

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Primasubulura jacchi* (Marcel, 1857), Inglis 1958, PARASITO DE SAGUIS HÍBRIDOS (*Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus*)**

**JEANNE CAMPOS DE SOUSA GOMES DE CASTRO**

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF

Campos dos Goytacazes

Julho de 2024

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Primasubulura jacchi* (Marcel, 1857), Inglis 1958, PARASITO DE SAGUIS HÍBRIDOS (*Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus*)**

**JEANNE CAMPOS DE SOUSA GOMES DE CASTRO**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos  
Coorientador: Prof. Dr. Glauber Monteiro Dias

Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro  
Julho de 2024

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C355 Castro, Jeanne Campos de Sousa Gomes de.

ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Primasubulura jacchi* (Marcel, 1857), Inglis 1958, PARASITO DE SAGUIS HÍBRIDOS (*Callithrix penicillata* X *Callithrix jacchus*) / Jeanne Campos de Sousa Gomes de Castro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

53 f. : il.

Bibliografia: 47 - 53.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Clovis de Paula Santos.

Coorientador: Glauber Monteiro Dias.

1. *Callithrix penicillata*. 2. *Callithrix jacchus*. 3. helmintos. 4. ultraestrutura. 5. biologia molecular. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Primasubulura jacchi* (Marcel, 1857), Inglis 1958, PARASITO DE SAGUIS HÍBRIDOS (*Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus*)**

**JEANNE CAMPOS DE SOUSA GOMES DE CASTRO**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 8 de julho de 2024.

Banca examinadora:

---

Aleksandra Menezes de Oliveira (Doutora em Ciências) – UFRJ

---

Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto (Doutor em Ciências) – FIOCRUZ

---

Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências Biológicas) – UENF

---

Glauber M. Dias (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF (Coorientador)

---

Clóvis de Paula Santos - (Doutor em Parasitologia Veterinária) – UENF (Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir, me sustentar e não me deixar desistir em nenhum momento dessa jornada desafiadora.

Meu profundo agradecimento vai também ao meu marido, Jefferson Vianna Gomes de Castro Júnior, por todo apoio, força e, principalmente, pelo suporte com nosso bebê durante esse processo de mestrado, que foi essencial para que eu pudesse concluir esta etapa.

Expresso minha total gratidão à maior surpresa deste ciclo, meu filho Noah, que, sem dúvida, me motiva todos os dias a ser uma pessoa e profissional melhor.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Clóvis de Paula Santos, pela oportunidade que me foi dada, por abrir as portas do seu laboratório para mim, por sua orientação impecável e por trazer palavras de calma sempre que precisei. Sua presença fez toda a diferença.

Gostaria de expressar meus agradecimentos à Dra. Bianca Cardozo Afonso pelo material para análise e por todo o respeito, paciência e carinho que teve comigo.

Minha gratidão ao meu coorientador, Dr. Glauber Monteiro Dias, pela confiança, por me apresentar sua linha de pesquisa e orientar nas análises moleculares das espécies estudadas.

Agradeço ao aluno de mestrado Júlio César Júnior, do laboratório de Biologia Molecular pelos ensinamentos e companheirismo.

Estendo meus agradecimentos à Técnica do PAM, Beatriz Ferreira Ribeiro pelo acolhimento, paciência e ensinamentos. Pessoas como você tornam nossa trajetória mais leve.

Meus agradecimentos também ao Dr. Pedro Souto Rodrigues pelo apoio na técnica de Microscopia Eletrônica.

Minha total gratidão à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade recebida.

À CAPES, expresso minha gratidão pela bolsa de mestrado e pela oportunidade de fazer pesquisa em prol da ciência.

Por fim, agradeço a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a minha trajetória no mestrado.

## RESUMO

O conhecimento sobre a helmintofauna em saguis (*Callithrix penicillata* X *Callithrix jacchus*) introduzidos e que coabitam a área de ocorrência do ameaçado mico-leão-dourado é escasso. Este trabalho teve como objetivo analisar por biologia molecular e microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV) os espécimes de *Primasubulura jacchi* achados em *C. penicillata* x *C. jacchus* oriundos de fragmentos florestais no entorno da Reserva Biológica de Poço das Antas. Para isso, os espécimes de helmintos foram analisados através de microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV), e as regiões ITS1 e 2 (Internal Transcribed Spacer) dos genes do RNA ribossomal foram amplificadas, sequenciadas e analisadas por homologia (BLAST). A análise morfométrica por óptica confirmou características compatíveis com a espécie e varredura trouxe detalhes tais como: superfície cuticular contendo estriações no sentido transversal a intervalos regulares (1-2,5 µm), intercaladas por cristas longitudinais curtas, boca hexagonal contendo 06 papilas próximas. Machos apresentaram onze pares de papilas genitais circulares com estriações duplas na extremidade proximal e uma na extremidade distal possuindo ao centro uma conformação arredondada, sendo distribuídas na pré-cloaca (03), junto à cloaca (02) e pós-cloaca (06). O apêndice caudal variou de 35- 80 µm, possuindo extremidade distal afilada e pontiaguda. Os espículos levemente desiguais, continham cristas longitudinais que terminam próximo a extremidade distal afilada com ápice arredondado. As PCRs de *P. jacchi* e *Haemonchus contortus* (nematóide referência) amplificaram um fragmento de ~1000pb e ~850pb, respectivamente, os quais foram sequenciados. O BLAST da sequência do *H. contortus* confirmou a espécie com 99,5% de identidade. O sequenciamento do *P. jacchi* gerou duas sequências parciais de 450pb e 228pb que não se sobrepuseram. O BLAST do fragmento de 450pb foi correspondente com a superfamília subuluroidea. Este é o primeiro descritivo por MEV de *P. jacchi* da mesma forma, não há sequência referência para este nematóide no banco do NCBI usando a região ITS. Assim, contribui-se para o conhecimento da helmintofauna de saguis.

*Palavras-chave:* *Callithrix penicillata*, *Callithrix jacchus*, helmintos, ultraestrutura, biologia molecular.

## ABSTRACT

Knowledge about the helminth fauna in introduced marmosets (*Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus*) that cohabit the area where the endangered golden lion tamarin occurs is scarce. This work aimed to analyze by molecular biology and optical and scanning electron microscopy (SEM) the specimens of *Primasubulura jacchi* found in *C. penicillata* x *C. jacchus* from forest fragments surrounding the Poço das Antas Biological Reserve. Thus, the helminth specimens were analyzed by optical and scanning electron microscopy (SEM), and the ITS1 and 2 (Internal Transcribed Spacer) regions of the ribosomal RNA genes were amplified, sequenced, and analyzed by homology (BLAST). The optical morphometric analysis confirmed characteristics compatible with the species, and scanning brought details such as a cuticular surface containing striations in the transverse direction at regular intervals (1-2.5  $\mu\text{m}$ ), interspersed by short longitudinal ridges, hexagonal mouth containing 6 nearby papillae. Males presented eleven pairs of circular genital papillae with double striations at the proximal end and one at the distal end with a rounded shape in the center, distributed in the pre-cloaca (03), next to the cloaca (02) and post-cloaca (06). The caudal appendage ranged from 35-80  $\mu\text{m}$ , with a tapered and pointed distal end. The slightly unequal spicules contained longitudinal ridges near the tapered distal end with a rounded tip. The PCRs for *P. jacchi* and *Haemonchus contortus* (reference nematode) amplified a fragment of ~1000bp and ~850bp, respectively, which were sequenced. BLAST of the *H. contortus* sequence confirmed the species with 99.5% identity. Sequencing of *P. jacchi* generated two partial sequences of 450bp and 228bp that did not overlap. BLAST of the 450bp fragment corresponded to the subuluroidea superfamily. This is the first SEM study of *P. jacchi*. Likewise, there is no reference sequence for this nematode in the NCBI database using the ITS region. Thus, it contributes to the knowledge of marmoset helminth fauna.

