilidade de coleta fazem dos pequenos mamíferos modelos ideais para estudar a transmissão de zoonoses e a dinâmica das doenças infecciosas (BRYDA, 2013; HAN *et al.*, 2016). A pesquisa envolvendo esses mamíferos é cada vez mais relevante para a saúde pública, e estudos sobre tripanossomíase e esquistossomose têm sido fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle dessas doenças (ROQUE *et al.*, 2002; MALDONADO JR *et al.*, 2006; EASTWOOD *et al.*, 2018).

Os parasitos desempenham um papel significativo no meio ambiente, podendo causar alterações comportamentais, fisiológicas e reprodutivas em seus hospedeiros (MARCOGLIESE, 2004). Os roedores, por serem os mamíferos terrestres mais abundantes, desempenham um papel fundamental na dinâmica dos ecossistemas, servindo como hospedeiros para uma grande variedade de parasitos e vetores. Sua adaptabilidade a diferentes ambientes, incluindo os modificados pela ação humana, aumenta ainda mais sua relevância nesse contexto (CERQUEIRA *et al.*, 1993; GIRAUDOUX *et al.*, 2003; RUIZ-PIÑA & CRUZ-REYES, 2002; SUÁREZ *et al.*, 2003).

A relação entre animais silvestres e seus habitats é complexa, envolvendo diversas interações ecológicas (TOKESHI, 1999). Fatores ambientais e biológicos moldam as populações de animais, incluindo parasitos (BEGON *et al.*, 2005; BEHNKE, 2008). A compreensão das interações entre parasito-hospedeiro e parasito-habitat é fundamental, especialmente para entender os fatores que influenciam a comunidade helmíntica dos roedores silvestres.

Estudos de Cardoso *et al.* (2018 e 2019), Simões *et al.* (2010 e 2017) e Maldonado Jr *et al.* (2006) evidenciam a relevância de investigar a comunidade helmíntica de pequenos roedores brasileiros. Esses animais, por serem importantes vetores de zoonoses, desempenham um papel central na saúde única. O conhecimento aprofundado dessas comunidades permite a

implementação de medidas preventivas e o estabelecimento de estratégias de saúde que englobam tanto animais quanto humanos. Além disso, essa informação é crucial para compreender as complexas interações entre parasitos, hospedeiros e ambiente, e para o uso de helmintos como bioindicadores.

A taxonomia integrativa é uma abordagem que usa diferentes tipos de dados para classificar e entender a diversidade biológica. Ela se baseia em: reconhecer as limitações da análise da forma, complementar com outras técnicas e ir além da simples identificação para entender os processos evolutivos (SCHLICK-STEINER *et al.*, 2010). Na helmintologia, análises moleculares e filogenéticas são comumente utilizadas, bem como o uso de microscopia eletrônica de varredura (COSTA *et al.*, 2018; LEMES *et al.*, 2024). Além dessas, alguns autores utilizam técnicas histológicas (MACHADO *et al.*, 2024), aspectos ecológicos (CASTRO *et al.*, 2017), microscopia de fluorescência (GOMES *et al.*, 2025) e modelagem 3d (BRAGA *et al.*, 2025) a essa abordagem. A identificação precisa de espécies de nematoides é complexa devido à similaridade morfológica entre esses helmintos. A combinação das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise filogenética, tem sido essencial para superar esse desafio. A MEV, por fornecer imagens bidimensionais em alta resolução, permite a análise detalhada de características morfológicas, enquanto a filogenética baseada em dados genéticos auxilia na classificação e associação a outras espécies conhecidas (LEMES *et al.*, 2024; MACHADO *et al.*, 2024; MIQUEL *et al.*, 2023; MALDONADO *et al.*, 2019).

Boullosa *et al.* (2018) e Costa *et al.* (2018) apresentam em seus respectivos trabalhos novas espécies de nematoides parasitos de roedores sigmodontíneos, o primeiro capturado na região Sul do Brasil e o segundo no Sudeste, ambos na Mata Atlântica. A comunidade helmíntica desses roedores ainda não está completamente elucidada, sendo necessário mais trabalho a respeito do assunto para que possamos entender melhor essa comunidade.

Delomys dorsalis (Hensel, 1873), um roedor da família Cricetidae e subfamília Sigmodontinae, é endêmico da Mata Atlântica, ocorrendo em altitudes elevadas de até 2.000 metros (GONÇALVES e OLIVEIRA, 2014). Sua dieta é baseada em matéria vegetal e artrópodes encontrados no solo (PINOTTI *et al.*, 2011). É uma espécie reprodutivamente ativa durante o ano todo, entretanto no período do inverno ocorre uma redução na reprodução, devido ao fotoperíodo mais curto (CADEMARTORI, 2003). A helmintofauna desse roedor, ainda pouco investigada, oferece oportunidades para novas descobertas, como a descrição de uma nova espécie do gênero *Alippistromyngylus* (DIGIANI e KINSELLA, 2014; LEMES *et al.*, 2024). Além disso, estudos realizados em outros roedores sigmodontíneos do Brasil, embora com

dados epidemiológicos limitados, têm revelado a presença de trematódeos (TRAVASSOS *et al.*, 1969; D'ANDREA *et al.*, 2000; MALDONADO JR. *et al.*, 2003), nematoides (VICENTE *et al.*, 1997; MALDONADO JR. *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.* 2010; LEMES *et al.*, 2024), destacando a importância da continuidade da pesquisa para o reconhecimento de novas espécies nos biomas brasileiros (SIMÕES *et al.*, 2014; MALDONADO *et al.*, 2020).



Figura 2. Roedor cricetídeo, *Delomys dorsalis*.

O Parque Nacional do Itatiaia (PNI), localizado na Serra da Mantiqueira, abrangendo áreas dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, desempenha um papel crucial na proteção e preservação da biodiversidade (ICMBIO, 2024). Reconhecido pela UNESCO por abrigar várias espécies endêmicas da Mata Atlântica, o PNI é fundamental para a manutenção dos ecossistemas dessa região (ICMBIO, 2024). O parque é composto por regiões montanhosas e ilhas de vegetação, oferecendo abrigo a uma grande variedade de espécies, muitas das quais sensíveis à ação humana, o que reforça a importância de sua preservação (MARTINELLI, 2007).



Figura 3. Parte baixa do Parque Nacional do Itatiaia.

Dado que a Mata Atlântica é um dos biomas mais ameaçados e abriga uma fauna rica em pequenos mamíferos, o estudo da helmintofauna de roedores como *Delomys dorsalis* no PNI é essencial para entender as relações entre parasitos, hospedeiros e o ambiente. Tais estudos são fundamentais para compreender a saúde do ecossistema, a preservação da biodiversidade e para o desenvolvimento de estratégias de saúde única.

2 CAPÍTULO I

NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO *ALIPPISTRONGYLUS* (NEMATODA: TRICHOSTRONGYLINA) PARASITO DE *DELOMYS DORSALIS* (RODENTIA: SIGMODONTINAE) NA MATA ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL.

Journal of Helminthology

www.cambridge.org/jhl

Review Article

Cite this article: Sá Lemes D, de Andrade Silva BE, Maldonado A. Jr., Vilela RV, Luque JL and de Oliveira Simões R (2024). New species of the genus *Alippistrongylus* (Nematoda: Trichostrostrongylina) parasitic in *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Helminthology*, **98**, e58, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0022149X24000464>.

Received: 07 April 2024
Revised: 24 May 2024
Accepted: 10 June 2024

Keywords:
Integrative taxonomy; nematode; Parque Nacional do Itatiaia; rodent

Corresponding author:
D. Sá Lemes;
Email: deboralemes.dl@gmail.com

New species of the genus *Alippistrongylus* (Nematoda: Trichostrostrongylina) parasitic in *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil

D. Sá Lemes¹ , B.E. de Andrade Silva² , A. Maldonado Jr.³ , R.V. Vilela³ , J.L. Luque⁴  and R. de Oliveira Simões⁴ 

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil; ²Laboratório de Helmintologia Romero Lascasas Porto, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ³Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil and ⁴Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

Abstract

We describe a new species of the genus *Alippistrongylus* (Nematoda: Trichostrostrongylina) in the small intestine of *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) found in Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia, PNI), state of Rio de Janeiro, Brazil. The new species can be distinguished between the other two species previously described by the following morphological characteristics: pattern of the rays from the caudal bursa rays in males and the spherical-shaped appendage in the female. Additionally, we provide molecular genetic data from the new species. The discovery of *Alippistrongylus itatiaiaensis* sp. n. expands our understanding of nematode diversity and underscores the importance of parasite studies in biodiversity conservation. Its occurrence in a preserved area like the PNI emphasises the role of such habitats in maintaining unique ecological interactions.

RESUMO

Descrevemos uma nova espécie do gênero *Alippistrongylus* (Nematoda: Trichostrongylina) parasitando o intestino delgado de *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) coletados no Parque Nacional do Itatiaia (PNI), estado do Rio de Janeiro, Brasil. A nova espécie pode ser distinguida das outras duas espécies já descritas pelas seguintes características morfológicas: padrão dos raios da bolsa caudal nos machos e apêndice em forma esférica na fêmea. Além disso, fornecemos dados genéticos moleculares da nova espécie. A descoberta de *Alippistrongylus itatiaiaensis* expande nossa compreensão da diversidade de nematoídeos e ressalta a importância dos estudos de parasitos na conservação da biodiversidade. Sua ocorrência em uma área preservada como o PNI enfatiza o papel desses habitats na manutenção de interações ecológicas únicas.

Palavras-chave: Taxonomia integrativa, nematoíde, Parque Nacional do Itatiaia, roedor

ABSTRACT

We describe a new species of the genus *Alippistrongylus* (Nematoda: Trichostrongylina) parasitizing the small intestine of *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) collected in the Itatiaia National Park (PNI), Rio de Janeiro state, Brazil. The new species can be distinguished from the other two previously described species by the following morphological characteristics: pattern of the caudal pouch rays in males and spherical appendage in females. In addition, we provide molecular genetic data of the new species. The discovery of *Alippistrongylus itatiaiaensis* expands our understanding of nematode diversity and highlights the importance of parasite studies in biodiversity conservation. Its occurrence in a preserved area such as the PNI emphasizes the role of these habitats in maintaining unique ecological interactions.

Keywords: Integrative taxonomy, nematode, Parque Nacional do Itatiaia, rodent

2.3 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical da América do Sul, compreendendo uma das áreas com maior biodiversidade do planeta nos territórios brasileiro, argentino e paraguaio (MARQUES *et al.*, 2021). É uma região onde se encontram as espécies vegetais e animais mais ricas e ameaçadas do planeta (MYERS *et al.*, 2000), devido ao desmatamento motivado por diversas atividades humanas (MMA, 2024).

O Parque Nacional do Itatiaia (PNI) abrange regiões do estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais, cujo principal objetivo é a conservação da fauna e flora endêmicas do bioma Mata Atlântica. O parque é reconhecido pela UNESCO e está localizado em áreas de alta prioridade para conservação da biodiversidade (ICMBIO, 2024).

A Mata Atlântica abriga mais de 270 espécies de mamíferos (MMA, 2024), incluindo 40 espécies de roedores pertencentes à subfamília Sigmodontinae (Bonvicino *et al.*, 2008). Roedores sigmodontíneos são relevantes para a saúde pública, servindo como potenciais reservatórios para hantavírus, *Bartonella* spp., *Leptospira* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni* (MALDONADO JR. *et al.*, 2006; OROZCO *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2019; SALVO *et al.*, 2020; BELLOMO *et al.*, 2021).

Dentre esses roedores, *Delomys dorsalis* (Hensel, 1873) é uma espécie de sigmodontíneo com hábitos terrestres endêmica da Mata Atlântica (BONVICINO *et al.*, 2008). Esta espécie prospera em altitudes que podem atingir até 2.000 m (GONÇALVES e OLIVEIRA, 2014). Alimentando-se principalmente de matéria vegetal e artrópodes do solo (PINOTTI *et al.*, 2011). *Delomys dorsalis* permanece relativamente pouco estudado em termos de sua fauna de helmintos, com apenas dois helmintos relatados (CARDOSO *et al.*, 2018).

Este estudo é parte de um projeto de pesquisa de biodiversidade mais amplo que investiga vários táxons dentro da Mata Atlântica. Utilizando uma abordagem multidisciplinar abrangendo perspectivas taxonômicas, evolutivas, ecológicas e parasitológicas, nosso objetivo principal foi descrever uma nova espécie de nematoide parasitando o intestino delgado de *Delomys dorsalis* encontrada no PNI usando taxonomia integrativa.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi feita dentro dos limites do PNI, no município de Itatiaia, estado do Rio de Janeiro, Brasil. O PNI abrange uma área de 28.086 hectares (ha) com altitudes variando de 600 a 2.791 m (ICMBIO, 2024). O clima dentro do parque é caracterizado como úmido, com temperaturas médias atingindo até 20 °C durante o verão. O PNI faz parte de um programa de proteção estratégica que visa conservar a Mata Atlântica, designada como Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (RBMA, 2024).

Os roedores foram capturados em faixas de altitude aproximadas de 800 a 1.500 metros. Seis transectos lineares foram estabelecidos nessas áreas, compreendendo 15 estações de captura cada, e foram georreferenciados usando tecnologia GPS. Foram utilizadas armadilhas vivas dos modelos Tomahawk (40,64 cm x 12,70 cm x 12,70 cm) e Sherman (7,62 cm x 9,53 cm x 30,48 cm) e dentro iscas feitas com uma mistura de banana, aveia, manteiga de amendoim e bacon. As armadilhas contendo os animais foram transportadas para um laboratório de campo para processamento e coleta de amostras, estritamente dentro dos padrões de biossegurança. As autorizações para coleta e manuseio dos animais foram emitidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob autorização nº 74498-11 e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/IOC), com licença nº L-036/2018-A1, respectivamente.

Todos os nematoides coletados do intestino delgado foram conservados em etanol a 70%. Dez nematoides machos e 10 fêmeas foram clarificados usando lactofenol e examinados através de um microscópio óptico Zeiss Standard 20. Os desenhos foram produzidos com a ajuda de uma câmera lúcida. As estruturas morfológicas foram medidas usando um sistema de imagem digital Zeiss Axio Cam HRC (Zeiss, Alemanha), com o software acessório Axio Vision Rel, versão 4.7. As medições foram fornecidas em micrômetros (a menos que especificado de outra forma) para amostras de holótipo ou alótípico, seguidas pelo intervalo de parátipo entre parênteses. A descrição da morfologia geral dos nematoides foi baseada em Digiani e Kinsella (2014), o padrão da bolsa caudal estava de acordo com Durette-Desset e Digiani (2012) e a orientação da sínlofe estava seguindo Durette-Desset e Digiani (2005). O holótipo, alótípico e parátipos foram depositados na coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), no Rio de Janeiro.