Keywords: *Callithrix penicillata*, *Callithrix jacchus*, helminths, ultrastructure, molecular biology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação das espécies em 2011 .....	13
Figura 2 - <i>Callithrix penicillata</i> Fonte: Ruiz, et al., 2011.....	14
Figura 3 - <i>Callithrix jacchus</i> Fonte: Ruiz, et al., 2011 .....	15
Figura 4 - <i>Callithrix</i> spp. (híbridos) Fonte: Ruiz, et al., 2011.....	16
Figura 5 - Ciclo de <i>P. jacchi</i> .....	20
Figura 6 - Fluxograma das principais etapas de processamento da amostra para observação de amostra em Microscopia eletrônica de varredura. Fonte: autoria própria. ....	24
Figura 7 - Fluxograma das principais etapas de processamento da amostra para análise molecular Fonte: autoria própria .....	28
Figura 8 - Micrografia de microscopia ótica de contraste interferencial da região anterior de um macho de <i>P. jacchi</i> . ....	30
Figura 9 - Região posterior de macho de <i>P. jacchi</i> com espículos retraídos.....	31
Figura 10 - Micrografia de microscopia ótica de contraste interferencial de uma fêmea de <i>P. jacchi</i> .....	32
Figura 11 - Micrografia de microscopia ótica de contraste interferencial de fêmea de <i>P. jacchi</i> .....	33
Figura 12 - Micrografias de MEV de <i>P. jacchi</i> . ....	36
Figura 13 - Micrografias de MEV de <i>P. jacchi</i> . ....	37
Figura 14 - Micrografias de MEV de <i>P. jacchi</i> . ....	38
Figura 15 - PCR ITS1 e ITS2 (NC5-NC2).....	40
Figura 16 - Sequência de fragmento de 450 pb da região ITS1/2 do pool de <i>P. jacchi</i> . ....	40
Figura 17 - Sequência de fragmento de 228 pb da região ITS1/2 do pool de <i>P. jacchi</i> . ....	41
Figura 18 - Alinhamento da sequência de 450 pb com as sequências referências (RefSeq) da região ITS1/2 dos organismos com maior identidade no BLAST:.....	41
Figura 19 - Alinhamento da sequência de 450 pb de <i>P. jacchi</i> com a região ITS1-5.8S-ITS2 de <i>Caenorhabditis elegans</i> . ....	41
Figura 20 - Alinhamento da região do rDNA 26S das espécies <i>P. jacchi</i> x <i>Subulura chinensis</i> , mostrando 75,6% de identidade entre as espécies. ....	42
Figura 21- DNA extraído pelos três métodos.....	43



## LISTA DE TABELA

Tabela 1- Caracteres morfométricos de machos e fêmeas de <i>P. jacchi</i> (Marcel, 1857) Railet & Henry, 1913 do estudo atual comparado a dados da literatura com distribuição de média, desvio padrão e valores máximos e mínimos observados da amostra analisada. Medidas em milímetros. ....	34
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1 Gênero <i>Callithrix</i> .....	12
2.2. <i>Callithrix penicillata</i> .....	14
2.3. <i>Callithrix jacchus</i> .....	15
2.4. <i>Callithrix</i> spp.....	16
2.5 Helmitos .....	16
2.6 Nematoides .....	18
2.7 Gênero <i>Primasubulura</i> .....	19
2.8 RNA Ribossomal ITS (Espaçadores Internos Transcritos) .....	20
3. OBJETIVOS .....	22
3.1 Objetivos específicos .....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 <i>Obtenção dos helmintos</i> .....	22
4.2 <i>Microscopia Óptica</i> .....	22
4.3 <i>Microscopia eletrônica de Varredura</i> .....	23
4.4 Extração de DNA genômico.....	24
4.5 Amplificação por PCR.....	26
4.6 Sequenciamento direto de DNA.....	28
6. RESULTADOS .....	29
6.1 Microscopia óptica .....	29
6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	35
7. DISCUSSÃO .....	44
8. CONCLUSÃO.....	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

Existem seis espécies de primatas nativos na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro (Bugio Ruivo - *Alouatta guariba clamitans*; Sauá - *Callicebus nigrifrons*; macaco-prego - *Sapajus nigritus*; mico-leão-dourado - *Leontopithecus rosalia*; sagui-caveirinha - *Callithrix aurita*; e o miquiqui-do-sul (*Brachyteles arachnoides*) e duas espécies introduzidas de saguis (*Callithrix penicillata* e *Callithrix jacchus*). Quatro das espécies nativas (*L. rosalia*, *C. aurita*, *C. nigrifrons* e *B. arachnoides*) estão ameaçadas de extinção devido à perda de habitat e fragmentação de áreas de mata. Recentemente, todas essas espécies, exceto o macaco-prego, sofreram grandes perdas populacionais causadas por uma epidemia de febre amarela (DIETZ ET AL., 2019; BERTHET ET AL., 2021). Esses três fatores de declínio populacional resultaram em pequenas populações de cinco das seis espécies, deixando-as altamente vulneráveis a processos de extinção estocásticos, catástrofes como incêndios e epidemias e os efeitos de espécies exóticas introduzidas causando problemas como doenças, competição e predação (BALLOU et al., 1995; DOBSON, 1988; FRITTS e RODDA, 1998; WOODROFFE e GINSENG, 1988). As espécies invasoras estão entre as cinco principais causas do declínio da biodiversidade no mundo, e prevê-se que assim permaneçam mesmo além de 2050 (CDB, 2020).

Populações de saguis-de-tufo branco (*C. jacchus*) e saguis-de-tufo preto (*C. penicillata*) introduzidos, e seus híbridos férteis estão presentes em toda a Mata Atlântica do Brasil como consequência do comércio ilegal de animais selvagens (MALUKIEWICZ, 2018; MALUKIEWICZ et al., 2015; MALUKIEWICZ et al., 2013; RUIZ MIRANDA et al., 2011; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2018). O comércio ilegal destes animais acontece, pois eles são animais adaptáveis a ambientes e pessoas, possuem uma aparência exuberante, porém, quando chegam a fase de reprodutora e devido a consequência do manejo inadequado podem apresentar reações agressivas levando os tutores a os abandonarem em locais distantes, essa atitude pode levar, inclusive o animal a morte, pois após morar tanto tempo em residências, pois eles não têm a capacidade de adaptação ao habitat natural (PEREIRA et al., 2020).

Populações de espécies invasoras têm mostrado sucesso ecológico e representam uma ameaça para várias espécies de calitriquídeos, isso porque o seu nicho ecológico e biologia semelhantes promovem a competição por recursos e

também facilitam a transmissão de doenças entre as espécies (NUNN et al., 2006; RYLANDS e FARIA, 1993). Essas espécies foram introduzidas na área de ocorrência do mico-leão-dourado (*L. rosalia*) há mais de três décadas (RUIZ-MIRANDA et al., 2000) onde estabeleceram uma série de populações de híbridos cujo número pode ser igual ou superior àqueles das espécies nativas ameaçadas de extinção (de MORAIS JÚNIOR et al., 2008; de MORAIS JÚNIOR 2010; MALUKIEWICZ et al. 2015; MALUKIEWICZ et al., 2013). As duas espécies interagem com frequência, principalmente durante a estação seca, quando os frutos são escassos; isso ocasiona prejuízos que trazem malefícios às espécies que estão em extinção (RUIZ MIRANDA et al., 2006). Estudos anteriores sugerem que os saguis podem transportar agentes etiológicos inexistentes nos micos-leões-dourados (MONTEIRO et al., 2007; SALES 2015; SALES et al., 2010; SOUZA et al., 2004).

Os helmintos são o grupo mais diverso de parasitas metazoários de vertebrados e são reconhecidos como um importante componente da biodiversidade global (POULIN e MORAND, 2004). A infecção por endoparasitos parece ser um fenômeno comum em primatas não humanos (DINIZ, 1997). Esses organismos representam 89% da fauna parasitária de primatas neotropicais, dos quais a maioria são helmintos, principalmente nematoides, que correspondem a 42% dos registros na literatura (SOLÓRZANO-GARCÍA e PÉREZ-PONCE DE LEÓN 2018). Embora a maioria dos indivíduos abrigue uma comunidade diversificada de parasitas, endoparasitas em populações selvagens podem ter efeitos negativos importantes na distribuição e densidade de algumas espécies (STONER, 1996).

De acordo com o trabalho realizado, é possível sugerir que parasitos intestinais podem estar diretamente ligados ao manejo inadequado desses animais, de acordo com o ambiente em que vivem, com influência antrópica ou natural, e com a interação cotidiana com outras espécies, podendo ter seus hábitos alimentares influenciados pela área que habitam, e com isso, ocasionar a transmissão de novos patógenos, como parasitos, para outras espécies. Sendo assim, é necessário que estudos sejam realizados para preservação das espécies, principalmente quando tratamos de espécies ameaçadas de extinção (CATENACCI et al., 2022)

Estudos parasitológicos detalhados ainda são poucos e distantes entre si e necessitam de maior investigação para ampliação do conhecimento sobre o tema em questão (MARTINS et al., 2008) e muitas questões permanecem sem resposta, como os aspectos ecológicos e evolutivos que cercam a relação parasita-hospedeiro e os

efeitos dessa forma de vida na conservação de primatas e na saúde pública humana (SOLÓRZANO-GARCÍA e PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2018). Ademais, poucos também são os estudos relativos aos aspectos da ultraestrutura e genética dos helmintos parasitando primatas não humanos. Neste sentido, é crucial desenvolver métodos que aumentem a precisão do diagnóstico do parasita ao usar amostras não invasivas. A incorporação de técnicas moleculares em procedimentos de rotina deve ser uma prioridade nos estudos parasitológicos de primatas neotropicais.