Para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), os nematoides foram desidratados em etanol graduado (30–100%) por 2 horas e submetidos à secagem de ponto crítico com CO₂ (CPD 030, Balzers, Suíça). As amostras foram montadas em *stubs* de alumínio, revestidas com uma camada de ouro de 20 nm e examinadas usando um microscópio eletrônico

de varredura Jeol JSM 6390LV (operando a 15 kV) (JEOL, Akishima, Tóquio, Japão) na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

O DNA genômico foi isolado de um pool de dez nematoides usando o QIAamp DNA Mini Kit seguindo o protocolo do fabricante (QIAGEN, Hilden, Alemanha). A amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de um gene parcial de RNA ribossômico de grande subunidade (28S rRNA) foi conduzida usando os primers NC28-7 (5'-GAC CCT GTT GAC CTT GAC TC-3') e NC28-BR (5'-GTC TAA ACC CAG CTC ACG TT-3') (CHILTON *et al.*, 2003). Cada reação de PCR consistiu em 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, EUA), 8,5 µL de água sem DNA, 0,5 µL de cada primer direto e reverso e 3 µL da amostra de DNA, perfazendo um volume total de reação de 25 µL. O programa de ciclagem térmica envolveu uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos; seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os amplicons foram visualizados em géis de agarose a 1,5% após eletroforese, corados com corantes de gel de ácido nucleico Gel Red (Biotium, Hayward, Califórnia, EUA) e examinados sob um transiluminador UV. Os amplicons amplificados com sucesso foram purificados usando o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de acordo com o protocolo do fabricante (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Os amplicons foram sequenciados em ciclo usando o Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA) em ambas as fitas usando os primers de PCR mencionados, resultando em sequenciamento bidirecional para maior precisão dos dados. O sequenciamento foi realizado utilizando o Analisador de DNA ABI3730. Ambos os procedimentos e a precipitação dos produtos sequenciados do ciclo foram conduzidos na Plataforma da Fundação Oswaldo Cruz para sequenciamento de DNA por eletroforese capilar (P01-001-RPT/FIOCRUZ). Os fragmentos foram montados em contigs e editados para ambiguidades utilizando a plataforma de software Geneious Prime 2023 (KEARSE *et al.*, 2012), resultando em uma sequência de consenso. A sequência de DNA obtida foi comparada com aquelas disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o algoritmo BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os dados da sequência 28S de *Alippistrongylus itatiaiaensis* foram depositados no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Alinhamos a sequência de *Alippistrongylus itatiaiaensis* com 11 sequências de outras espécies de nematoides pertencentes à subordem Trichostrongylina (sensu Durette-Desset e

Chabaud, 1993) recuperadas do GenBank. Como grupos externos, usamos duas sequências de espécies de nematoides pertencentes à subordem Ancylostomatina (*Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) e *Necator americanus* (Stiles, 1092). Alinhamos as sequências usando o programa de alinhamento de sequências múltiplas ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Aparamos regiões mal alinhadas usando o pacote de software Mesquite, versão 3.81 (MADDISON e MADDISON, 2023).

A reconstrução filogenética usando máxima verossimilhança (ML), como critério de otimalidade, foi realizada usando o servidor web PhyML 3.0 (GUINDON *et al.*, 2010). O modelo evolutivo de nucleotídeos de melhor ajuste foi calculado sob o critério de informação de Akaike (AIC), via SMS (Smart Model Selection) (LEFORT *et al.*, 2017). Os suportes de ramificação foram avaliados pelo teste de razão de verossimilhança aproximada (aLRT) (ANISIMOVA e GASCUEL, 2006).

A inferência filogenética bayesiana (BI) foi realizada usando o MrBayes versão 3.2.7a (RONQUIST *et al.*, 2012) no XSEDE usando o CIPRES Science Gateway (MILLER *et al.*, 2010). Amostragens de Monte Carlo de cadeia de Markov (MCMC) foram realizadas para 10.000.000 de gerações, com quatro cadeias simultâneas, em duas execuções. Os suportes de ramificação foram avaliados por probabilidades posteriores bayesianas (BPP), calculadas a partir de árvores amostradas a cada 1000 gerações, após uma remoção de burn-in de fração de 25%.

2.5 RESULTADOS

Subordem **Trichostrongylina** Durette-Desset e Chabaud, 1993

Superfamília **Heligmosomoidea** Durette-Desset e Chabaud, 1993

Família **Heligmonellidae** Skrjabin e Schikhobalova, 1952

Subfamília **Nippostrongylinae** Durette-Desset, 1971

Alippistongylus itatiaiaensis Lemes, Andrade, Maldonado Jr., 2024

Geral: Nematoides de pequeno comprimento, com a região posterior irregularmente enrolada. Vesículacefálica conspícuacomestrias transversais (Fig. 1b), dois anfídeos, 4 papilas externo labiais e 4 papilascefálicas submedianas (Fig. 1a). Anel nervoso anterior ao poro excretor e deírideo (Fig. 1b). Poro excretor e deírideos cerca de 84% e 67% do comprimento do esôfago na fêmea e 77% e 63% no macho, respectivamente. Esôfago claviforme (Fig. 1b).

Sínlofe: (Observado em 1 macho e 1 fêmea). Em ambos os sexos, cutículas com cristas longitudinais ininterruptas aparecendo gradualmente posteriormente à vesícula cefálica, desaparecendo imediatamente anterior à bolsa caudal no macho e alcançando o apêndice caudal na fêmea. Sínlofe com 19 cristas na fêmea (8 dorsais/ 11 ventrais) (Fig. 1a) e 21 no macho (9 dorsais/12 ventrais) (Fig. 1b) entre o derídeo e o esôfago; 22 cristas na fêmea (9 dorsais/ 13 ventrais) (Fig. 1c) e 24 cristas no macho (11 dorsais/ 13 ventrais) (Fig. 1d) no meio do corpo; 22 cristas na fêmea (9 dorsais/13 ventrais) (Fig. 1e) anteriores à vulva e 24 no macho (10 dorsais/14 ventrais) (Fig. 1f) anteriores à bolsa caudal. No meio do corpo, o tamanho e o formato das cristas apresentam variação limitada, com cristas no quadrante ventral e dorsal direito ligeiramente maiores. Eixo único de orientação das cristas inclinado em cerca de 80° em relação ao eixo sagital em ambos os sexos.

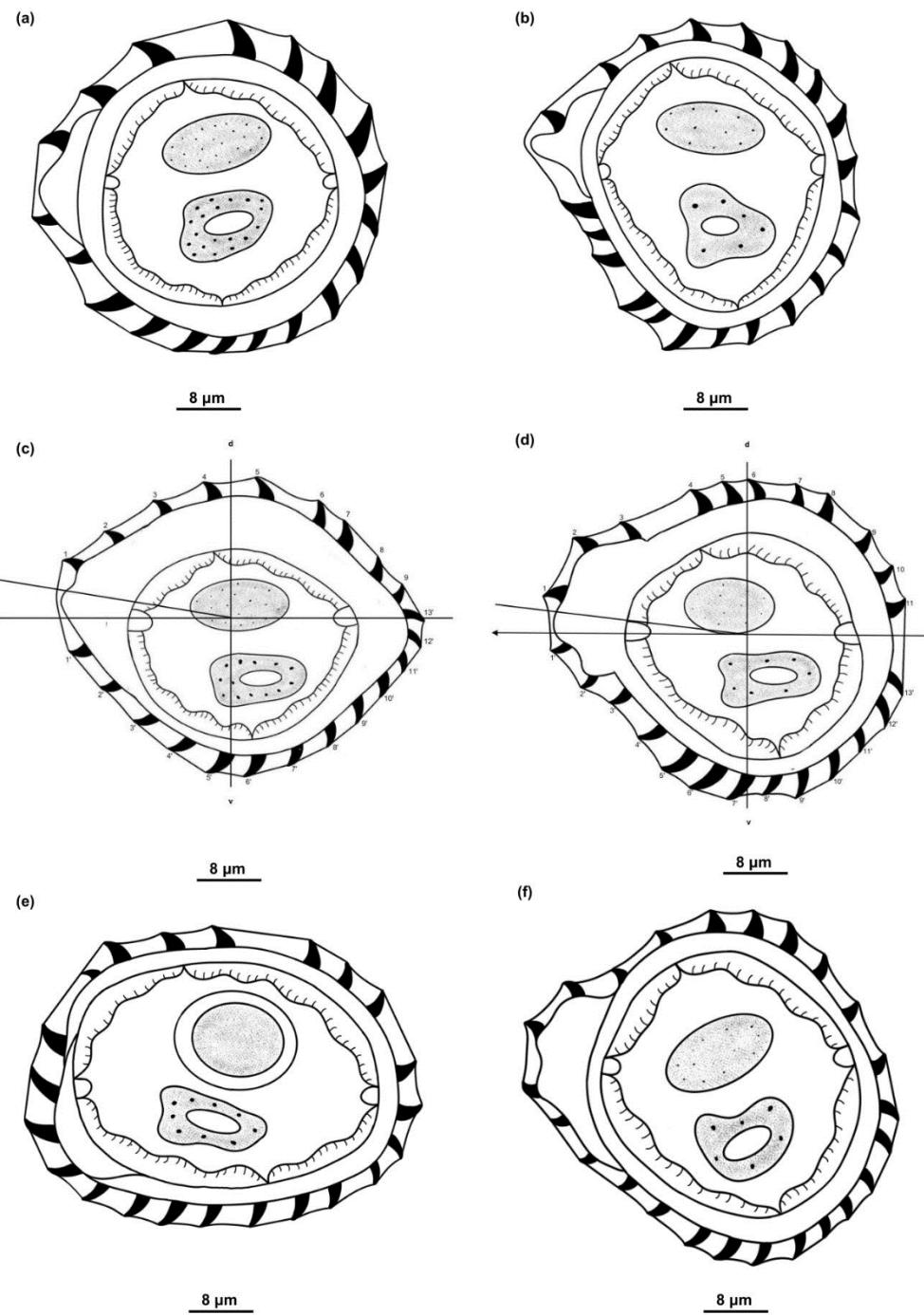


Figura 1. Sínlofe em secções transversais do corpo: (a) entre o derídeo e o esôfago, fêmea e (b) macho; no meio do corpo (c) fêmea e (d) macho; (e) anterior à vulva; (f) anterior à bolsa caudal.

Macho (holótipo e 10 parátipos): 3,36 (2,33-3,51) mm de comprimento e 51 (44-78) de largura no meio do corpo. Vesícula cefálica com 23 (21-44) de comprimento e 18 (15-27) de largura. Anel nervoso, derídeos e poro excretor situados a 120 (128-301), 178 (133-308) e 228 (145-370) da região anterior, respectivamente. Esôfago com 293 (196-368) de comprimento. Bolsa caudal assimétrica, com o lobo direito maior que o esquerdo (Fig. 2c). Lobo esquerdo e direito com padrão 4-1 (Fig. 2d, 2e). O raio direito 2 é mais longo que o raio esquerdo 2, alcançando a borda da bolsa caudal. Os raios direito e esquerdo 3, 4 e 5 são de tamanhos semelhantes. Os raios 6, em ambos os lobos, são menores que os outros. Lobo dorsal curto. Na região medial do lobo direito, a extremidade do raio 8 alcança o raio 6, mas no lobo direito os raios não alcançam um ao outro. Raio dorsal longo e mais fino, dividido em cerca de terço distal em 2 ramos. Cada ramo dividido na ponta em 2 ramos diferentes: raio 10 (interno) ligeiramente maior que o raio 9 (externo). Cone genital bem desenvolvido com ápice bifurcado 68 (55-85) de comprimento e 47 (32-53) de largura, com papilas visíveis 7 (Fig. 2f). Espículos 361 (228-361) de comprimento terminando em forma de bisel (Fig. 3a). Comprimento dos espículos em relação ao comprimento do corpo (SpL/BL) 9,3% (9,7%-10,2%). Gubernáculo com 10 (8-16) de comprimento e 34 (24-44) de largura (Fig. 2f).

Fêmea (alótipo e 10 parátipos): 3,20 (2,56-3,39) mm de comprimento e 47 (47-82) de largura no meio do corpo. Vesícula cefálica com 34 (30-46) de comprimento e 19 (19-31) de largura. Anel nervoso, derídeos e poro excretor situados a 167 (105-279), 202 (116-347) e 216 (135-292) da região anterior, respectivamente. Esôfago com 315 (160-434) de comprimento. Monodélfico (Fig. 2g). Vulva situada a 117 (75-184) da extremidade caudal. Vagina vera 21 (18-27) de comprimento, vestíbulo 49 (32-77) de comprimento e 42 (24-50) de largura, esfíncter 50 (42-76) de comprimento e 27 (22-68) de largura, infundíbulo 118 (113-218) de comprimento. Útero 940 (711-1,07) de comprimento, contendo aproximadamente 4 (1-6) óvulos com 46 (34-62) de comprimento e 25 (24-51) de largura. A região posterior bifurca-se em uma porção cônica ventral e um apêndice pós-vulvar dorsal arredondado (Fig. 3b). Porção ventral (mucron incluído) 62 (61-76) de comprimento. Cauda (mucron incluído) 46 (39-59) de comprimento. Mucron distal 10 (9-15) de comprimento. Distância do ânus até o final da cauda 30 (24-36). Apêndice arredondado com 96 (82-133) de comprimento e 89 (74-116) de largura.

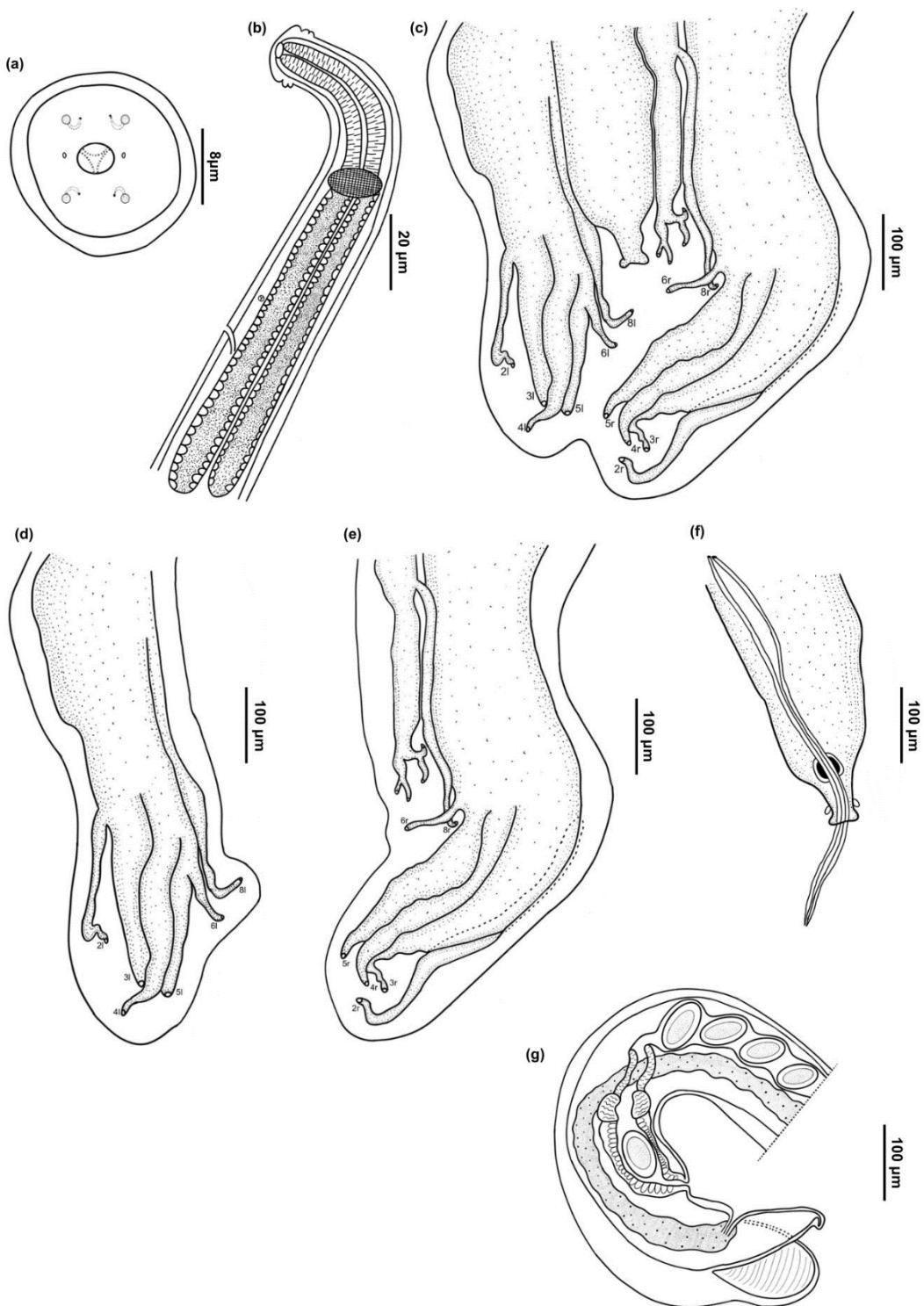


Figura 5. *Alippistongylus itatiaiaensis* (a) Região céfálica, vista apical (b) Vista lateral esquerda da extremidade anterior, mostrando anel nervoso, poro excretor, derídeos e esôfago (c) Vista ventral do macho, bolsa caudal. (d) Vista lateral do lobo esquerdo, macho. (e) Vista lateral do lobo direito, macho. (f) Vista ventral do cone genital, gubernáculo e espículos. (g) Fêmea, extremidade posterior, mostrando útero distal, vestíbulo, esfincter, infundíbulo e ovos. Abreviações: 2l–8l – raios esquerdos 2–8; 2r–8r – raios direitos 2–8.

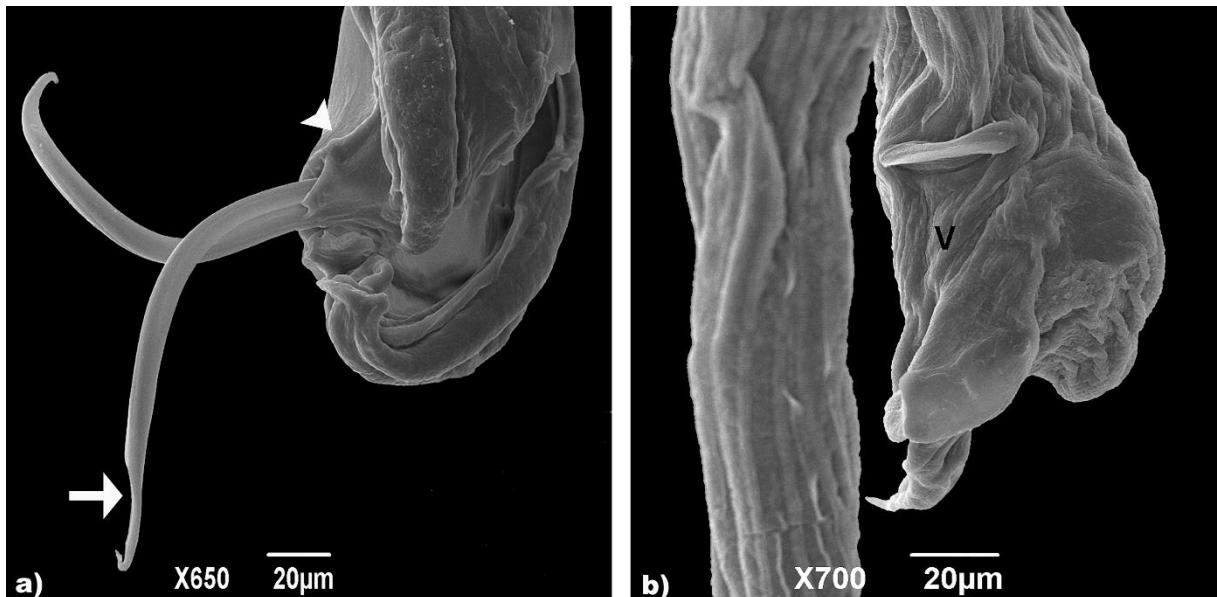


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) *Alippistongylus itatiaiaensis* (a) espículos passando pelo cone genital, com papila aparente em vista lateral macho. (b) região posterior da fêmea em vista ventral da vulva, (v) vulva.

Resumo taxonômico

Hospedeiro: *Delomys dorsalis* (Hensel, 1873)

Local de infecção: Intestino Delgado.

Localidade tipo: Vizinhança de Abrigo Lamego, Parque Nacional de Itatiaia ($22^{\circ} 25' S$ $44^{\circ} 37' W$), município de Itatiaia, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Prevalência: 20% (11 de 56 roedores coletados).

Intensidade média: 31 (339 helmintos nos 11 roedores infectados).

Abundância média: 6 (339 helmintos nos 56 roedores coletados)

Espécimes depositados: Holótipo: CHIOC 39673a (macho); alótipo: CHIOC 39673b (fêmea); parátipos: CHIOC 39674 (10 machos e 10 fêmeas).

Etimologia: O nome do epíteto específico se refere à localidade onde o nematoide foi encontrado.

2.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Alippistongylus itatiaiaensis pode ser distinguido de *A. bicaudatus* e *A. marki* com base na morfologia do apêndice feminino. Diferentemente das outras espécies, a presente espécie exibe um apêndice dorsal que não é alongado ou digitiforme, mas sim arredondado logo após a bifurcação, assumindo uma forma esférica. Além disso, tem o apêndice localizado

dorsalmente de forma semelhante a *A. bicaudatus* e em contraste com *A. marki*, no qual está posicionado ventralmente. Os padrões da bolsa caudal de *Alippistrongylus itatiaiaensis* consistem em 4-1 em ambos os lobos, diferentemente de *A. bicaudatus* que apresenta uma configuração de 1-4 no lobo esquerdo e 4-1 no lobo direito. A nova espécie pode ser ainda mais diferenciada das outras duas espécies através do raio dorsal, que é menor e assimétrico. Em *Alippistrongylus itatiaiaensis*, as extremidades dos raios 8 alcançam os raios 6, assemelhando-se a *A. bicaudatus*, enquanto em *A. marki*, emergem na metade distal do tronco dorsal. Além disso, *Alippistrongylus itatiaiaensis* difere de *A. bicaudatus* pela presença de um gubernáculo e um cone genital bem desenvolvido, características ausentes em *A. marki*. Além disso, o anel nervoso de *Alippistrongylus itatiaiaensis* está localizado anterior ao poro excretor, enquanto em *A. bicaudatus* está mais próximo do poro excretor. A orientação das cristas na sínlofe difere entre as duas espécies. *Alippistrongylus itatiaensis* exibe uma única orientação de crista em ambos os sexos, em cerca de 80° em relação ao eixo sagital. Em contraste, *A. bicaudatus* possui cristas orientadas a 60° em ambos os sexos. A Tabela 1 fornece uma comparação morfométrica entre as espécies.

Tabela 1. Morfometria das espécies de *Alippistongylus*

	<i>Alippistongylus bicaudatus</i>		<i>Alippistongylus marki</i>		<i>Alippistongylus itatiaiaensis</i>	
	Digiani and Kinsella, 2014		Drabik, Vivar and Jiménez, 2022		Lemes, Andrade, Maldonado Jr., 2024	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Comprimento	2.75-3.70	2.95-3.75	2.10-3.40	2.13-3.88	2.33-3.51	2.56-3.39
Largura	70	60-90	66-95	82-140	44-78	47-82
Vesícula céfálica	40-45 x 30	40-50 x 30-40	20-62 x 25-46	32-60 x 26-43	23-44 x 15-27	30-46 x 19-31
Anel nervoso	165-180	120-190	77-130	81-113	88-171	105-279
Poro excretor	245	210-240	46-198	128-144	145-259	135-292
Derídeo	220-270	210-240	-	-	133-242	116-347
Esôfago	305-320	260-340	146-278 x 11-22	201-318 x 15-52	196-368	160-434
Bolsa caudal	Dissimétrico	-	Simétrico	-	Dissimétrico	-
Cone genital	60 x 45-50	-	-	-	55-82 x 32-53	-
Espículos	295	-	1.00-1.46	-	228-361	-
Gubernáculo	-	-	27-39 x 13-20	-	8-16 x 24-44	-
Vulva	-	120-210	-	60-116	-	75-184
Vagina vera	-	10-15	-	33-67	-	18-27
Vestíbulo	-	50-110	-	92-594 x 34-57	-	32-77 x 24-50
Esfíncter	-	22-35 x 30-40	-	31-84	-	42-76 x 22-68
Infundíbulo	-	90-100	-	78-250	-	113-218

Útero	-	500-850	-	-	-	711-1.31
Ovos	-	40-60 x 30-45	-	55-82 x 25-46	-	32-62 x 24-51
Número de ovos	-	12-23	-	3	-	1-6
Apêndice	-	85-140 x 35-80	-	53-125 x 30-39	-	82-133 x 74-116
Porção ventral	-	113-185	-	-	-	61-76
Cauda	-	50-75	-	-	-	39-59
Mucron	-	12-25	-	-	-	9-12
Ânus	-	-	-	33-66	-	24-36
Hospedeiro	<i>Delomys dorsalis</i>		<i>Euryoryzoms nitidus</i>		<i>Delomys dorsalis</i>	
Localidade	Argentina		Peru		Brasil	

2.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Uma sequência de consenso parcial do gene 28S de *Alippistongylus itatiaiaensis*, obtida neste estudo, compreendeu 546 pares de bases de comprimento. A sequência foi depositada no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob o número de acesso PP512577. O alinhamento das sequências em nosso conjunto de dados resultou, após o corte, em uma matriz de 14 táxons. O modelo de melhor ajuste, calculado via SMS em PhyML, sob AIC, foi HKY85 +G+I (modelo de taxa livre), com quatro categorias de taxa livre, proporção de sítios invariáveis $P_{inv} = 0,644$ e parâmetro de forma gama $\alpha = 0,117$, resultando em uma árvore ML com $\ln L = -6257,889292$. A amostragem BI, após remoção de 25% de burn-in, as amostragens MCMC resultaram em $\ln L = -6264,9745$ probabilidade marginal média estimada (erro padrão = 0,0298; mediana = -6264,627). Os valores ESS foram robustos para todos os parâmetros.

As topologias de árvore produzidas com diferentes critérios de otimalidade (ML e BI) foram amplamente congruentes, mostrando Trichostrongylina como grupo monofilético, confirmando *Alippistongylus itatiaiaensis* no clado da subfamília Nippostrongylinae com valores de suporte moderados a altos (aLRT = 79%, BPP = 94%) (Fig. 4)

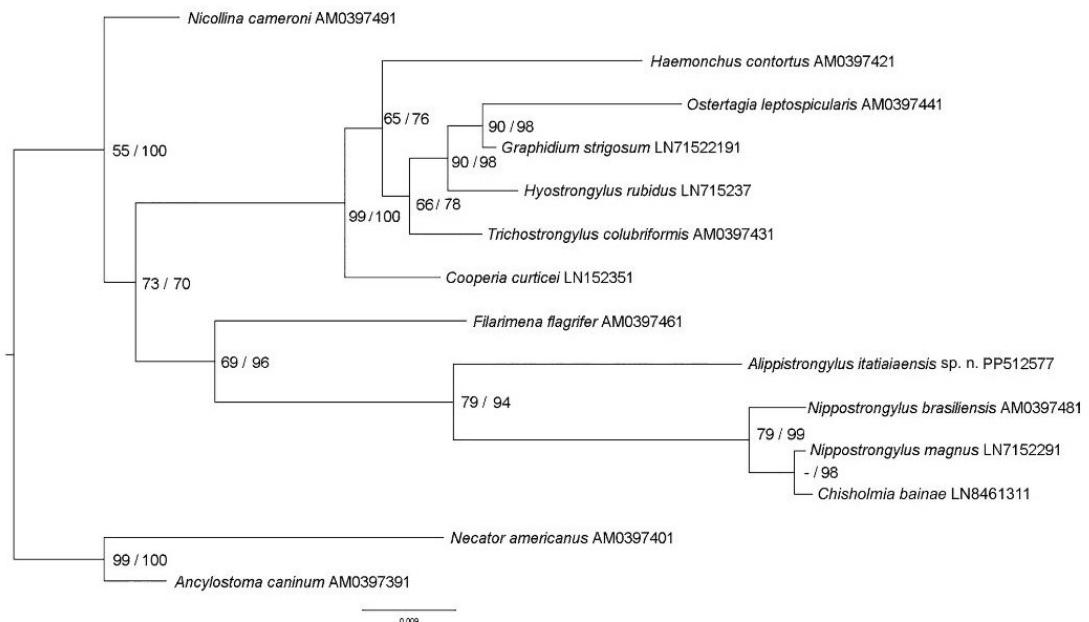


Figura 7. Árvore filogenética bayesiana para o gene 28S rRNA. Os números nos nós são aLRT (esquerda) e BPPs (direita). A barra de escala representa o número de substituições por sítio.

2.8 DISCUSSÃO

O gênero *Alippistrongylus* foi escassamente documentado na literatura, com apenas duas espécies descritas até o momento: *Alippistrongylus bicaudatus* (DIGIANI e KINSELLA, 2014) e *Alippistrongylus marki* (DRABIK, VIVAR e JIMÉNEZ, 2022). Digiani e Kinsella (2014) descreveram o gênero *Alippistrongylus* e a espécie *A. bicaudatus* no roedor *Delomys dorsalis*, o primeiro helminto relatado neste hospedeiro, capturado na província de Misiones, Argentina. Drabik et al. (2022) descreveram *A. marki* no roedor *Euryoryzomys nitidus* (Thomas, 1884) encontrado na província de La Convención, Peru. A caracterização do gênero realizada por Digiani e Kinsella (2014) delineou características distintivas, como, por exemplo, 21 cristas sinlofe irregulares em ambos os sexos; machos exibindo uma bolsa caudal assimétrica, com o lobo direito hipertrófiado, com um padrão 1-4 ou 4-1; e fêmeas com um longo apêndice dorsal cônico, posterior à vulva, formando uma aparência bicaudal. A espécie *A. marki* compartilha características diagnósticas com o gênero, mas difere de *A. bicaudatus*, notavelmente no apêndice cônico posicionado ventralmente da fêmea e machos com uma bolsa caudal simétrica tendo um padrão 2-2-1 (DRABIK *et al.*, 2022).