Técnicas moleculares desenvolvidas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como o sequenciamento de DNA, têm sido úteis na identificação de diversos organismos, inclusive os nematoides. Entre os marcadores moleculares utilizados para este propósito destaca-se o sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer), que separa os genes 18S e 28S do DNA ribossomal (rDNA) e que pode ser amplificada com primers específicos ancorados nessas duas regiões (CHILTON et al. 2001, ANDRADE et al. 2013, 2018)

Das 18 espécies descritas de helmintos encontrados em *C. jacchus* (SOLÓRZANO-GARCÍA e PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2018), as consequências desse parasitismo para a saúde são conhecidas apenas para algumas espécies (XIMENES, 1997). Por exemplo, *Filariopsis barretoi* é um parasito que produz nódulos no parênquima pulmonar, pequenas lesões foram descritas e aparentemente não muito patogênicas, a menos que uma grande área seja afetada (REGO e SCHEFFER, 1988). Além disso, nematoides podem causar infecções assintomáticas no hospedeiro, mas também pode causar sérios problemas como hemorragias pulmonares e enterite ulcerativa severa o que se torna um problema de saúde para essas espécies (FALCÃO et al., 2018). Por sua vez, *C. penicillata* apresenta um parasitismo natural elevado e heterogêneo. Nessas infecções espontâneas, muitos protozoários e helmintos podem ser encontrados (RESENDE et al., 1994). Em comparação com *C. penicillata*, *C. jacchus* apresenta menor infestação de helmintos (SOLÓRZANO-GARCÍA e PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2018).

Em uma avaliação inicial do perfil parasitológico das populações de saguis introduzidos na área de ocorrência do mico-leão-dourado, um levantamento coprológico evidenciou a presença de helmintos pertencentes ao filo Nematoda e Acanthocephala (SALES et al., 2010). Este estudo também encontrou uma maior ocorrência de nematoides em calitriquídeos machos do que em fêmeas. Acanthocephala foi encontrado em todas as faixas etárias, tanto em machos quanto

em fêmeas, incluindo fêmeas grávidas. *Primasubulura jacchi* foi encontrado com mais frequência em fêmeas adultas do que em machos adultos (SALES et al., 2010). Posteriormente, em estudo com achados de necropsia, duas espécies de nematoides (*P. jacchi* e *Trypanoxyurus sceleratus*) e um acantocéfalo (*Prosthenorchis elegans*) foram observados. As prevalências observadas foram 73% (*P. jacchi*), 15,4% (*P. elegans*) e 11,6% (*T. sceleratus*). As respectivas abundâncias médias para cada espécie foram 17,3; 10,1 e 0,5 e a intensidade média foi 23,6; 3,2 e 87,7, respectivamente. Dez saguis machos e nove fêmeas estavam parasitados por pelo menos um tipo de helminto, e os saguis fêmeas abrigavam um número maior de parasitas (COSTA, et al., 2022).

A continuidade nas análises dos achados de helmintos oriundos de necropsia de saguis (*C. penicillata* x *C. jacchus*) nos fragmentos de mata atlântica localizados dentro da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado traz uma importante contribuição para a helmintofauna dos hospedeiros supracitados. A análise proposta aqui trará contribuições especificamente a aspectos da morfologia e genética molecular de *Primasubulura jacchi*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Callithrix*

Os primatas do gênero *Callithrix*, *Cebuella*, *Callibella*, *Mico*, *Saguinus*, *Leontopithecus* e *Callimico* pertencem à família Callitrichidae (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009) e são conhecidos popularmente como saguis. Estes animais possuem ornamentos de cabeça como tufos, cristas, jубas e bigodes, em várias espécies e presença de garras nas patas anteriores e posteriores que são marcantes ao grupo (VERONA; PISSINATI, 2006). As garras auxiliam o escalar dos troncos das árvores e o forrageamento em busca de insetos e pequenos vertebrados. Saguis possuem cauda longa, não preênsil, e, por vezes, maiores que o comprimento do corpo e também são um grupo conhecido por conter as menores espécies de primatas com pesos variando de 100g (*Cebuella pigmea*) a  $\pm$  600g (gênero *Leontopithecus*) (VERONA; PISSINATI, 2006).

O gênero *Callithrix* é composto de seis espécies: *Callithrix jacchus*, *Callithrix penicillata*, *Callithrix geoffroyi*, *Callithrix aurita*, *Callithrix kuhlii* e *Callithrix flaviceps*

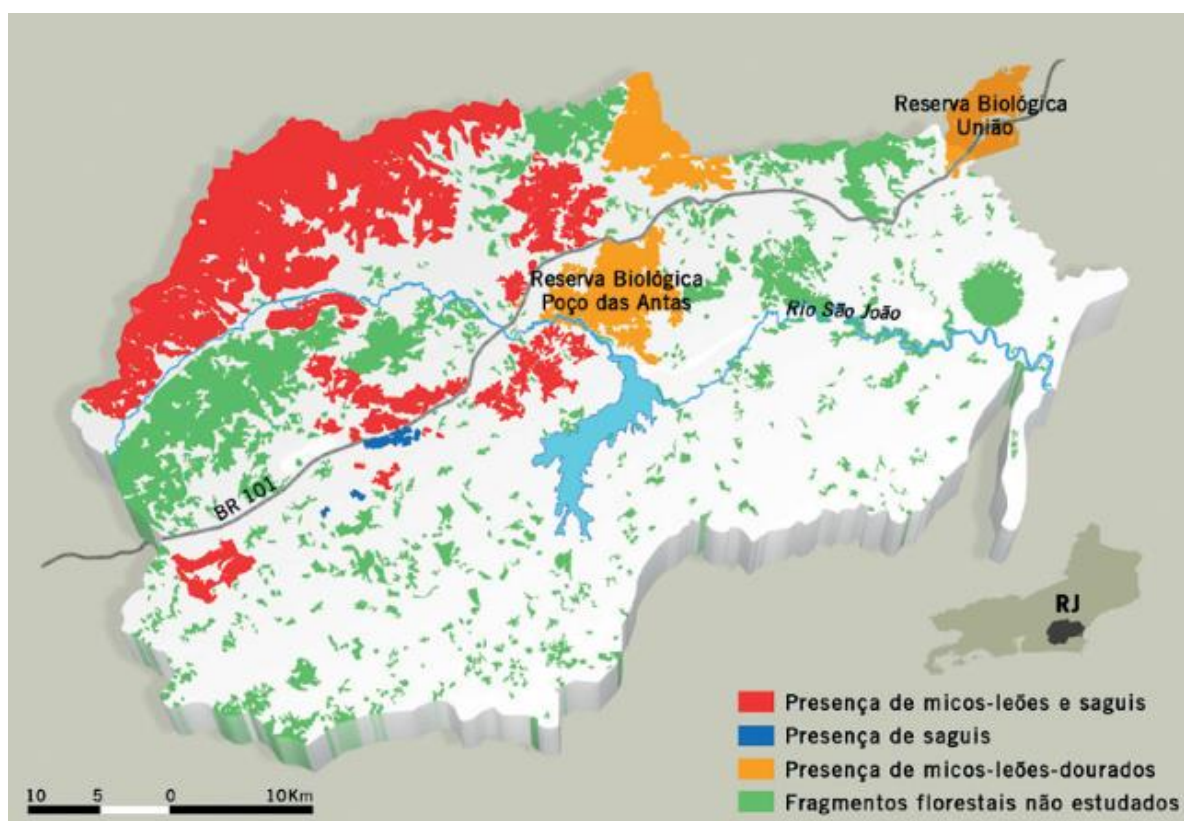
(RYLANDS et al., 2009). São primatas arbóreos e de pequeno porte (230-400 g) com espécies endêmicas do Brasil (PAGLIA et al., 2012).