Delomys dorsalis, a espécie hospedeira, é um roedor terrestre encontrado em florestas úmidas tropicais e subtropicais de altas e baixas altitudes nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, bem como na região Nordeste da Argentina (CADEMARTORI *et al.*, 2005; BONVICINO *et al.*, 2008).

Nosso estudo descreve uma nova espécie parasitária que compartilha o mesmo hospedeiro que *A. bicaudatus*. No entanto, *A. itatiaiaensis* foi descoberto em altas altitudes dentro do Parque Nacional de Itatiaia, uma área intocada de Mata Atlântica aninhada no município de Itatiaia, estado do Rio de Janeiro. As distinções diagnósticas notáveis da nova espécie incluem o formato arredondado e não cônico do apêndice e a assimetria da bolsa caudal, exibindo um padrão 4-1 em ambos os lobos, confirmado assim sua novidade.

Nossa análise morfológica, embora completa, seria significativamente enriquecida pela incorporação de dados genéticos moleculares, permitindo-nos obter resultados mais precisos e abrangentes. Apesar das limitações da sequência obtida no presente estudo, uma vez que não foi possível alinhar com algumas sequências pertencentes à família Heligmonellidae como *Hassalstrongylus* e *Heligmosomoides*, a sequência genética de *A. itatiaiaensis* continua valiosa para facilitar a identificação e diferenciação molecular de espécies de *Alippistrongylus* e elucidar o status sistemático da subfamília Nippostrongylinae em estudos futuros.

A compreensão de helmintos em pequenos mamíferos dentro de áreas preservadas permanece escassa, como evidenciado por recentes divulgações de espécies (CARDOSO *et al.*, 2018). De fato, o exame de parasitos em animais selvagens é vital, servindo como bioindicadores para avaliar a dinâmica parasito-hospedeiro e a saúde ambiental (SIMÕES *et al.* 2010, CASTRO *et al.* 2017). Além disso, dadas as ameaças representadas pelas mudanças climáticas e incêndios florestais, que contribuem para a perda de biodiversidade e extinção de parasitos, dados abrangentes sobre biodiversidade são imperativos e urgentes.

3 CAPÍTULO II

**REDESCRIÇÃO DE *PROTOSPIRURA NUMIDICA* (NEMATODA: SPIRURIDA)
PARASITO DE *DELOMYS DORSALIS* (RODENTIA: SIGMODONTINAE) DA MATA
ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

RESUMO

O gênero *Protospirura* é cosmopolita e parasito de diversos mamíferos, com destaque para roedores. No entanto, a delimitação das espécies desse gênero tem sido desafiadora devido à falta de dados atualizados e à similaridade com outros grupos. Este estudo tem como objetivo contribuir para o conhecimento taxonômico de *Protospirura numidica* por meio da redescrição da espécie, utilizando técnicas modernas de microscopia eletrônica e filogenia molecular. Os espécimes analisados foram coletados em roedores *Delomys dorsalis* do Parque Nacional do Itatiaia, no Rio de Janeiro. Os resultados obtidos permitem uma caracterização mais precisa da espécie acrescentando informações sobre sua posição filogenética, desta forma, contribuindo para uma melhor compreensão da diversidade de nematoides parasitos.

Palavras-chave: Taxonomia integrativa, roedores, cricetídeos, helminto

ABSTRACT

The genus *Protospirura* is cosmopolitan and parasitic to several mammals, especially rodents. However, species delimitation of this genus has been challenging due to the lack of updated data and the similarity with other groups. This study aims to contribute to the taxonomic knowledge of *Protospirura numidica* by redescribing the species, using modern electron microscopy and molecular phylogeny techniques. The analyzed specimens were collected from *Delomys dorsalis* rodents from Itatiaia National Park, Rio de Janeiro. The results obtained allow a more precise characterization of the species, adding information about its phylogenetic position, thus contributing to a better understanding of the diversity of parasitic nematodes.

Keywords: Integrative taxonomy, rodents, cricetids, helminth

3.3 INTRODUÇÃO

Os nematoides da família Spiruridae (Orley, 1885) e do gênero *Protospirura* (Seurat, 1914) são caracterizados morfologicamente por serem longos, espessos e possuírem uma cutícula densa e estriada. Eles parasitam o estômago de mamíferos e têm uma ampla distribuição, embora sejam frequentemente confundidos com nematoides do gênero *Mastophorus* Diesing, 1853 (Spirocercidae) (SUTTON, 1989; MIQUEL *et al.*, 2023). Existem características que distinguem esses dois gêneros: *Protospirura* possui dois ou quatro dentes no pseudolábio, faringe comprimida lateralmente, papilas cloacais sésseis, cauda curta nos machos e vulva localizada na região pós-equatorial (CHITWOOD, 1938). Em contraste, *Mastophorus* tem três, cinco, sete ou nove dentes no pseudolábio, uma faringe cilíndrica, papilas pedunculadas, uma cauda longa nos machos e uma vulva pré-equatorial (CHITWOOD, 1938).

Roedores sigmodontíneos são endêmicos dos Neotrópicos, incluindo a espécie *Delomys dorsalis* (PATTON, 2015). A Mata Atlântica, um dos maiores biomas do mundo, possui uma grande diversidade de fauna e flora (MYERS *et al.*, 2000). No entanto, a crescente urbanização e a ação humana descontrolada levaram à devastação da região (MMA, 2024). O Parque Nacional do Itatiaia (PNI) prioriza a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica (ICMBIO, 2024).

A redescrição de espécies é importante quando as descrições originais são insuficientes ou incompletas, seja por métodos antigos ou falta de detalhes essenciais. A incorporação de novas tecnologias, como microscopia avançada e análise molecular, também justifica essa revisão, pois revelam informações antes desconhecidas (SMALES *et al.*, 2009). Além disso, mudanças na classificação taxonômica, devido a novas descobertas ou revisões científicas, tornam a redescrição necessária para refletir o conhecimento atualizado sobre as espécies (RAFAEL, 2001).

Ferramentas de taxonomia integrativa são relevantes em estudos de descrição e redescrição de espécies, uma vez que com elas é possível fornecer ou acrescentar novas informações a respeito de características moleculares e morfológicas que antes não foram possíveis de ser observada (PERIN *et al.*, 2023; LOPES-TORRES *et al.*, 2024; LEMES *et al.*, 2024; MACHADO *et al.*, 2024).

Neste capítulo, propomos uma redescrição da espécie *Protospirura numidica*, parasita do estômago do roedor *Delomys dorsalis* coletado no Parque Nacional da Itatiaia (PNI), no estado do Rio de Janeiro. Nossa objetivo é fornecer uma compreensão mais aprofundada desta espécie através da aplicação de técnicas de taxonomia integrativa, devido a antiguidade da

descrição original e pela incorporação de novas metodologias taxonômicas que permitem uma caracterização mais completa e precisa do parasita. Este estudo faz parte de um projeto de pesquisa em biodiversidade mais amplo que investiga vários táxons na Mata Atlântica.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Espécimes, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura

As metodologias empregadas nesta sessão foram as mesmas utilizadas no capítulo anterior.

3.4.2 Análise molecular e árvore filogenética

O DNA foi extraído de espécime macho (1) e fêmea (1) de *Prospirura numidica* usando o Qiagen QIAamp DNA Minikit, seguindo o protocolo do fabricante. O DNA foi amplificado usando os primers 18S rDNA PHYSA_F e PHYSA_R (GOMES *et al.* 2015). A reação de PCR 18s rDNA foi realizada em um volume total de 25 µL, composto por: 12,5 µL de PCR Master Mix da Promega Corporation (50 unidades/mL Taq DNA polymerase, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl2), 0,5 µL de primer direto, 0,5 µL de primer reverso, 8,5 µL de água ultrapura e 3 µL de DNA extraído.

O DNA também foi amplificado usando COI, com uma reação dos primers CoiF e CoiR (Prosser *et al.* 2013). A reação de PCR do mitDNA COI foi realizada em um volume total de 25µL, composto por: 12,5µL de PCR Master Mix da Promega Corporation (50 unidades/mL de Taq DNA polimerase, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl2), 1µL de primer direto, 1µL de primer reverso, 8,5µL de água ultrapura e 2µL de DNA extraído.

Foi utilizado Bio-Rad T100TM Thermal Cycler para ambos os processos de ciclagem de reações de PCR seguindo as condições de Jost *et al.* (2024) para 18S rDNA e Gaillard *et al.* (2020) para COI mtDNA. A purificação de DNA foi realizada usando o Qiagen QIAquick PCR Purification Kit, seguindo o protocolo do fabricante. O sequenciamento de amplicons foi realizado da subunidade RPT01A foi realizado utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) em um sequenciador de DNA ABI 3730, na Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Os fragmentos resultantes foram montados em *contigs* e editados para eliminar ambiguidades com o software

Geneious R9.1 (KEARSE *et al*, 2012), para fornecer sequências de consenso. As sequências obtidas foram depositadas no banco de dados GenBank sob o número de acesso xxxx e xxxx.

O software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), versão 11 (TAMURA *et al*, 2021) forneceu análise filogenética para 18S rDNA com base na máxima verossimilhança (ML), com Kimura 2-parâmetro com distribuição gama, e para Tamura-Nei mitocondrial com distribuição gama com sítios invariantes. O método Bootstrap com 1.000 replicações bootstrap foi usado para o teste de filogenia para ambas as análises de primers. O MrBayes versão 3.2.6 (RONQUIST *et al*, 2012) realizou inferência bayesiana (BI) no XSEDE, por meio do CIPRES Science Gateway (MILLER *et al*, 2010). As sequências disponíveis no GenBank usadas nas análises filogenéticas estão nas respectivas árvores (Fig. 8 e Fig. 9).

3.5 RESULTADOS

Resumo taxonômico

Família **Spiruridae** Oerley, 1885

Gênero **Protospirura** Seurat, 1914

Protospirura numidica Seurat, 1914

Hospedeiro: ***Delomys dorsalis*** (Hensel, 1873)

Localidade-tipo: Vizinhança de Abrigo Lamego, Parque Nacional de Itatiaia ($22^{\circ} 25' S$ $44^{\circ} 37' W$), município de Itatiaia, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Material-tipo: Sete machos e nove fêmeas.

Geral: Nematoides longos e grossos com cutícula espessa e estriada. Na região cefálica, podem ser vistos dois pseudolabios, cada um com um lobo mediano maior e dois lobos laterais menores. O lobo mediano tem quatro dentes e os lobos laterais têm dois dentes trifurcados cada (Fig. 5a). Dois pares de papilas cefálicas localizadas acima dos lábios e um par de anfídeos (Fig. 5b). A faringe é bem desenvolvida e o esôfago é dividido em regiões glandular e muscular. A vulva está localizada na região pós-equatorial (Fig. 6b) e o ânus na parte mais distal da cauda da fêmea (Fig. 6c). Os machos têm dois espículos de tamanho desigual, sendo o da direita mais longo (Fig. 6a) e o da esquerda mais curto e com a ponta em formato de lança, e um gubernáculo bem desenvolvido. Eles também têm quatro pares de papilas pré-cloacal (Fig. 7a e 7c), uma única papila ímpar (Fig. 7a e 7c) antes da cloaca, dois pares de grandes papilas pós-cloacal (Fig.

7b e 7c), seguidas por três pares de pequenas papilas e um par de fasmídeos perto do último par de papilas (Figura 7d).

Macho (n=7): 17,77 – 23,05 mm de comprimento e 0,40 – 0,57 de largura no meio do corpo. Anel nervoso, derídeos e poro excretor situados a 0,29 – 0,53, 0,13 – 0,41 e 0,31 – 0,76 da região anterior, respectivamente. Esôfago 2,94 – 4,32 de comprimento. Faringe 0,08 – 0,14 de comprimento. Quatro pares de papilas pré-cloacal, uma única papila ímpar antes da cloaca, dois pares de grandes papilas pós-cloacal, seguidas por quatro pares de pequenas papilas e um par de fasmídeos perto do último par de papilas. Espículos assimétricos. Espículo direito 0,93 – 1,67 de comprimento. Espículo esquerdo 0,42 – 0,65 de comprimento. Gubernáculo 0,11 – 0,19 de comprimento.

Fêmea (n=9): 28,32 – 39,16 mm de comprimento e 1,07 – 1,45 de largura no meio do corpo. Anel nervoso, derídeos e poro excretor situados a 0,58 – 1,14, 0,38 – 0,64 e 0,67 – 1,37 da região anterior, respectivamente. Esôfago 3,78 – 5,81 de comprimento. Faringe 0,18 – 0,42 de comprimento. Vulva na região pós-equatorial 1,02 – 1,52 da extremidade posterior. Ovos elípticos 0,050 – 0,060 x 0,033 – 0,043 de diâmetro. Ânus a 0,17 – 0,55 da terminação da cauda. Cauda curta e com terminação romba.