*Callithrix penicillata* (típico do Cerrado brasileiro) e *C. jacchus* (típico do nordeste brasileiro) são consideradas espécies invasoras por terem sido introduzidas em diversos locais do país e tem sido um problema quer seja pela hibridização ou ocupação do habitat de espécies nativas (COIMBRA-FILHO et al., 1993) pois, representam uma ameaça a conservação destas espécies.

A introdução destas espécies é passível de compreensão, já que primatas de um do modo geral, sempre mantiveram uma relação bastante estreita com os seres humanos, que movidos pela curiosidade, os utilizaram como animais de companhia, entretenimento ou trabalhos experimentais e desta maneira os elevando a um lugar de destaque no quesito de grupos de animais introduzidos (TRAAD et al., 2012).

Os saguis introduzidos na bacia do rio São João, no interior do estado do Rio de Janeiro, estão presentes na maioria dos fragmentos florestais habitados pelos micos-leões-dourados (Figura 1) (Ruiz et al. 2011).

Figura 1 - Interação das espécies em 2011



Fonte: Ruiz, et al., 2011

## 2.2. *Callithrix penicillata*

A espécie *Callithrix penicillata* é reconhecida como primata neotropical da família callitrichidae, são animais considerados de pequeno porte (cerca de 200 - 300 gramas), vivem em grupos de 4 a 13 indivíduos e possuem hábitos diurnos, popularmente são conhecidos como sagui do tufo preto e mico estrela (AURICCHIO, 1995). Indivíduos desta espécie possuem tufos pré-auriculares longos e negros em forma de pincel, coloração castanha escura a negra da cabeça até a escápula e acinzentada escura no corpo, mancha branca na fronte e cauda longa não preênsil com pelo em tons branco e preto intercalado em forma de anéis (Figura 2). A maturidade sexual de fêmeas é em torno dos 12- 15 meses já os machos 12 meses. A gestação dura cerca de 5 meses. Trata-se de uma espécie invasora com grande distribuição geográfica, ocorre em regiões fitoecológicas no interior do Brasil, como no cerrado e na caatinga. São animais que possuem uma ampla variedade em sua dieta, como seiva, frutos, folhas e pequenos vertebrados. Essa espécie possui uma grande taxa de sobrevivência e reprodução, o que está diretamente ligada com a capacidade de invasão dos mesmos (MORAIS JR. et al, 2008).

Figura 2 - *Callithrix penicillata*



Fonte: Ruiz, et al., 2011



### 2.3. *Callithrix jacchus*

É popularmente conhecido como sagui do tufo branco pela presença dos tufos de pelo branco ao redor das orelhas. Ademais possuem cauda longa não preênsil listrada em preto normalmente maior que o corpo (Figura 3). Também possuem um porte pequeno (cerca de 200 - 400 gramas), hábitos diurnos e vivem em grupos de 2 a 13 indivíduos com uma fêmea poliandra, ou seja, pode cruzar com diversos machos e se reproduzir ao longo de todo o ano. A maturidade sexual e a gestação é similar a descrita para *C. penicillata*. Ocupam uma área de 0,5 - 5 hectares e normalmente escolhem emaranhados e ocos de árvores para passar a noite (AURICCHIO, 1995). São animais silvestres, que não deveriam ter contato com seres humanos, porém, devido ao tráfico ilegal de animais, essas espécies são vistas cada vez mais em áreas urbanas. A interferência antrópica pode trazer diversos malefícios para esses animais que são vítimas do tráfico ilegal, e também para o homem, ocasionando um grande desequilíbrio ecológico (ROCHA et al.,2021).

Figura 3 - *Callithrix jacchus*



Fonte: Ruiz, et al., 2011

## 2.4. *Callithrix* spp.

Esse grupo de saguis é reconhecido como espécies híbridas. A maior parte da população consiste no cruzamento dessas duas espécies *Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus*. Seus híbridos podem ser identificados por diferenças nos padrões de disposição e coloração dos pelos da face e dos tufos de pelos nas orelhas, em comparação com as duas espécies puras (Ruiz et al., 2011).

Figura 4 - *Callithrix* spp. (híbridos)



Fonte: Ruiz, et al., 2011

## 2.5 Helmintos

Os helmintos constituem um amplo grupo de animais que inclui espécies de vida livre e parasitária. “Helmins” significa verme (SERRA VALE, 1987) e o termo tem sido utilizado para aqueles animais de corpo alongado, cilíndrico e para os planos lisos ou segmentados e sem esqueleto interno ou externo. No contexto da parasitologia são de interesse os filos Platelminetos, Nematoda, Acantocephala, Nematomorpha e Anelida\*<sup>1</sup>. Helmintos tem importância já que podem ocasionar uma variedade de

---

<sup>1</sup> \* Na sub-classe Hirudinea (Sanguessuga) existem espécies ectoparasitas temporários de invertebrados e vertebrados.

problemas de saúde a humanos, animais domésticos e silvestres. Problemas estes que podem levar a óbitos decorrentes do parasitismo direto e ou causas associadas tais como uma infecção secundária. Alguns helmintos como os nematoides podem impactar a agricultura levando a prejuízos na produtividade de plantações diversas usadas para consumo humano e animal (FORTES, 2014).

Em primatas não-humanos os helmintos encontrados pertencem ao grupo dos nematoda, platelmintos e acantocephala. Em símios do Novo Mundo, na década de 70 eram assinalados 72 espécies de nematoides, 13 trematoides e 18 cestoides (HERSHKOVITZ, 1977). Mais recentemente, em um estudo de revisão sistemática com primatas neotropicais foram relatados 276 táxons de parasitas. A maior parte das pesquisas parasitológicas em primatas neotropicais foi concentrada em endoparasitas. Os helmintos são o grupo mais estudados, com 204 artigos, seguidos pelos protozoários, que contam com 115 artigos, em um banco de dados de 251 publicações sobre a fauna parasitária de primatas neotropicais. Em contrapartida, os ectoparasitas foram explorados apenas em 19 estudos (6%). A fauna parasitária de primatas Neotropicais é dominada principalmente por nematoides (SOLÓRZANO-GARCÍA e PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2018).

No Brasil a lista de helmintos de primatas selvagens da Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Rio de Janeiro, Brasil, juntamente com informações da literatura atualizadas até 2016 trazia 50 espécies de helmintos associadas a 46 espécies de primatas silvestres no Brasil (CORREA, 2016). Sendo que 30 espécies (60%) são de nematoides. O maior número de registros é o nematoide *Dipetalonema gracilis* (Filarioidea, Onchocercidae), associado a 13 espécies de primatas. A espécie de primatas com mais registros de helmintos no Brasil é *Saimiris ciureus* (Cebidae) com 16 espécies (13 nematoides, três acantocéfalos). O autor também observou que um total de 46 espécies de primatas silvestres do país possui pelo menos uma espécie de helminto registrada, o que representa aproximadamente 39% das espécies deste grupo hospedeiro no Brasil. Assim, a helmintofauna em primatas silvestres no Brasil está obviamente subestimada, uma vez que a helmintofauna na maioria das espécies de primatas brasileiros permanece desconhecida.

## 2.6 Nematoides

Nematoides são animais que possuem simetria bilateral, pseudocelomados e com um corpo fusiforme, às vezes subcilíndrico ou esférico. O sistema respiratório e circulatório está ausente, mas está presente sistema digestivo completo, sistema excretor constituído de canais longitudinais, sistema nervoso ganglionar e apresentam feixes musculares que se estendem no sentido longitudinal. Geralmente têm sexos separados, o que pode resultar em um notável dimorfismo sexual. Podem viver de forma livre ou parasitária, alternando entre esses modos de vida em diferentes fases de seu ciclo vital. Aqueles de vida livre podem estar presentes em ambientes terrestres, marinhos e dulciaquícolas. Todos os vertebrados são parasitados e a maioria dos invertebrados e podem ocorrer em quase todas as partes do organismo. Suas dimensões variam de milímetros a cerca de oito metros (FORTES, 2014).