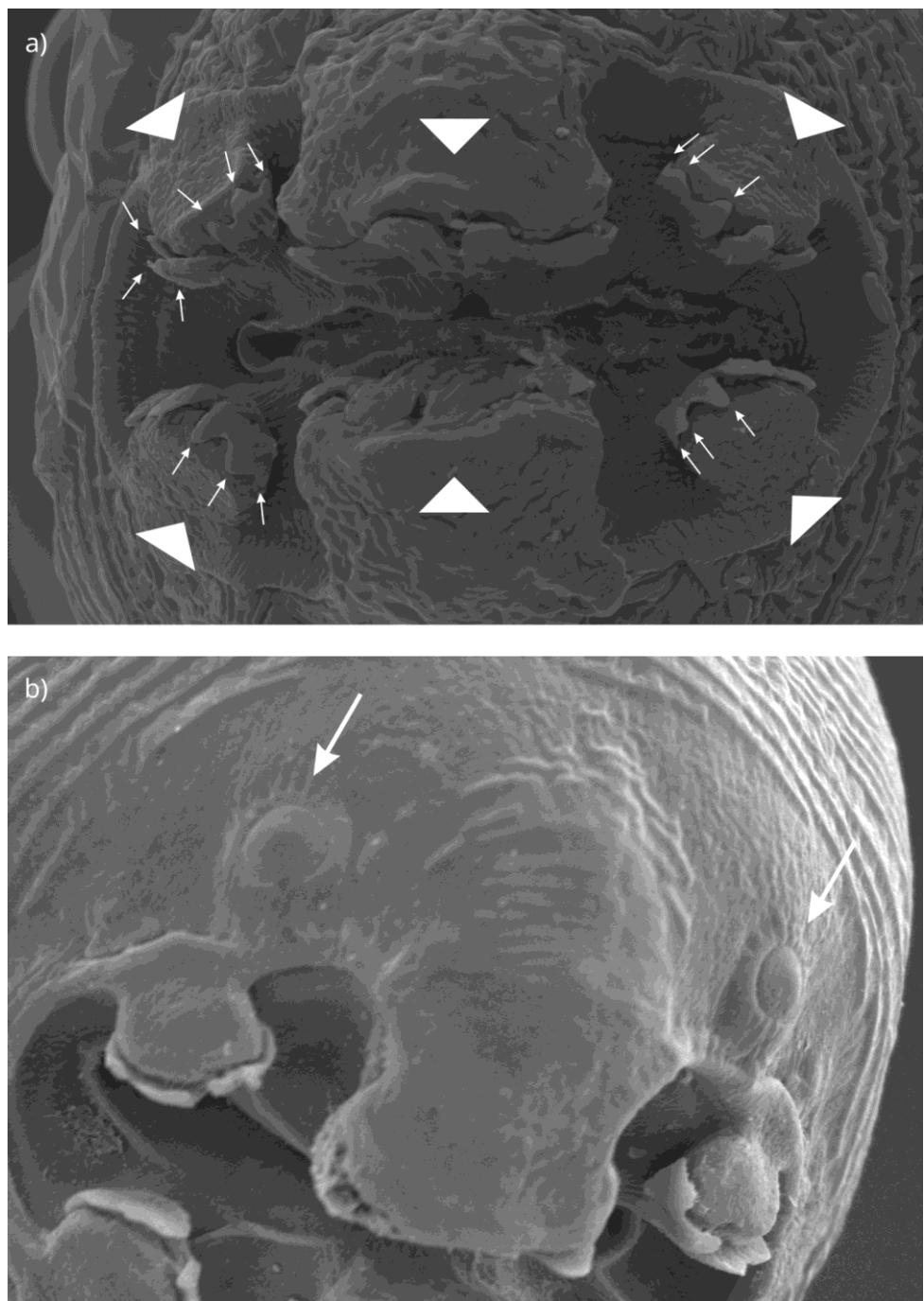


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) *Protospirura numidica*, macho, regiãocefálica. a) Abertura dos lábios com os lobos medial e laterais, as setas indicam a trifurcação dos dentes. b) Par superior de papilas cefálicas.

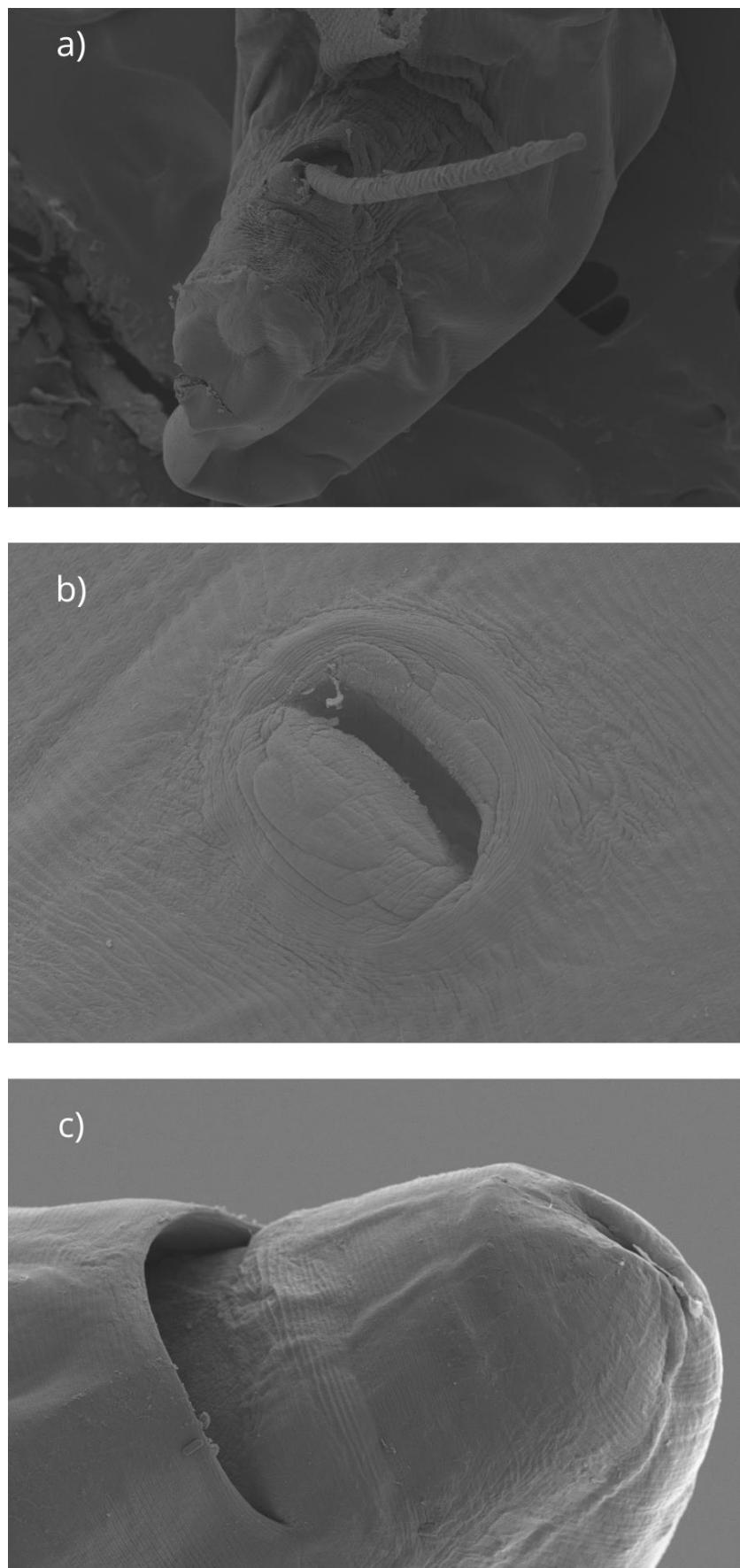


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) *Protospirura numidica*, região posterior macho e fêmea.
a) Espículo transpassando a cloaca. b) Abertura da vulva. c) Ânus na região terminal.

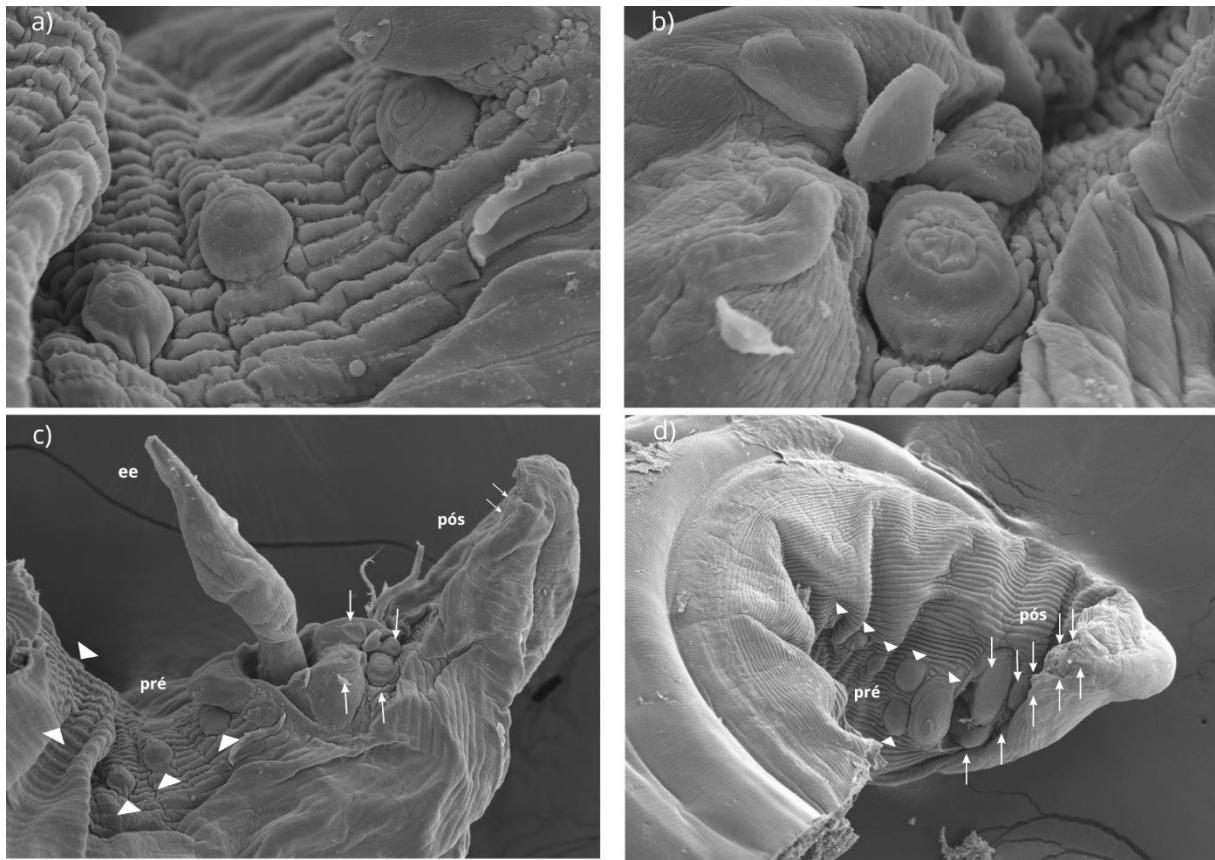


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) *Protospirura numidica*, região posterior macho. Papilas terminais. a) Dois pares de papilas pré-cloacal e papila ímpar. b) Primeiro par de papilas pós-cloacal. c) Vista ventral da região posterior do macho, onde as cabeças de seta indicam as papilas pré-cloacal, as setas indicam as papilas pós-cloacal e “ee” significa espículo esquerdo. d) Vista lateral da região posterior, onde as cabeças de seta indicam as papilas pré-cloacal, as setas indicam as papilas pós-cloacal e * indica o fasmídeo.

3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

O sequenciamento com o uso do marcador 18S deu origem a uma sequência com 794 pares de base. A sequência foi depositada no GenBank sob o número de acesso XXXX. O modelo evolutivo mais adequado foi Kimura 2-parâmetros com distribuição gama para o gene 18S. Após alinhamento e seleção, obtivemos matrizes de dados com 13 táxons e 827 caracteres, dos quais 304 eram conservados e 381 eram variáveis parcimônio-informativos. A inferência Bayesiana calculou uma probabilidade marginal estimada média de -2970,512, com um valor mediano de -2970,198. O tamanho efetivo da amostra para todos os parâmetros foi 12905, demonstrando a robustez das amostras. As duas topologias construídas com diferentes critérios de otimalidade, ML e BI, foram similares, com pouca variação nos valores de suportes dos nós. O espécime *Protospirura numidica* aqui sequenciado agrupou com outro espécime do gênero

Protospirura com um alto valor de repetição para ML (80%) e alto valor de probabilidade de suporte de nós na BI (BBP = 0,98) (Fig. 8).



Figura 11. Relações filogenéticas entre sequências de espécies selecionadas da família Spirurida, incluindo o espécime de *Protospirura numidica* aqui sequenciado, com base em análises do gene 18S. A árvore foi inferida utilizando a máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI). O suporte nodal é descrito à esquerda pelos valores obtidos na ML e à direita pelos obtidos na BI. * indica que este valor de nó não foi calculado. - indica valores de suporte nodal inferior a 70 ou 0,7.

O sequenciamento com o uso do marcador CO1 deu origem a duas sequências com 444 pares de base. As sequências foram depositadas no GenBank sob o número de acesso XXXX. O modelo evolutivo mais adequado foi Tamura-Nei com distribuição gama para o gene CO1. Após alinhamento e seleção, obtivemos matrizes de dados com 18 táxons e 450 caracteres, dos quais 165 eram conservados e 276 eram variáveis parcimônio-informativos. A inferência Bayesiana calculou uma probabilidade marginal estimada média de -2341,5149, com um valor mediano de -2341,235. O tamanho efetivo da amostra para todos os parâmetros foi 6235,8, demonstrando a robustez das amostras. As duas topologias construídas com diferentes critérios de otimalidade, ML e BI, foram similares, com pouca variação nos valores de suportes dos nós. O clado formado por espécimes *Protospirura numidica* aqui sequenciados agruparam com um

clado de espécimes *Protospirura canariensis* e com um clado de espécimes do gênero *Protospirura* com valores de suporte baixo a moderado (ML=44%; BBP = 0,63) (Fig. 9).

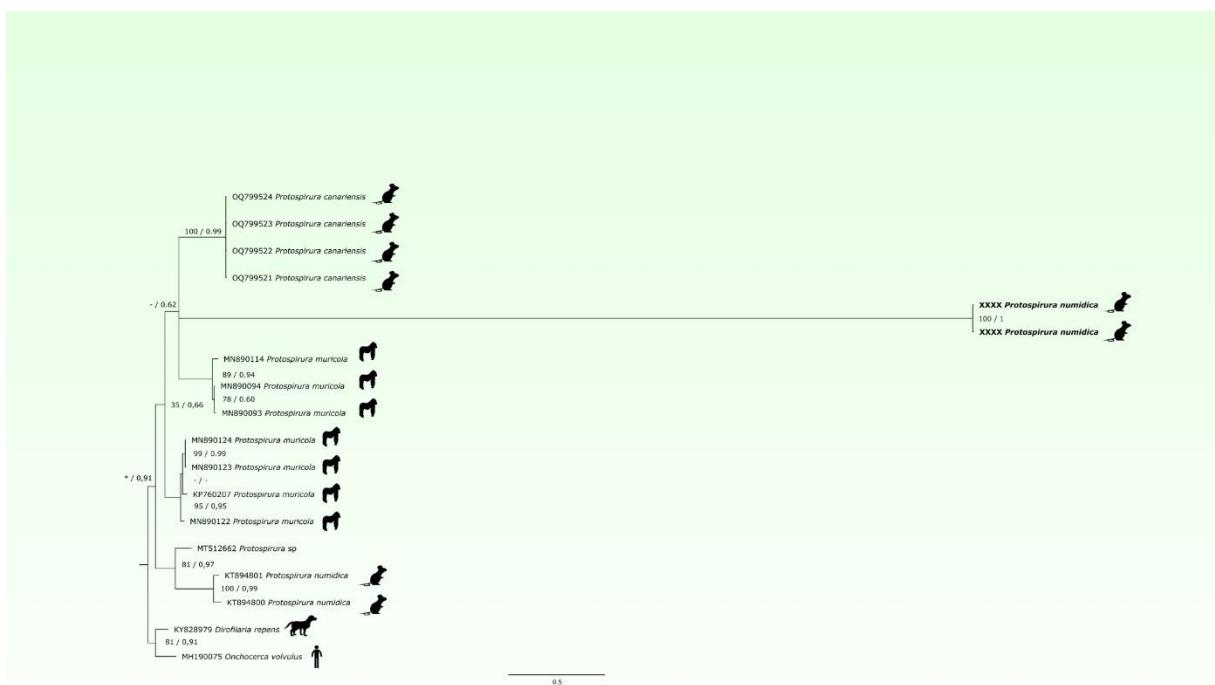


Figura 12. Relações filogenéticas entre sequências de espécies selecionadas da família Spirurida, incluindo o espécime de *Protospirura numidica* aqui sequenciado, com base em análises do gene CO1. A árvore foi inferida utilizando a máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI). O suporte nodal é descrito à esquerda pelos valores obtidos na ML e à direita pelos obtidos na BI. * indica que este valor de nó não foi calculado. - indica valores de suporte nodal inferior a 60 ou 0,6.

Tabela 2. Dados utilizados na formação da árvore filogenética.

Família	Espécie	Gene	Código de acesso	Hospedeiro	Localidade
Spiruridae	Unknown spirurid	18s	JQ771745; JQ77146	<i>Podarcis lilfordi</i> ; <i>Algyroides marchi</i>	Peninsula Ibérica
	<i>Protospirura</i> sp.	18S	KY462830	<i>Mastomys colcha</i>	África do Sul
		28s	MT512662	Não disponível	Não disponível
	<i>P. numidica</i>	18s	KT89481; KT894812	Não disponível; <i>Oxymycterus delator</i>	Não disponível
		28s	KT894801; KT894800	<i>Oxymycterus delator</i>	Brasil
		18s	KP760162	<i>Gorilla</i> sp.	Não disponível
	<i>P. muricola</i>	28s	MN89024; KP760207; MN890122	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Camarões
			MN890093; MN890094; MN890114		
	<i>P. canariensis</i>	28s	OQ799521; OQ799522; OQ799523; OQ799524	<i>Rattus rattus</i>	Ilhas Canárias
Spirocercidae	<i>Cyclospirura petrowi</i>	18s	KM434335	<i>Felis silvestris</i>	Alemanha
Gongylonematidae	<i>Gongylonema</i> sp.	18s	JX401925	<i>Otus scops</i>	Espanha
	<i>Gongylonema</i> neoplasticum	18s	LC331000	<i>Rattus norvegicus</i>	Tailândia
	<i>Gongylonema pulchrum</i>	18s	AB495401	<i>Saimiri boliviensis</i>	Japão
Onchocercidae	<i>Onchocerca volvulus</i>	28s	MH190075	<i>Homo sapiens</i>	Camarões
	<i>Dirofilaria repens</i>	18s	MG780293; AB973229	<i>Canis lupus familiaris</i> ; <i>Homo sapiens</i>	Índia; Japão
		28S	KY828979	<i>Canis lupus familiaris</i>	Finlândia

3.7 DISCUSSÃO

O gênero *Protospirura*, descrito por Seurat (1914), teve como representante inicial a espécie *Protospirura numidica*, encontrado inicialmente em felinos *Felis ocreata* na América do Norte. Até o momento, foram descritas 15 espécies deste gênero, distribuídas por diversos continentes, com destaque para a Ásia (3 espécies), África (2), América do Norte (2), Oceania (2) e Europa (1). Os principais hospedeiros são roedores, felinos e toupeiras (MIQUEL *et al.*, 2023; SMALES, 2021; RIBAS *et al.*, 2012; SMALES, HARRIS e BEHNKE, 2009; SMALES, 2001; ORDAZ E ESPINOZA, 1995; HASEGAWA, 1990; YOKOHATA e HISASHI ABE, 1989; BARBERO e MATTHIAS, 1967). No entanto, não foi possível localizar os registros originais de cinco dessas espécies para comparações detalhadas, como demonstrado na Tabela 2. Apesar da variedade de espécies, esse gênero apresenta uma morfologia muito similar, dificultando o diagnóstico. Entretanto, há algumas características que podem auxiliar na identificação, como a quantidade de dentes nos lobos da abertura oral, a disposição da vulva nas fêmeas e a quantidade de papilas terminais (MIQUEL *et al.*, 2023).

A abertura oral apresenta dois pseudoslábios, característico do gênero *Protospirura*, cada um com um lobo medial mais longo e dois lobos laterais menores. Segundo Seurat (1914), na descrição original do *Protospirura numidica*, cada lobo era composto por três dentes. Porém, com as técnicas de MEV utilizadas no presente trabalho foi possível observar quatro dentes no lobo medial e dois dentes trifurcados em cada lobo lateral, sendo assim uma contribuição relevante para a atualização de característica morfológica dessa espécie.

As espécies *P. canariensis* (MIQUEL *et al.*, 2023) e *P. peromysci* (BABERO e MATTHIAS, 1967) se diferenciam da espécie *P. numidica* por apresentarem quatro dentes no lobo medial e dois dentes simples nos lobos laterais. Já as espécies *P. muricola* (GEDOELST, 1916; SMALES, 2009), *P. kaindiensis* (SMALES, 2001) e *P. munimuniensis* (SMALES, 2021) são caracterizadas por possuírem dois dentes em cada um dos lobos. *P. okinavensis* (HASEGAWA, 1990) e *P. siamensis* (RIBAS *et al.*, 2012) apresentam quatro dentes em cada lobo, *P. mexicana* (ORDAZ e ESPINOZA, 1995) possui um dente em cada lobo lateral e dois dentes no lobo medial e *P. pseudomuris* (YOKOHATA e HISASHI ABE, 1989) apresenta um dente em cada lobo. Desta forma, estas espécies se distinguem de *P. numidica* que possui no lobo mediano quatro dentes e dois dentes trifurcados em cada lobo lateral.

As papilas terminais são formadas por um conjunto de papilas localizadas na região posterior, abrangendo tanto a região pré-cloacal quanto a pós-cloacal. *Protospirura numidica* conta com quatro pares de papilas pré-cloacal, uma papila ímpar acima da abertura da cloaca e

cinco pares pós-cloacal, sendo os dois primeiros maiores e o três últimos menores. As espécies pertencentes ao gênero *Protospirura* possuem um número varável de papilas pré e pós cloacal de acordo com a espécie: *P. munimuniensis*, *P. muricola* e *P. pseudomuris* são semelhantes pois apresentam quatro pares de papilas pré-cloacal, uma papila ímpar na região da cloaca e seis pares pós-cloacal (SMALES, 2021; SMALES, 2009; YOKOHATA e HISASHI ABE, 1989; GEDOELST, 1916;). *P. peromysci* têm quatro pares pré-cloacal, e sete pares pós-cloacal, sendo os dois primeiros maiores e cinco últimos menores (BARBERO e MATTHIAS, 1967). *P. okinavensis* pode ter cinco ou seis pares pré-cloacal, e quatro pares pós-cloacal (HASEGAWA, 1990). *P. kaindiensis* tem quatro pares pré-cloacal e cinco pares pós-cloacal (SMALES, 2001). *P. siamensis* pode ter quatro ou cinco pares pré-cloacal e quatro pares pós-cloacal (RIBAS *et al.*, 2012). Todas as espécies apresentam uma papila ímpar anteriormente a abertura da cloaca. As que apresentam menor quantidade papilas são *P. canariensis* (quatro pares pré-cloacal e quatro pares pós-cloacal) e *P. mexicana* (quatro pares pré-cloacal e três pares pós-cloacal) (MIQUEL *et al.*, 2023; ORDAZ e ESPINOZA, 1995).

Em relação ao posicionamento da vulva algumas espécies apresentam a abertura do órgão na região pré-equatorial e outras pós-equatorial. Na espécie *P. numidica* a vulva está localizada na região pós-equatorial, assim como em *P. siamensis*, *P. muricola*, *P. mexicana* e *P. peromysci* (RIBAS *et al.*, 2012; SMALES, 2009; ORDAZ e ESPINOZA, 1995; BARBERO e MATTHIAS, 1967; GEDOELST, 1916;). Já nas espécies *P. canariensis*, *P. kaindiensis*, *P. okinavensi* e *P. pseudomuris* fica situado na região pré-equatorial (MIQUEL *et al.*, 2023; SMALES, 2001; HASEGAWA, 1990; YOKOHATA e HISASHI ABE, 1989).

Quentin *et al.* (1968) propuseram a criação da subespécie *Protospirura numidica criceticola* com base em diferenças morfológicas como o tamanho do espículo do macho e a disposição das papilas terminais, além de diferenças nos hospedeiros (cães selvagens e roedores) e na distribuição geográfica (América do Norte e do Sul). Os autores sugeriram que todos os espécimes americanos fossem incluídos nessa subespécie. Estudos utilizando outras ferramentas como MEV, assim como biologia molecular são cruciais para confirmar ou refutar essa classificação. É possível que análises genéticas revelem diferenças significativas entre os espécimes americanos e os demais, indicando a existência de mais uma espécie em vez de uma subespécie. Portanto, uma combinação de dados morfológicos e moleculares é fundamental para uma classificação taxonômica precisa e confiável.

Devido suas características morfológicas muito semelhantes os gêneros *Protospirura* e *Mastophorus* são frequentemente confundidos. Segundo Chitwood (1938) e Miquel *et al.*

(2023) o que diferencia essas espécies é a quantidade de dentes presente nos pseudolabios, dois ou quatro no *Protospirura* e três, cinco, sete ou nove no *Mastophorus*. Os autores também destacam a morfologia da faringe, sendo comprimida lateralmente em *Protospirura* e cilíndrica em *Mastophorus*. Papilas sésseis e cauda curta em *Protospirura* e papilas pedunculadas e cauda longa em *Mastophorus*, vulva em posição pós-equatorial em *Protospirura* e pré-equatorial no *Mastophorus* (CHITWOOD, 1938; MIQUEL *et al.*, 2023). Descrições mais recentes, como *P. canariensis* (MIQUEL *et al.*, 2023), revelam que as distinções anteriormente estabelecidas entre essas espécies não são mais tão precisas. O ideal é que informações moleculares sejam adicionadas ao banco de dados para que se possa fazer uma análise molecular mais detalhada e com isso conseguir um diagnóstico mais preciso.

O presente estudo forneceu a primeira sequência de 18S de *Protospirura numidica* coletado de *Delomys dorsalis* no Brasil. Essa sequência agrupou com outra sequência do gênero *Protospirura* (KY462830), cujo espécime foi coletado do roedor murídeo *Mastomys colcha* em Gouteng, África do Sul (JULIUS *et al.*, 2017). Entre essas sequências havia 7 pares de bases diferentes. Julius *et al.* (2017) não conseguiram chegar na identificação da espécie, contribuindo apenas com a sequência genética. Além disso, os autores sugerem que este espécime pode representar uma nova espécie, porém ressalta a necessidade de estudos taxonômicos mais aprofundados para confirmar essa hipótese.

Também fornecemos as primeiras sequências CO1 de *Protospirura numidica* coletado de *D. dorsalis* no Brasil. A sequência agrupou com sequências de *Protospirura canariensis* (OQ799524, OQ799523, OQ799522, OQ799521), coletado do roedor *Rattus rattus* em Ilhas Canárias, Espanha (MIQUEL *et al.*, 2023). Entre as sequências havia 294 pares de bases diferentes. A sequência de *P. numidica* também agrupou com sequências de *P. muricola* (MN890114, MN890094, MN890093), coletadas de amostras de fezes dos primatas *Gorilla gorilla* e *Cercopithecus nictitans* em Camarões (GAILLARD *et al.*, 2020). Entre as sequências havia 261 pares de bases diferentes. Essas bases distintas encontradas entre as sequências podem ser explicadas por serem espécies e hospedeiros diferentes e regiões distintas. Embora Gaillard *et al.* (2020) alegarem que as amostras foram coletadas de fezes de primatas, eles também ressaltam que não podem excluir a possibilidade de contaminação cruzada de *P. muricola* através de fezes de roedores, uma vez que estes são os principais hospedeiros dessa espécie.

No presente estudo através da análise da árvore filogenética dos genes CO1 foi possível observar que duas sequências de *P. numidica* (KT894801, KT894800) não se agruparam com

as sequencias de *P. numidica* produzidas no presente estudo e ainda formaram um clado distinto. Jost *et al.* (2024) apontam um possível caso de equívoco na identificação, onde *Mastophorus* pode ter sido identificado como *Protospirura* em espécimes coletados no roedor do gênero *Oxymycterus* aqui no Brasil. Fato observado pela análise filogenética utilizando as sequencias *P. numidica* (KT894801, KT894800). Estas as sequencias foram depositadas como *P. numidica*, mas na árvore filogenética os espécimes ficaram agrupados a um clado formado por *Mastophorus*, indicando assim que aquelas amostras apresentavam mais similaridade com o gênero *Mastophorus* do que com *Protospirura* (JOST *et al.*, 2024). De fato, no presente estudo observamos que as sequencias de *P. numidica* (KT894801, KT894800), cujo hospedeiro é o roedor *Oxymycterus dasytrichus*, agrupou com um clado de outra sequência de *Protospirura* sp. (MT512662). O fato dessas sequências não terem agrupado com as sequências de *P. numidica* fornecida por este trabalho, pode indicar que esses espécimes não pertençam de fato ao gênero *Protospirura*. Sendo assim, se faz necessário uma revisão das características morfológicas e moleculares dos espécimes de *Protospirura numidica* (KT894801, KT894800).

A combinação de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises moleculares permitiu uma redescrição mais completa da espécie, detalhando características morfológicas, especialmente os dentes labiais. Essa abordagem representa um avanço significativo para o gênero, fornecendo uma base sólida para futuras pesquisas taxonômicas.

Tabela 3. Diferença entre as espécies do gênero *Protospirura*. M - lábio medial. L - lábio lateral.