Externamente, a superfície dos nematoides é revestida por uma cutícula fina e flexível composta principalmente de proteínas com vestígios de lipídios e carboidratos, geralmente com estrias transversais mais ou menos visíveis, podendo ou não apresentar expansões. Na parte anterior, localiza-se a boca, que pode ter diferentes formas, como circular, hexagonal, triangular ou pontiaguda, podendo ser simples ou possuir lábios, interlábios, uma coroa radiada ou papilas peribucais. Na parte anterior também podem existir outras estruturas cuticulares, como dilatação vesicular, asas, constrições, papilas cervicais, saliências cuticulares, espinhos e cordões. Além das papilas peribucais, há outros órgãos sensoriais chamados anfídios, que são cavidades cuticulares. Nas fêmeas, a parte posterior do corpo e a cauda geralmente são cônicas, alongadas e raramente possuem curvaturas. Em relação aos machos, geralmente podem ser observadas expansões cuticulares que, quando suportadas por feixes de músculos dispostos radialmente, formam a bolsa copuladora, enquanto as expansões menores sustentadas por papilas pedunculadas constituem as asas caudais. Outras estruturas como papilas sésseis, espículos, telamons, gubernáculos e ventosas podem estar presentes na extremidade posterior dos machos. Em relação à ecologia, os nematoides são extremamente bem-sucedidos, evidenciado pela grande diversidade de espécies e habitats de ocorrência (FORTES, 2014).

## 2.7 Gênero *Primasubulura*

O gênero *Primasubulura* e outros da família Subuluridae foram caracterizados por INGLIS (1958) devido às suas características morfológicas. A estrutura da cabeça dos nematoides desta família foi analisada comparativamente, e os resultados obtidos fundamentaram uma nova classificação. Pelo menos três partes da região anterior são valiosas na análise sistemática: o formato da abertura da boca, o formato da seção transversal da cavidade bucal e a estrutura das porções faríngeas. Os nove gêneros que compõem a família, dois dos quais - *Primasubulura* e *Tarsubulura* - são novos, foram agrupados em três subfamílias, das quais uma - Allodapinae - é nova, com base na análise da estrutura da cabeça, em conjunto com outros caracteres anteriormente mais conhecidos. Os gêneros foram agrupados da seguinte forma: subfamília Subulurinae com três gêneros, *Subulura*, *Oxynema* e *Labiobulura*; subfamília Allodapinae com dois gêneros, *Allodapa* e *Aulonocephalus*; subfamília Parasubulurinae com quatro gêneros, *Parasubulura*, *Primasubulura*, *Tarsubulura* e *Leipanema*.

Os caracteres destas subfamílias são:

Subulurinae: abertura bucal simplesmente hexagonal; lobos periféricos totalmente musculosos; asas cervicais presentes. Macho: ventosa pré-cloaca sem elaborações cuticulares; ambos espículos totalmente cuticularizados.

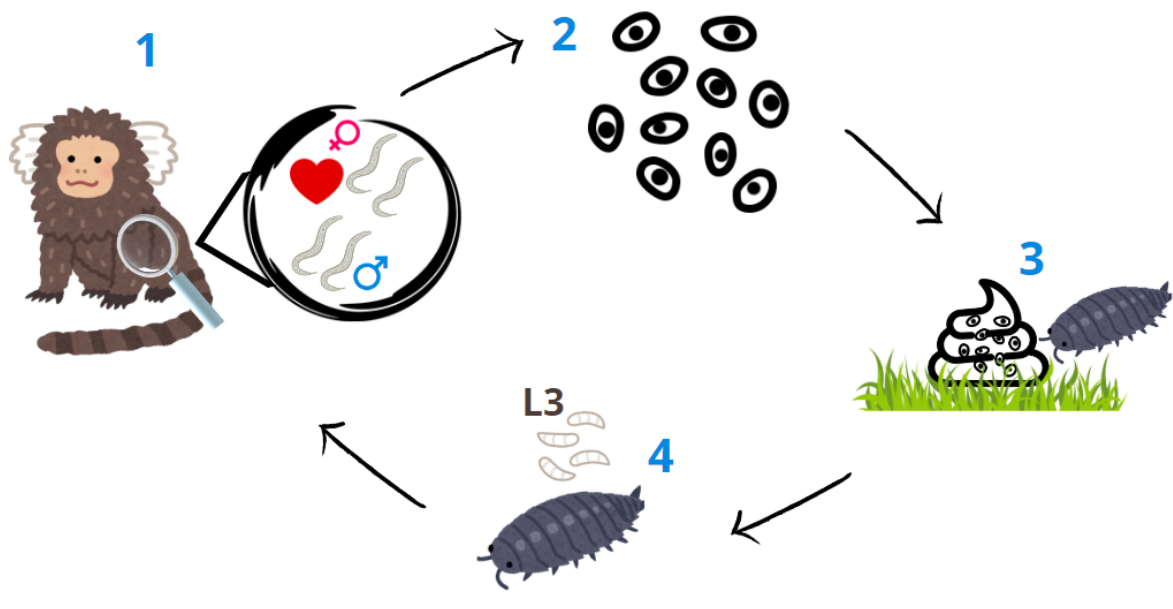
Allodapinae: abertura bucal basicamente hexagonal; quando complexos, prolongamentos anteriores do revestimento da cavidade bucal são mais estreitos que os lóbulos labiais; cavidade bucal circular, porções faríngeas não lobadas ou torcidas, mas com um elaborado arranjo interno de cristas. Macho: ventosa pré-cloaca alongada sem elaborações.

Parasubulurinae: abertura bucal hexagonal a triangular, simples ou complexa; quando complexos, prolongamentos anteriores da cavidade bucal com a mesma largura dos lóbulos labiais; cavidade bucal hexagonal ou triangular em seção transversal; porções faríngeas geralmente lobadas e torcidas. Macho: ventosa pré-cloaca alongada sem borda definida ou, basicamente, circular com borda complexa de lamelas radiantes.

A espécie *P. jacchi* é comumente encontrada no gênero *Callithrix* (PINTO e NORONHA 1972; MELO e PEREIRA, 1986; RESENDE et al 1994; MELO 2004,

SALES et al., 2010; TAVELA et al., 2013; COSTA, et al., 2022; SOARES et al, 2024). Os adultos vivem no intestino grosso principalmente, mas também podem ser encontrados no intestino delgado, sobretudo quando o parasitismo é intenso (MELO et al. 1985). Após a cópula as fêmeas liberam os ovos embrionados, arredondados de casca fina juntamente as fezes. No ambiente externo o ovo ao ser ingerido pelo hospedeiro artrópode dá lugar ao desenvolvimento da larva infectante (L3). A infecção dos saguis ocorre pela ingestão do artrópode (Figura 5). Embora frequente e por vezes envolvendo grande número de vermes, o parasitismo por *P. jacchi* não induz uma patologia significativa (MELO, 2004).

Figura 5 – Ciclo de vida de *P. jacchi*.



Fonte: Elaborado pelo autor

## 2.8 RNA Ribossomal ITS (Espaçadores Internos Transcritos)

As técnicas moleculares derivadas da reação em cadeia da polimerase (PCR), como o sequenciamento de DNA, têm sido eficazes na identificação de diversos organismos, incluindo os nematoides, pela caracterização da região ITS (*Internal Transcribed Spacer* ou *Espaçadores Internos Transcritos*). Essa região separa os genes do DNA ribossomal nuclear (rDNA) 18S e 26S, que codifica os respectivos RNAs ribossomais, e pode ser amplificada com primers específicos ancorados nessas duas

regiões. O ITS é dividido em ITS1 e ITS2, sendo o segundo que separa os genes do rDNA 5.8S e 28S. Enquanto as regiões dos genes ribossomais permanecem altamente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, as regiões dos espaçadores ITS, devido à sua taxa de evolução mais rápida, apresentam variações significativas tanto na sequência de bases quanto no comprimento. Essa variação intraespecífica nas regiões ITS torna-se uma ferramenta valiosa para estudos de diversidade genética e identificação precisa de espécies, permitindo uma análise mais detalhada das diferenças genéticas dentro de populações específicas (CHILTON et al. 2001, ANDRADE et al. 2013, 2018).

A maturação dos rRNAs e o processo de splicing são processos que dependem significativamente da estrutura secundária do ITS. Devido a isso, existe uma forte pressão seletiva para que as sequências e as estruturas dessa região sejam mantidas de maneira relativamente conservada. Essa conservação é crucial para garantir o correto funcionamento e eficiência desses processos biológicos essenciais. A variabilidade intraespecífica nas regiões ITS não apenas reflete a complexidade e a adaptabilidade dos organismos, mas também fornece uma base robusta para a identificação precisa de diferentes linhagens genéticas. A utilização das regiões ITS na identificação é considerada uma alternativa eficaz e o estudo detalhado da diversidade genética dentro de populações específicas pode revelar insights valiosos sobre sua história evolutiva e dinâmica populacional (COLEMAN, 2007).

As regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) evoluem de maneira acelerada, o que resulta em variações tanto na sequência quanto no comprimento dessas regiões entre indivíduos da mesma espécie. Essa rápida evolução torna as regiões extremamente valiosas para estudos filogenéticos e de identificação, pois permite a diferenciação precisa entre gêneros e espécies. A diversidade observada nessas sequências pode ser utilizada como uma ferramenta poderosa para a taxonomia, contribuindo para uma melhor compreensão da biodiversidade e das relações evolutivas entre os organismos. Assim, as regiões ITS se destacam como um recurso essencial para pesquisadores que buscam elucidar a complexidade da vida no planeta (MENEZES et al. 2009)

### 3. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo caracterizar a ultraestrutura e a região gênica ITS1/2 de espécimes de *Primasubulura jacchi* encontrados em *saguís híbridos* (*Callithrix spp.*) oriundos de fragmentos florestais no entorno da Reserva Biológica de Poço das Antas.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Descrever por microscopia óptica a morfologia e a morfometria de espécimes de *P. Jacchi*
- Descrever por microscopia eletrônica de varredura a morfologia de superfície de espécimes de *P. Jacchi*.
- Amplificar e sequenciar as regiões gênicas ITS-1 - ITS-2 dos espécimes de *P. jacchi*.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Obtenção dos helmintos

As amostras de *P. jacchi* foram obtidas através de necropsias de saguis oriundos dos fragmentos florestais localizados dentro da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico Leão-Dourado (RJ), no entorno da Reserva Biológica de Poço das Antas, e preservadas em etanol 70%. A obtenção dessas amostras foi vinculada ao projeto coordenado pelo prof. Dr. Leonardo Serafim e aprovado pelo comitê de ética no uso de animais com o protocolo 470. Os espécimes foram processados de acordo com os protocolos descritos abaixo.

#### 4.2 Microscopia Óptica

Os nematoides conservados em etanol 70% foram transferidos diretamente para lactofenol de Amann para clarificação conforme descrito em Amato et al. (1991) e posterior análise em microscopia óptica de campo claro e microscopia de contraste interferencial. Foram utilizados ao todo 11 espécimes (05 machos e 06 fêmeas) para



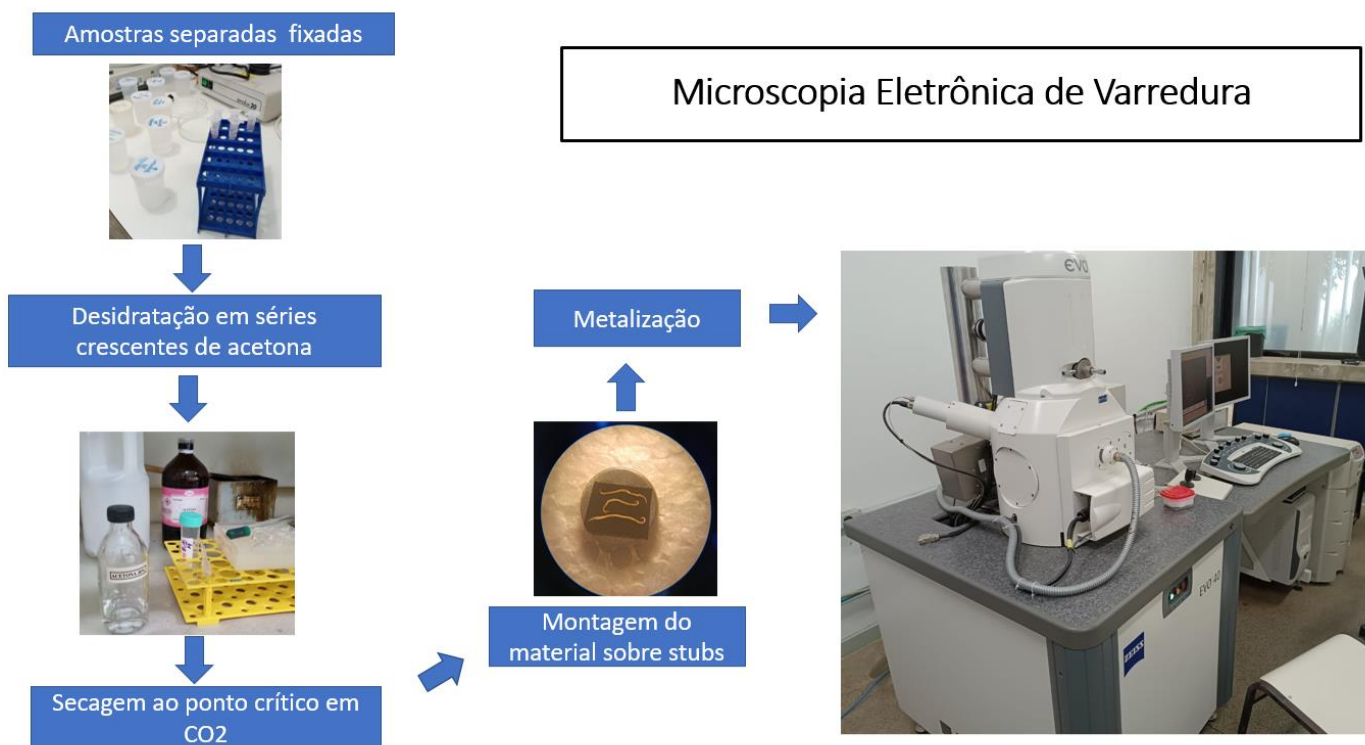
o descritivo morfométrico. Estes dados foram comparados com descritivos de outros estudos.

### **4.3 Microscopia eletrônica de Varredura**

As amostras oriundas do etanol 70% foram processadas seguindo De Souza et al., (1989; 2007). Para tanto, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% recém-preparado, CaCl<sub>2</sub> Cloreto de Cálcio 5mM, tamponada em pH 7,4 com solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, e pós-fixadas em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 5mM de cloreto de cálcio e 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 1 hora. Posteriormente, foram lavadas novamente com tampão cacodilato.

As amostras foram desidratadas em série crescente com acetona (30% - 50% - 70% - 90% - 3x 100%), permanecendo por uma hora em cada concentração, e secadas no aparelho de ponto crítico com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Depois, as amostras foram montadas em suporte para MEV com fita de carbono, metalizadas em ouro-paládio e observadas no microscópio eletrônico de varredura Zeiss 962, operado com 15 kV. Um fluxograma das principais etapas é demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma das principais etapas de processamento da amostra para observação de amostra em Microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico de um pool de 10 indivíduos adultos de *P. jacchi* foi realizada utilizando o QIamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), conforme as instruções do fabricante.

O excesso de etanol 70% foi removido. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C até que todo o resíduo de etanol fosse evaporado completamente. Foi adicionado 180 µL de tampão ATL às amostras, que estavam em tubos de 1,5 mL. Após isso, 20 µL de proteinase K foi adicionado, misturando a solução em um vórtex, e as amostras foram incubadas a 56°C até que o tecido estivesse completamente lisado, o que levou pelo menos 12 horas (overnight).

Após a lise completa do tecido, as amostras foram incubadas a uma temperatura adequada sob agitação por 1 hora ou até que a degradação estivesse completa. Em seguida, as amostras foram centrifugadas brevemente para remover as gotas presentes na tampa dos tubos.

Foi adicionado 200 µL de tampão AL à amostra, misturando bem para garantir uma solução homogênea. A amostra foi então incubada a 70°C por 10 minutos e, após

esta etapa, foi novamente centrifugada brevemente. Em seguida, foi adicionado 200  $\mu$ L de etanol à amostra e misturado em vórtex por 15 segundos, seguido de outra centrifugação breve.

A mistura resultante foi cuidadosamente aplicada na coluna de sílica (em um tubo de coleta de 2 mL) sem molhar a borda. Após fechar a tampa, centrifugamos a 8000 rpm por 1 minuto. A coluna de centrifugação Mini QIAamp foi transferida para um tubo de coleta limpo de 2 mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado.

Foi adicionado 500  $\mu$ L de tampão AW1 e centrifugamos em velocidade de 8000 RPM por 1 minuto. A coluna de centrifugação foi, então, transferida para um novo tubo de coleta de 2 mL. Logo após, foi adicionado 500  $\mu$ L de tampão AW2 que foi centrifugado em velocidade máxima (13.400 rpm) por 3 minutos. A coluna de centrifugação foi, então, transferida para um novo tubo de coleta de 2 mL e a centrifugação em velocidade máxima foi repetida por 1 minuto para evitar a transferência do AW2 na próxima etapa. Após essa etapa, colocamos a coluna com o filtrado em um tubo de 1,5 ml (não fornecido pelo kit) onde foi adicionado 200  $\mu$ L de tampão AE para eluição, onde ficou incubado em temperatura ambiente por 1 minuto, depois disso foi centrifugado a 8000 RPM por 1 minuto. Após a eluição, o DNA das amostras foi quantificado a 260 nm no equipamento nanodrop.