	Nº de dentes	Papilas terminais	Localização da vulva	Hospedeiro	Localidade
<i>Protospirura numidica</i> (redescrição) Presente estudo	M: 4; L: 2 (trifurcados)	9 pares e 1 não pareado	Pós-equatorial	<i>Delomys dorsalis</i>	Brasil
<i>Protospirura canariensis</i> Miquel et al., 2023	M: 4; L: 2	8 pares e 1 não pareado	Pré-equatorial	<i>Rattus rattus</i>	Espanha
<i>Protospirura munimuniensis</i> Smales, 2021	M: 2; L: 2	10 pares e 1 não pareado	Não informado	<i>Chiruromys lamia</i>	Papua Nova Guiné
<i>Protospirura siamensis</i> Ribas et al., 2012	M: 4; L: 4	8 ou 9 pares e 1 não pareado	Pós-equatorial	<i>Bandicota indica, Berylmys spp.; Mus spp.; Rattus spp.</i>	Tailândia
<i>Protospirura muricola</i> (redescrição) Smales, Harris e Behnke 2009	M: 2; L: 2	10 pares e 1 não pareado	Pós-equatorial	<i>Cricetomys gambianus</i>	República Democrática do Congo
<i>Protospirura kaindiensis</i> Smales, 2001	M: 2; L: 2	9 pares e 1 não pareado	Pré-equatorial	<i>Pseudohydromys murinus</i>	Papua Nova Guiné
<i>Protospirura mexicana</i> Ordaz e Espinoza, 1995	M: 2; L: 1	7 pares 1 não pareado	Pós-equatorial	<i>Peromyscus difficilis</i>	México
<i>Protospirura okinavensi</i> Hasegawa, 1990	M: 4; L: 4	9 ou 10 pares e 1 não pareado	Pré-equatorial	<i>Mus caroli</i>	Japão
<i>Protospirura pseudomuris</i> Yokohata e Hisashi Abe, 1989	M: 1; L: 1	10 pares e 1 não pareado	Pré-equatorial	<i>Mogera wogura e M. kobeae</i>	Japão
<i>Protospirura peromysci</i> Barbero e Matthias, 1967	M:4; L:2	11 pares e 1 não pareado	Pós-equatorial	<i>Peromyscus maniculatus e P. truci</i>	Estados Unidos

4. CONCLUSÕES GERAIS

- Foi descrita uma nova espécie de nematódeo do gênero *Alippistrongylus*, denominada *A. itatiaiensis* baseada em dados morfológicos, morfométricos, moleculares e imagens de MEV. Assim, demonstra a escassez de conhecimento sobre a helmintofauna do roedor cricetídeo *D. dorsalis* endêmico da Mata Atlântica. Desta forma, este estudo preenche uma lacuna importante no conhecimento sobre a biodiversidade parasitária da Mata Atlântica.
- Foi realizado a redescrição da espécie *Protospirura numidica* com base em dados morfológicos detalhados e análises filogenéticas. Contribuindo para uma melhor compreensão da morfologia e filogenia da espécie.
- A utilização de ferramentas de taxonomia integrativa como MEV e biologia molecular mostraram-se relevantes nas descrições e redescrição de espécies incluindo informações que poderão auxiliar na identificação de novas espécies e na compreensão das relações entre parasitos e hospedeiros.
- O estudo contribui para a área da parasitologia de pequenos mamíferos e para a conservação da biodiversidade.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic Biology**, v.55, n.4, p.539-552, 2006. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>.

BABERO, B.; MATTHIAS, D. *Protospirura peromysci* n. sp. (Nematoda: Spiruridea) and other helminths from *Peromyscus* spp. in Nevada. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v.34, p.255-261, 1967.

BELLOMO, C.; ALONSO, D.O.; RICARDO, T.; COELHO, R.; KEHL, S.; PERILO, N.; AZOGARAY, V.; CASAS, N.; OTTONElli, M.; BERGERO, L.C.; CUDÓS, M.C.; PREVITALI, A.; MARTINEZ, V.P.; Emerging hantaviruses in Central Argentina: First case of Hantavirus Pulmonary Syndrome caused by Alto Paraguay virus, and a novel orthohantavirus in *Scapteromys aquaticus* rodent. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.15, n.11, p.1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009842>.

BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J.L. **Ecology**. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.

BEHNKE, J.M.; LEWIS, J.W.; MOHDEAIN, S.N.; GILBERT, F.S. Helminth infections in *Apodemus sylvaticus* in southern England: interactive effects of host age, sex and year on the prevalence and abundance of infections. **Journal of Helminthology**, v.73, n.1, p.31-44, 1999.

BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J.A.; D'ANDREA, P.S. **Guia Dos Roedores Do Brasil: Com Chave Para Gêneros Baseadas Em Caracteres Externos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008.

BOULLOSA, R.G.; SIMÕES, R.O.; ANDRADE-SILVA, B.E.; GENTILE, R.; MALDONADO, A. A new heligmonellid (Nematoda) species of the genus *Stilestrongylus* in *Euryoryzomys russatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Atlantic Forest, southern Brazil. **Journal of Helminthology**, v.93, n.3, p.352-355, 2019. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18000251>.

BRAGA, B.V.; LIMA, L.R.; BELEM, L.F.; OLIVEIRA, D.A.; MIRANDA, K.R.; LOPES-TORRES, E.J. Structural insights into *Trichuris muris* eggs through 3D modeling, Cryo-SEM, and TEM of samples prepared with HPF-FS. **Experimental Parasitology**, v.271, p.108924, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2025.108924>.

BRYDA, E.C. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. **Missouri Medicine**, v.110, p.207-211, 2013.

CADEMARTORI, C.V. Reproductive biology and daily and seasonal abundance patterns of *Delomys dorsalis* (hensel, 1872) – cricetidae, sigmodontinae – in an area of mixed forest with conifers, Rio Grande do Sul state, Brazil. **Mastozoología Neotropical**, v.10, n.2, p.342, 2003.

CADEMARTORI, C.V.; FABIÁN, M.E.; MENEGHETI, J.O. Biología reproductiva de *Delomys dorsalis* (Hensel, 1872) - Rodentia, Sigmodontinae - em área de floresta ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. **Mastozoología Neotropical**, v.12, n.2, p.133-144, 2005.

CARDOSO, T.S.; MACABU, C.E.; SIMÕES, R.O.; COSTA-NETO, S.F.; MALDONADO JR, A.; GENTILE, R.; LUQUE, J.L. Estrutura da metacomunidade de helmintos de roedores silvestres em uma área preservada da floresta atlântica, sudeste do brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.27, n.4, p.495-504, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180066>.

CARDOSO, T.S.; MACABU, C.E.; SIMÕES, R.O.; COSTA-NETO, S.F.; MALDONADO JR, A.; LUQUE, J.L.; GENTILE, R. Helminth community structure of two sigmodontine rodents in Serra dos Órgãos national park, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Oecologia australis**, v.23, n.2, p.301-314, 2019. <https://doi.org/10.4257/oeco.2019.2302.09>.

CASTRO, R.G.B.M.; COSTA-NETO, S.F.; MALDONADO JR, A.; GENTILE, R. Ecological aspects of nematode parasites of *Didelphis aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae) in urbansylvatic habitats in Rio De Janeiro, Brazil. **Oecologia australis**, v.21, n.1, p.54-61, 2017. <https://doi.org/10.4257/oeco.2017.2101.06>.

CERQUEIRA, R.; GENTILE, R.; FERNANDEZ, F.A.Z.; D'ANDREA, P.S. A five year population study of an assemblage of small mammals in Southeastern Brazil. **Mammalia**, v. 57, p.506-517, 1993.

CHILTON, N.B.; HUBY-CHILTON, F.; GASSER, R.B. First complete large subunit rRNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: phylogenetic and diagnostic implications. **Molecular and Cellular Probes**, v.17, p.33-39, 2003.

CHITWOOD, B.G. **The status of *Protospirura* vs. *Mastophorus* with a consideration of the species of these genera.** In: SILVA, B. *et al.* Livro jubilar do Professor Lauro Travassos: editado para comemorar o 25º aniversário de suas atividades científicas. Rio de Janeiro: Typographia do Instituto Oswaldo Cruz, p.115-118, 1938.

COSTA, N.A.; SIMÕES, R.O.; VILELA, R.V.; SOUZA, J.G.R.; CARDOSO, S.T.; LEINER, N.O.; GENTILE, R.; MALDONADO JR, A. Morphological and genetic characterization of *Pterygodermatites* (Paucipectines) *zygodontomis* (Nematoda: Rictulariidae) from *Necromys lasiurus* (Rodentia: Sigmodontinae) from Uberlândia, Brazil. **Journal of Helminthology**, v.95, n.5, p.618-629, 2018. <https://doi:10.1017/S0022149X17000736>

D'ANDREA, P.S.; MAROJA, L.S.; GENTILE, R.; CERQUEIRA, R.; MALDONADO JR, A.; REY, L. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea:Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia:Sigmodontinae) in Brazil. **Parasitology**, v.120, p.573-582, 2000.

DIGIANI, M.C; KINSELLA, J.M. (2014) A new genus and species of Heligonellidae (Nematoda: Trichostrongylina) parasitic in *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) from Misiones, Argentina. **Folia Parasitologica**, v.61, n.5, p.473-478, 2014. <http://doi.org/10.14411/fp.2014.043>.

DRABIK, G.O.; VIVAR, E.; JIMÉNEZ, A. New species of *Alippistrongylus* (trichostrongylina: nippostrongylinae) from the elegant rice rat, *Euryoryzomys nitidus*, of La Convención, Peru. **Journal of Parasitology**, v.108, n.5, p.435-440, 2022. <https://doi.org/10.1645/22-10>.

DURETTE-DESSET, M.C.; DIGIANI, M.C. (2012) The caudal bursa in the Heligmonellidae (Nematoda: Trichostrongylina). Characterization and hypothesis on its evolution. **Parasite**, v.19, p.3-18. <http://doi.org/10.1051/parasite/2012191003>.

DURETTE-DESSET, M.C.; DIGIANI, M.C. The axis orientation of the synlophe in the Heligmosomoidea (Nematoda, Trichostrongylina): a new approach. **Parasite**, v.12, p.195-202, 2005. <http://doi.org/10.1051/parasite/2005123195>.

EASTWOOD, G.; CAMP, J.V.; CHU, Y.K.; SAWYER, A.M.; OWEN, R.D.; CAO, X.; TAYLOR, M.K.; VALDIVERSO-TORRES, L.; SAGE, R.D.; YU, A.; GOODIN, D.G.; BRUYN, V.J.M.; MCALLISTER, R.C.; RODRIGUEZ, L.; WILLIAM, E.P.; JONSSON, C.B Habitat, species richness and hantaviruses of sigmodontine rodents within the interior Atlantic Forest, Paraguay. **PLOS ONE**, v.13, n.8, p.1-20, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201307>.

GAILLARD, C.M.; PION, S.D.; HAMOU, H.; SIRIMA, C.; BIZET, C.; LEMARCIS, T.; LOCATELLI, S. Detection of DNA of filariae closely related to *Mansonella perstans* in faecal samples from wild non-human primates from Cameroon and Gabon. **Parasites vectors**, v.13, n.313, p.1-13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04184-1>.

GEDOELST, L. Le faune parasitaire du Congo Belge. **Revue Zoologique Africaine**, v.5, p.1-90, 1916.

GIRAUDOUX P., CRAIG P.S., DELATTRE P., BAO G., BARTHOLOMOT B., HARRAGA S.; QUÉRÉ. J.P.; RAOUL, F.; WANG, Y.; SHI, D.; VUITTON, D.A. Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. **Parasitology**, v.127, p.121-131, 2003.

<http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2008153469>

GOMES, A.P.N.; OLIFIERS, N.; SANTOS, M.M.; SIMÕES, R.O.; MALDONADO, A. New records of three species of nematodes in *Cerdocyon thous* from the Brazilian Pantanal wetlands. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.24, n.3, p.324–330, 2015. <https://doi:10.1590/s1984-29612015061>

GOMES, A.P.N.; MIRANDA, K.; LOPES-TORRES, E.J. Simultaneous recording of the surface and internal structures of helminth parasites by fluorescence stereomicroscopy and light-sheet fluorescence microscopy (LSFM). **Micron**, v.1, p.103802, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2025.103802>.

GONÇALVES, P.R.; OLIVEIRA, J.A.D. An integrative appraisal of the diversification in the Atlantic Forest genus *Delomys* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) with the description of a new species. **Zootaxa**, v.3760, n.1, p.7-38, 2014. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3760.1.1>.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v.59, p.307-321, 2010. <https://doi.org/10.1093/sysbio>.

HAIDER, N.; ROTHMAN-OSTROW, P; OSMAN, A.Y.; ARRUDA, L.B.; MACFARLANE-BERRY, L.; ELTON, L.; THOMASON, M.J.; YEBOAH-MANU, D.; ANSUMANA, R.; KAPATA, N.; MBOERA, L.; RUSHTON, J.; MCHUGH, T.D.; HEYMANN, D.L.; ZUMLA, A.; KOCK, R.A. COVID-19-Zoonosis or Emerging Infectious Disease? **Public Health**, v.8, p.1-8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.596944>.

HAN, B.A.; KRAMER, A.M.; DRAKE, J.M. Global patterns of zoonotic disease in mammals. **Trends Parasitology**, v.32, n.7, p.565-577, 2016.
<https://doi:10.1016/j.pt.2016.04.007>.

HASEGAWA, H.; KOBAYASHI, J.; OTSURU, M. Helminth parasites collected from *Rattus rattus* on Lanyu, Taiwan. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v.61, p.95–102, 1994.

HERRERA, L.; D'ANDREA, P.S.; XAVIER, S.C.C.; MANGLIA, R.H.; FERNANDES, O. & JANSEN, A.M. Tripanosomiasis in wild mammals of the national park Serra da Capivara and its surrounding (Piaui, Brazil), endemic focus of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, n.5, p.379-388, 2005.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO). Parque Nacional Do Itatiaia. (2024). Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia/qm_somos.html#:~:text=Originalmente%20com%2011.943%20hectares%2C%20o,1982%20pelo%20Decreto%20no%2087.586. Acesso em 16 de dezembro de 2024.

JOST, J.; HIRZMANN, J.; ĎUREJE, L.; MAAZ, D.; MARTIN, P.; STACH, T.; HEITLINGER, E.; JARQUÍN-DÍAZ, V.H. Dentition patterns and molecular diversity of *Mastophorus muris* (Gmelin, 790) (Nematoda: Spiruroidea) support a host-associated subdivision. **Parasitology Research**, v.123, n.237, p.2-14. <https://doi.org/10.1007/s00436-024-08259-1>.

JULIUS, R.S.; SCHWAN, E.V.; CHIMIMBA, C.T. Helminth composition and prevalence of indigenous and invasive synanthropic murid rodents in urban areas of Gauteng Province, South Africa. **Journal of Helminthology**, v.91, n.1, p.1-10, 2017.
<https://doi.org/10.1017/S0022149X17000761>

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOD, A. An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v.28, n.12, p.1647-1649, 2012. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

LAFFERTY, K.D. Environmental Parasitology: What can Parasites tell us about Human Impacts on the Environment? **Parasitology Today**, v.13, p.251-255, 1997.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J.E.; GASCUEL, O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. **Molecular Biology and Evolution**, v.34, n.9, p.2422-2424, 2017.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>.

LEMES, D.S.; ANDRADE SILVA, B.E.; MALDONADO, A.; VILELA, R.V.; LUQUE, J.L.; SIMÕES, R.O. New species of the genus *Alippistongylus* (Nematoda: Trichostrongylina)

parasitic in *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Helminthology**, v.98, n.58, p.1-8, 2024. <https://doi.org/10.1017/S0022149X24000464>.

LOPES-TORRES, E.J.; SIMÕES, R.O.; MOTA, E.M.; THIENGO, S.C. Análise da interação hospedeiro-parasita em *Achatina fulica* infectada com *Angiostrongylus cantonensis*. **Pathogens**, v.13, n.1, p.34-42, 2024. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010034>.

MACHADO, A.B.; SIMÕES, R.O.; MALDONADO JR, A.; SANTOS, M.A.J.; LUQUE, J.L. Integrative Taxonomy of *Prosogonotrema bilabiatum* Vigueras, 1940 (Digenea: Sclerodistomidae): A Parasite in Atlantic Spadefish *Chaetodipterus faber* (Broussonet, 1782) (Acanthuriformes: Ephippidae) from Brazil. **Acta Parasitologica**, v.69, n.1, p.898-909, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11686-024-00825-y>.

MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. (2021) Mesquite: a Modular System for Evolutionary Analysis. Version 3.70. Disponível em: <http://www.mesquiteproject.org> (acessado em dezembro de 2024)

MALDONADO, A.; VIEIRA, G.O.; LANFREDI, R.M. *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes:Digenea) by light and scanning electron microscopy. **Journal of Parasitology**, v.89, n.4, p.800-808, 2003.

MALDONADO, A.; GENTILE, R.; FERNANDES-MORAES, C.C.; D'ANDREA, P.S.; LANFREDI, R.M.; REY, L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v.80, n.4, p.369-375, 2006.

MALDONADO, A.; SIMÕES, R.O.; LUIZ, J.S.; COSTA-NETO, S.F.; VILELA, R.V. A new species of *Physaloptera* (Nematoda: Spirurida) from *Proechimys gardneri* (Rodentia: Echimyidae) from the Amazon rainforest and molecular phylogenetic analyses of the genus. **Journal of Helminthology**, v.94, n.68, p.1–11, 2020. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000610>.

MARCOGLIESE, D.J. Parasites: small players with crucial roles in the ecological theatre. **Ecohealth**, v.1, p.151-164, 2004.

MARQUES, M.C.M., GRILLES, C.E.V. **The Atlantic Forest: History, Biodiversity, Threats and Opportunities of the Mega-diverse Forest**. 1 ed. Springer International Publishing, 2021.

MARTINELLI, G. Mountain biodiversity in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, p.587–597, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042007000400005>.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, p.1-8, 2010. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). Mata Atlântica. (2025) Disponível em: https://antigo.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento.html

MIQUEL, J.; MARTÍN-CARRILLO, N.; RIBAS, A.; SÁNCHEZ-VICENTE, S.; FELIU, C.; FORONDA, P. Morphologic and Genetic Characterization of *Protospirura Canariensis* N. Sp. (Nematoda, Spiruridae), a Parasite of the Black Rat *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae) from El Hierro Island (Canary Archipelago, Spain). **Animals**, v.13, n.11, p. 1806, 2023.

<https://doi.org/10.3390/ani13111806>

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.

<https://doi.org/10.1038/35002501>.

NIELSEN, N.O. **Ecosystem health: application of the concept and wildlife as indicators**. 1 ed. Michigan: Conference of the American Association of Zoo Veterinarians, Wildlife Disease Association and American Association of Wildlife Veterinarians, 1995.

ORDAZ, F.J.; ESPINOZA, S.M.A. Especie nueva del género *Protospirura* (Nemata: Spiruridae) de *Peromyscus difficilis* (Rodentia: Cricetidae) de Hidalgo, México. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México**, v.66, p.17-26, 1995.

OROZCO, M.M.; PICCINALI, R.; MORA, M.S.; ENRIQUEZ, G.F.; CARDINAL, M.V.; GÜRTLER, R. The role of sigmodontinae rodents as sylvatic host of *Trypanosoma cruzi* in the Argentinean Chaco. **Infection, Genetics and Evolution**, v.22, p.12-22.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.020>.

PATTON, J.L.; PARDINAS, U.; D'ELÍA, G. **Mammal of South America**. Vol. 2 Rodents. 1st edition. The University of Chicago Press.

PERIN, P.P.; LAPERA, I.M.; ARIAS-PACHECO, C.A.; MENDONÇA, T.O.; OLIVEIRA, W.J.; POLLO, A.S.; SILVA, C.S.; TEBALDI, J.H.; SILVA, B.; LUX-HOPPE, E.G. Epidemiology and Integrative Taxonomy of Helminths of Invasive Wild Boars, Brazil. **Pathogens**, v.12, n.2, p.175, 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020175>.

PINOTTI, B.T.; NAXARA, L.; PARDINI, R. Diet and food selection by small mammals in an old growth Atlantic Forest of south-eastern Brazil. **Studies on neotropical fauna and environment**, v.46, n.1, p.1-9, 2011.

PROSSER, S.; MARTÍNEZ-ARCE, A.; ELÍAS-GUTIÉRREZ, M. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. **Molecular Ecology Resources**, v.13, n.6, p.1151-1155. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12132>.

QUENTIN, J.C.; KARIMI, Y.; RODRÍGUEZ DE ALMEIDA, C. *Protospirura numidica criceticola*, n. subsp. parasite de Rongeurs Cricetidae du Brésil. Cycle évolutif. **Annals of Parasitology**, n.43, p.583–596, 1968.

RAFAEL, J.A. Redescrição de duas espécies neotropicais de Empididae (Diptera) descritas por Curan e revalidação do gênero *Porphyrochroa*. **Iheringia. Série Zoologia**, v.90, p.127-132, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212001000100012>.

RBMA (2023) *Reserva Da Biosfera Da Mata Atlântica*. Disponível em: <https://rbma.org.br/n/>.

RIBAS, A.; VECIANA, M.; CHAISIRI, K.; MORAND, S. *Protospirura siamensis* n. sp. (Nematoda: Spiruridae) from rodents in Thailand. **Systematic Parasitology**, v.82, p.21-27, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11230-012-9343-1>.

ROQUE, A.L.R.; LEGEY, A.P.; VICTORIANO, M.; D'ANDREA, P.S. & JANSEN, A.M. *Tripanossoma cruzi* e *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae): a parasitologia como ferramenta no estudo da medicina ambiental. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, n. 4, 2002.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MRBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. **Systematic Biology**, v.61, p.539-542, 2012. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.

RUIZ-PIÑA, H.A.; CRUZ-REYES, A. The *Opossum Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.5, p.613-62, 2002.

SALVO, M.N.; HERCOLINO, C.; ARÍSTEGUI, E.; BRUNO, A.; BRAMBATI, D.F.; CICUTTIN, G.L. (2020) *Bartonella* spp. associated with rodents in an urban protected area, Buenos Aires (Argentina). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, n.72, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101515>.

SCHLICK-STEINER, B.C.; STEINER, F.M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R.H. Integrative taxonomy: A multisource approach to exploring biodiversity. **Annual Review of Entomology**, v.55, p.421-438, 2010.

SEURAT, L. G. Sur un nouveau spiroptère du Chat ganté. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie**, n.77, p.344–347, 1914.

SIMÕES, R.; GENTILE, R.; RADEMAKER, V.; D'ANDREA, P.; HERRERA, H.; FREITAS, T.; LANFREDI, R. Variation in the helminth community structure of *Thrichomys pachyurus* (Rodentia: Echimyidae) in two sub-regions of the Brazilian Pantanal: the effects of land use and seasonality. **Journal of Helminthology**, v.84, p. 266-275, 2010. <https://doi:10.1017/S0022149X09990629>.

SIMÕES, R.O.; MALDONADO, A.; OLIFIERS, N.; GARCIA, J.S.; BERTOLINO, A.V. & LUQUE, J.L. A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban population of *Rattus norvegicus* in Brazil: the influences of seasonality and host features on the pattern of infection. **Parasites and Vectors**, v.7, p.100, 2014. <https://doi:10.1186/1756-3305-7-100>.

SIMÕES, R.O.; GARCIA, J.S.; COSTA-NETO, S.F.; SANTOS, M.M.; FARO, M.J.; MALDONADO-JUNIOR, A. Survey of helminths in small mammals along the aqueduct of the São Francisco River in the Caatinga biome. **Oecologia Australis**, v.21, n.1, p.88-92, 2017. <https://doi.org/10.4257/oeco.2017.2101.10>.

SMALES, L.R. *Protospirura kaindiensis* n. sp. (Spirura: Spiruridae) and other helminths from *Pseudohydromys* (Muridae: Hydromyinae) from Papua New Guinea. **Journal of Parasitology**, v.87, p.169-172, 2001.

SMALES, L.R.; HARRIS, P.D.; BEHNKE, J.M. A redescription of *Protospirura muricola* Gedoelst, 1916 (Nematoda: Spiruridae), a parasite of murid rodents. **Systematic Parasitology**, v.72, p.15-26, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11230-008-9147-5>.

SMALES, L.R. The gastrointestinal nematodes of *Chiruromys forbsei* Thomas and *C. lamia* (Thomas) (Rodentia: Muridae) with the description of a new species of *Helgenema* (Heligmonellidae) and a new species of *Protospirura* (Spiruridae) from Papua New Guinea. **Transactions of the Royal Society of South Australia**, v.145, p.60-76, 2021. <https://doi.org/10.1080/03721426.2021.1931652>.

SUÁREZ, O.V.; CUETO, G.R.; CAVIA R.; GÓMEZ-VILLAFAÑE, I.E.; BILENCA, D.N.; EDELSTEIN, A. *et al.* Prevalence of infection with Hantavirus in rodent populations of Central Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, p.727-732, 2003.

SUTTON, C. A. Contribution to the knowledge of Argentina's parasitological fauna XVII. Spirurida (Nematoda) from Neotropical Cricetidae: *Physaloptera calnuensis* n. sp. and *Protospirura numidica criceticola* Quentin, Karimi and Rodriguez de Almeida. **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v.11, n.1, p.61-67, 1989. <https://doi.org/10.5962/p.292188>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v.38, n.7, p.3022-3027, 2021. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

TOKESHI, M. **Species coexistence: Ecological and evolutionary perspectives**. Oxford: Blackwell Science, 1999.

TRAVASSOS, L.; TEIXEIRA, J.F.; KOHN, A. **Trematódeos do Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1969.

VICENTE, J.J.; RODRIGUES, H.O.; GOMES, D.C.; PINTO, R.M. Nematóides do Brasil. Parte V: Nematóides de mamíferos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.14, n.1, p.452, 1997.

VIEIRA, A.S.; DI AZEVEDO, M.I.N.; D'ANDREA, P.S.; VILELA, R.V. Neotropical wild rodents *Akodon* and *Oligoryzomys* (Cricetidae: Sigmodontinae) as important carriers of pathogenic renal *Leptospira* in the Atlantic Forest, in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.124, p.280-283, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.04.001>.

WOOLHOUSE, M.E.J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.12, p.1842-1847, 2005.

YOKOHATA, Y.; ABE, H. Two new Spirurid Nematodes in Japanese Moles, *Mogera* spp. **Japanese Journal of Parasitology**, v.38, p.92-99, 1989.

6. ANEXO

Journal of Helminthology

www.cambridge.org/jhl

Review Article

Cite this article: Sá Lemes D, de Andrade Silva BE, Maldonado A Jr., Vilela RV, Luque JL and de Oliveira Simões R (2024). New species of the genus *Alippistrongylus* (Nematoda: Trichostrongylina) parasitic in *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Helminthology*, **98**, e58, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0022149X24000464>.

Received: 07 April 2024

Revised: 24 May 2024

Accepted: 10 June 2024

Keywords:

Integrative taxonomy; nematode; Parque Nacional do Itatiaia; rodent

Corresponding author:

D. Sá Lemes;

Email: deboralemes.dl@gmail.com

New species of the genus *Alippistrongylus* (Nematoda: Trichostrongylina) parasitic in *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil

D. Sá Lemes¹ , B.E. de Andrade Silva² , A. Maldonado Jr.³ , R.V. Vilela³ , J.L. Luque⁴  and R. de Oliveira Simões⁴ 

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil; ²Laboratório de Helmintologia Romero Lascasas Porto, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ³Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil and ⁴Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

Abstract

We describe a new species of the genus *Alippistrongylus* (Nematoda: Trichostrongylina) in the small intestine of *Delomys dorsalis* (Rodentia: Sigmodontinae) found in Itatiaia National Park (Parque Nacional do Itatiaia, PNI), state of Rio de Janeiro, Brazil. The new species can be distinguished between the other two species previously described by the following morphological characteristics: pattern of the rays from the caudal bursa rays in males and the spherical-shaped appendage in the female. Additionally, we provide molecular genetic data from the new species. The discovery of *Alippistrongylus itatiaiaensis* sp. n. expands our understanding of nematode diversity and underscores the importance of parasite studies in biodiversity conservation. Its occurrence in a preserved area like the PNI emphasises the role of such habitats in maintaining unique ecological interactions.

Introduction

The Atlantic Forest is the second largest tropical forest in South America, boasting one of the areas with the greatest biodiversity on the planet in the Brazilian, Argentine, and Paraguayan territories (Marques *et al.* 2021). It is a region where the richest and most threatened plant and animal species on the planet are found (Myers *et al.* 2000), due to deforestation driven by various human activities (MMM 2023).

The Itatiaia National Park (PNI) covers regions of the state of Rio de Janeiro and Minas Gerais, whose main objective is the conservation of the endemic fauna and flora of the Atlantic Forest biome. The park is recognised by UNESCO and located in areas of high priority for biodiversity conservation (ICMBio 2023).

The Atlantic Forest harbors over 270 mammal species (MMA 2023), including 40 species of rodents belonging to the subfamily Sigmodontinae (Bonvicino *et al.* 2008). Sigmodontine rodents are relevant to public health, serving as potential reservoirs for hantaviruses, *Bartonella* spp., *Leptospira* spp., *Trypanosoma cruzi*, and *Schistosoma mansoni* (Maldonado Jr. *et al.* 2006; Orozco *et al.* 2014; Vieira *et al.* 2019; Salvo *et al.* 2020; Bellomo *et al.* 2021).

Among these rodents, *Delomys dorsalis* (Hensel, 1873) is a sigmodontine species with terrestrial habits endemic to the Atlantic Forest (Bonvicino *et al.* 2008). This species thrives at altitudes that can reach up to 2,000 m (Gonçalves and Oliveira 2014) and feeds mainly on plant matter and soil arthropods (Pinotti *et al.* 2011). *Delomys dorsalis* remains relatively understudied in terms of its helminth fauna, with only two helminths reported (Cardoso *et al.* 2018).

This study is part of a broader biodiversity research project investigating various taxa within the Atlantic Forest. Utilising a multidisciplinary approach encompassing taxonomic, evolutionary, ecological, and parasitological perspectives, our primary aim was to describe a new species of nematode parasitising the small intestine of *Delomys dorsalis* found in the PNI using integrative taxonomy.

© The Author(s), 2024. Published by Cambridge University Press.

 **CAMBRIDGE**
UNIVERSITY PRESS

Material and methods

The research was conducted within the confines of Itatiaia National Park (PNI), in the municipality of Itatiaia, state of Rio de Janeiro, Brazil. The PNI encompasses an area of 28,086 hectares (ha) with altitudes ranging from 600 to 2,791 m (ICMBio 2023). The climate within the park is