Além da extração de DNA do pool de nematoides, era nosso interesse obter amostras de DNA de indivíduos isolados. Para isto, foram usados 3 métodos de extração: **1)** Primeiro, o kit QIamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) conforme descrito acima; **2)** o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega); e o **3)** método *in-house* com base em SDS e proteinase K. Os métodos 2 e 3 estão detalhados a seguir:

Cada nematoide foi colocado em um tubo de 1,5 ml com uma pinça, em seguida foi lavado com PBS e vortexado. O PBS foi retirado com uma pipeta e, posteriormente, foram adicionados 600  $\mu$ L de solução de lise de núcleos, 3  $\mu$ L de RNase e 10  $\mu$ L de proteinase K. A mistura foi incubada a 37°C overnight para permitir a completa degradação dos tecidos do nematoide. Após a incubação, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e foram adicionados 200  $\mu$ L de solução de precipitação de proteínas, que foi vortexada para garantir uma mistura homogênea. A seguir, a amostra foi brevemente colocada no congelador por 5 minutos para facilitar a precipitação de proteínas. Após essa etapa, a amostra foi então centrifugada a 13.400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante, contendo o DNA, foi cuidadosamente transferido para um novo tubo limpo contendo 600  $\mu$ L de isopropanol à temperatura ambiente,

promovendo a precipitação do DNA. Após misturar por inversão suave, a amostra foi centrifugada novamente a 13.400 rpm por 1 minuto para sedimentar o DNA precipitado.

O sobrenadante foi removido delicadamente e a amostra foi tratada com 600  $\mu$ L de etanol 70% à temperatura ambiente, seguido de nova centrifugação a 13.400 rpm por 1 minuto. Após, este etanol foi descartado e a amostra foi deixada secar à temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente, o DNA precipitado foi solubilizado com 50  $\mu$ L de água ultrapura e incubado overnight em temperatura ambiente.

Após o nematoide já lavado com PBS foi adicionado 1  $\mu$ L de proteinase K (25 mg/ml) e 49  $\mu$ L de SDS a 0,005%, conforme descrito por Carneiro et al. (2011). Os microtubos foram então incubados a 55°C por 1 hora, seguido de uma incubação a 99°C por 30 minutos para garantir a completa degradação das amostras.

Para purificar a amostra e remover o SDS, inicialmente transferimos o sobrenadante para um tubo limpo e adicionamos dois volumes de etanol absoluto. Agitamos suavemente para facilitar a precipitação do DNA e centrifugamos a 3.200 rpm por 10 minutos. Em seguida, verificamos a presença do precipitado e descartamos o sobrenadante. Adicionamos 5  $\mu$ L de etanol 70%, centrifugamos novamente por 10 minutos a 3.200 rpm e repetimos o processo de verificação do precipitado. O tubo foi então deixado secar na bancada e incubado destampado a 37°C por 5 a 10 minutos.

Após a incubação, ressuspendeu-se o precipitado em 300 a 350  $\mu$ L de água para PCR e deixamos a mistura em temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, incubamos a 37°C por 30 minutos e transferimos a solução para um tubo Eppendorf devidamente identificado. Finalmente, mantivemos o material à 4°C ou -20°C, dependendo da necessidade de uso posterior.

Este procedimento visou garantir a purificação eficaz da amostra, preparando-a para análises subsequentes com DNA livre de SDS.

#### **4.5 Amplificação por PCR**

O gene ribossomal ITS1 foi amplificado utilizando os primers NC5 (*forward*) e NC13 (*reverse*) (NEWTON et al., 1998), o gene ribossomal ITS2 foi amplificado utilizando os primers NC13 (*forward*) e NC2 (*reverse*) (GASSER et al., 1993; NEWTON et al., 1998). O produto do PCR foi examinado por eletroforese em gel de

agarose 1,5%- TBE (89 mM Tris- HCL, 0,89M de ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 7,4) (SAMBROOK *et al.*, 1989) e tratados com brometo de etídio. Os produtos de PCR foram sequenciados em ambas as direções, utilizando os primers *forward* e *reverse*, em reações separadas. As seqüências de DNA foram editadas e analisadas usando os programas BioEdit v7.0.1 e o DNASTAR Lasergene SeqMan v7.0.0. As seqüências foram alinhadas usando Clustal W (THOMPSON *et al.*,1994).

Após a etapa de extração do DNA do pool e indivíduos utilizando o Qlamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), foi realizada a PCR utilizando os primers NC2(TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT) e NC5(GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT) ao master mix, foram adicionados os seguintes componentes: 5 µL de tampão de PCR 10X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 4 µL de dNTP, 1 µL de cada primer (NC2 e NC5), 0,2 µL de Platinum Taq polimerase, 31,8 µL de H<sub>2</sub>O e 4 µL de DNA. O programa ITS2 foi utilizado para a espécie *H. contortus*, com o termociclador ajustado para temperaturas de 55°C e 58°C. Para a espécie *P. jacchi*, a temperatura utilizada foi de 58°C. O Programa utilizado para a amplificação consistiu em uma temperatura inicial de 95°C por 2 minutos, com ciclos de desnaturação de 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão 72°C por 1 minuto.

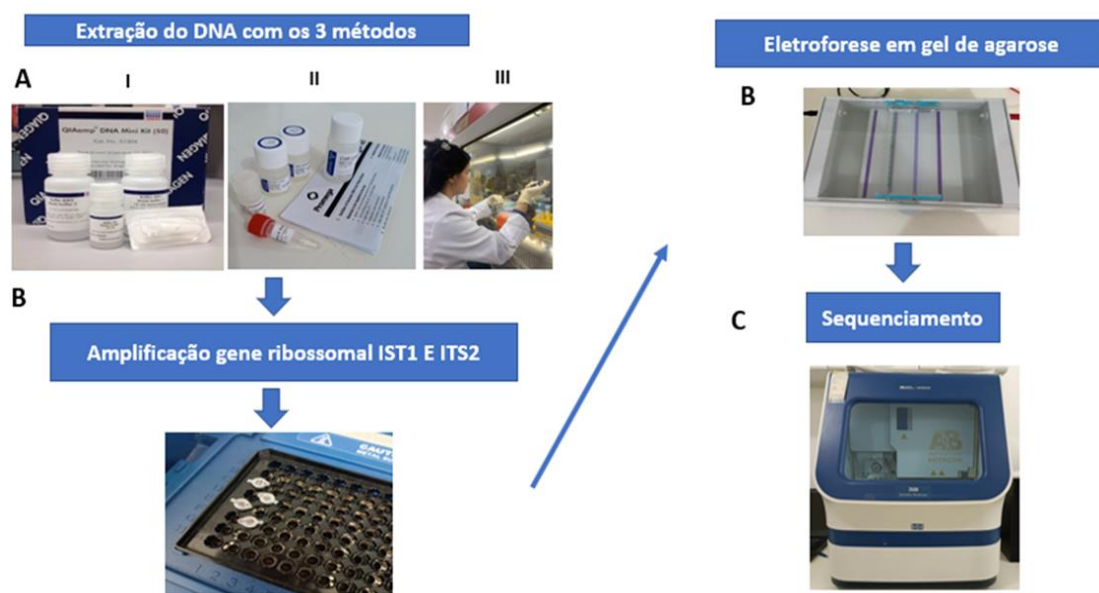
Para a preparação do gel de agarose 1,5 % foi utilizado 0,9 g de agarose e 60 ml de TAE e colocado em um béquer de vidro de 125ml, após, o líquido foi aquecido em forno micro-ondas até que solução estivesse totalmente homogênea.

Para a eletroforese, foi feita a preparação da Ladder com 5µL de ladder e 1µL de gel red em um tubo de 0,5 mL, após essa etapa, procedemos com a preparação do gel adicionando 1 µL de tampão de amostra, 1 µL de gel red e 5 µL do produto da PCR em um outro tubo de 0,5.

Procedemos com a PCR de um organismo individualmente utilizando o programa ITS1/nematoide. Para cada reação de PCR, foram adicionados 5 µL de tampão de PCR 10X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 5 µL de dNTP, 1 µL de cada primer específico e 2 µL de Taq polimerase (Promega). O programa de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C e extensão a 72°C por 30 segundos.

Este método foi utilizado para amplificar e analisar os fragmentos de interesse do DNA, permitindo a caracterização precisa dos nematoides estudados. Um fluxograma das principais etapas é demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma das principais etapas de processamento da amostra para análise molecular.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6 Sequenciamento direto de DNA

As sequências de DNA amplificadas por PCR foram purificadas e submetidas à reação de sequenciamento com o reagente BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific). A purificação foi realizada com a enzima Exosap-IT express: 2  $\mu\text{L}$  para 6  $\mu\text{L}$  de amostra, e incubadas por 37°C por 6 minutos e 80°C por 5 minutos. Um microlitro da amostra purificada e 1  $\mu\text{L}$  do primer forward ou reverse foram adicionados a cada poço da placa de sequenciamento. A reação de sequenciamento foi preparada com 5,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 1,5  $\mu\text{L}$  de BigDye Sequencing Buffer e 1  $\mu\text{L}$  de BigDye Ready Reaction Premix, perfazendo um total de 8  $\mu\text{L}$ , que foi adicionado a cada poço já contendo 1  $\mu\text{L}$  do primer e 1  $\mu\text{L}$  do DNA template.

Em seguida essa reação foi colocada no termociclador, com o seguinte programa: 95°C por 1 minuto, 25x (96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos), 4°C até ser retirado do termociclador.

Na purificação da reação de sequenciamento foi feito o método de precipitação por etanol: 2,5  $\mu\text{L}$  de EDTA 125 mM e 30  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi então dispensado e a placa foi centrifugada de ponta cabeça a 1160 rpm por 1 minuto para secar os poços. Foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (preparado na hora) em cada

poço, e novamente centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. O conteúdo foi novamente dispensado e a placa foi centrifugada de ponta cabeça (a 1160 rpm por 1 minuto). Após a evaporação total do etanol, 10 µL de formamida foi adicionado em cada poço. A placa fechada com uma septa foi levada para o termociclador usando a seguinte etapa de desnaturação: 95°C por 5 minutos e 4°C por 3 minutos. Por fim, a placa foi colocada no sequenciador. As amostras foram analisadas por eletroforese capilar no analisador genético automático (ABI 3500), usando o polímero POP-7 e capilares de 50 cm. As sequências obtidas foram analisadas com o software Geneious (Dotmatics). As sequências com boa qualidade foram usadas no BLASTn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) para identificação do organismo por homologia da região ITS1/2.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Microscopia óptica

*Primasubulura jacchi* apresentou corpo retilíneo contendo extremidade anterior em formato de cone, apresentando asas cervicais pouco desenvolvidas, porção posterior afilada muito recurvada ventralmente no macho e reta na fêmea terminando em um apêndice caudal.

Machos (Figura 8 e Figura 9): corpo com 13,5 – 16 mm ( $14,3 \pm 0,871$ ) comprimento, 0,35 – 0,38 mm ( $0,36 \pm 0,01$ ) largura na junção esôfago intestino. Cápsula bucal pequena 0,03 – 0,04 mm ( $0,03 \pm 0,005$ ) e 0,03 – 0,03 mm ( $0,03 \pm 0$ ) largura. Esôfago retilíneo medindo 1,26 – 1,4 mm ( $1,34 \pm 0,522$ ), com dilatação piriforme na porção terminal, unido por um curto istmo ao bulbo esferoide, medindo 0,25 – 0,29 mm ( $0,27 \pm 0,014$ ) comprimento e 0,22 – 0,25 mm ( $0,23 \pm 0,01$ ) largura. Distância do poro excretor a extremidade anterior medindo 0,62 – 0,64 mm ( $0,63 \pm 0,01$ ). Espículos levemente desiguais sendo que espículo maior medindo 1,79 – 1,87 mm ( $1,83 \pm 0,03$ ) comprimento e espículo menor 1,7 – 1,82 mm ( $1,77 \pm 0,039$ ) comprimento. Gubernáculo quase retilíneo medindo 0,19 – 0,21 mm ( $0,2 \pm 0,007$ ) comprimento. Filamento caudal medindo 0,11 – 0,13 mm ( $0,12 \pm 0,007$ ).

Figura 8 - Micrografia de microscopia óptica de contraste interferencial da região anterior de um macho de *P. jacchi*. A- Esôfago contendo dilatação piriforme, istmo e bulbo esferoide. Inset da região do poro excretor, B- Extremidade anterior detalhando a cápsula bucal e asas cefálicas C- Bulbo esferoide no detalhe. Seta branca: Poro excretor, pontas de seta: asa cervical, seta dois sentidos: cápsula bucal, Seta preta: istmo, Estrela: Bulbo esferoide Barras: 200  $\mu$ m.

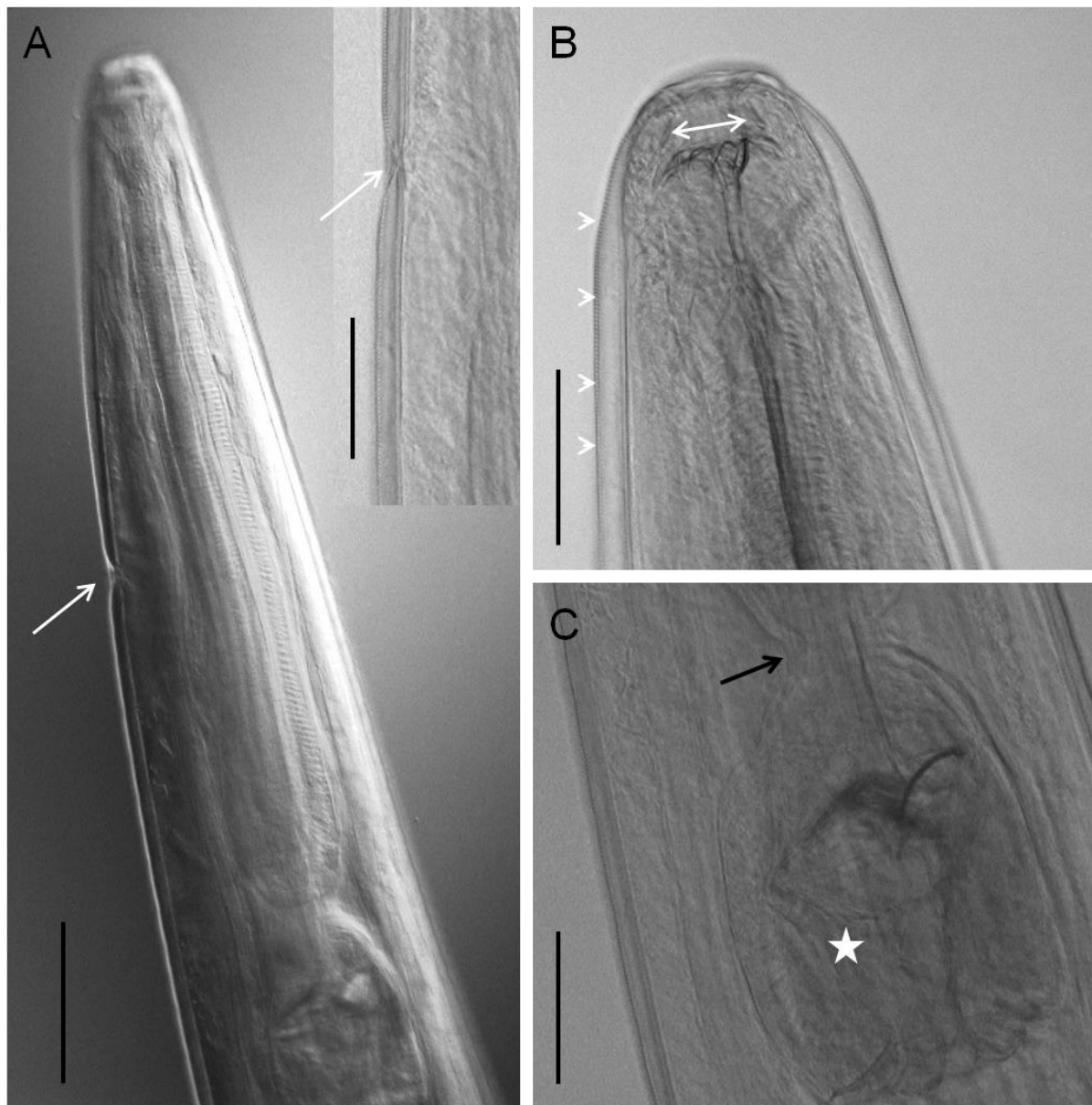
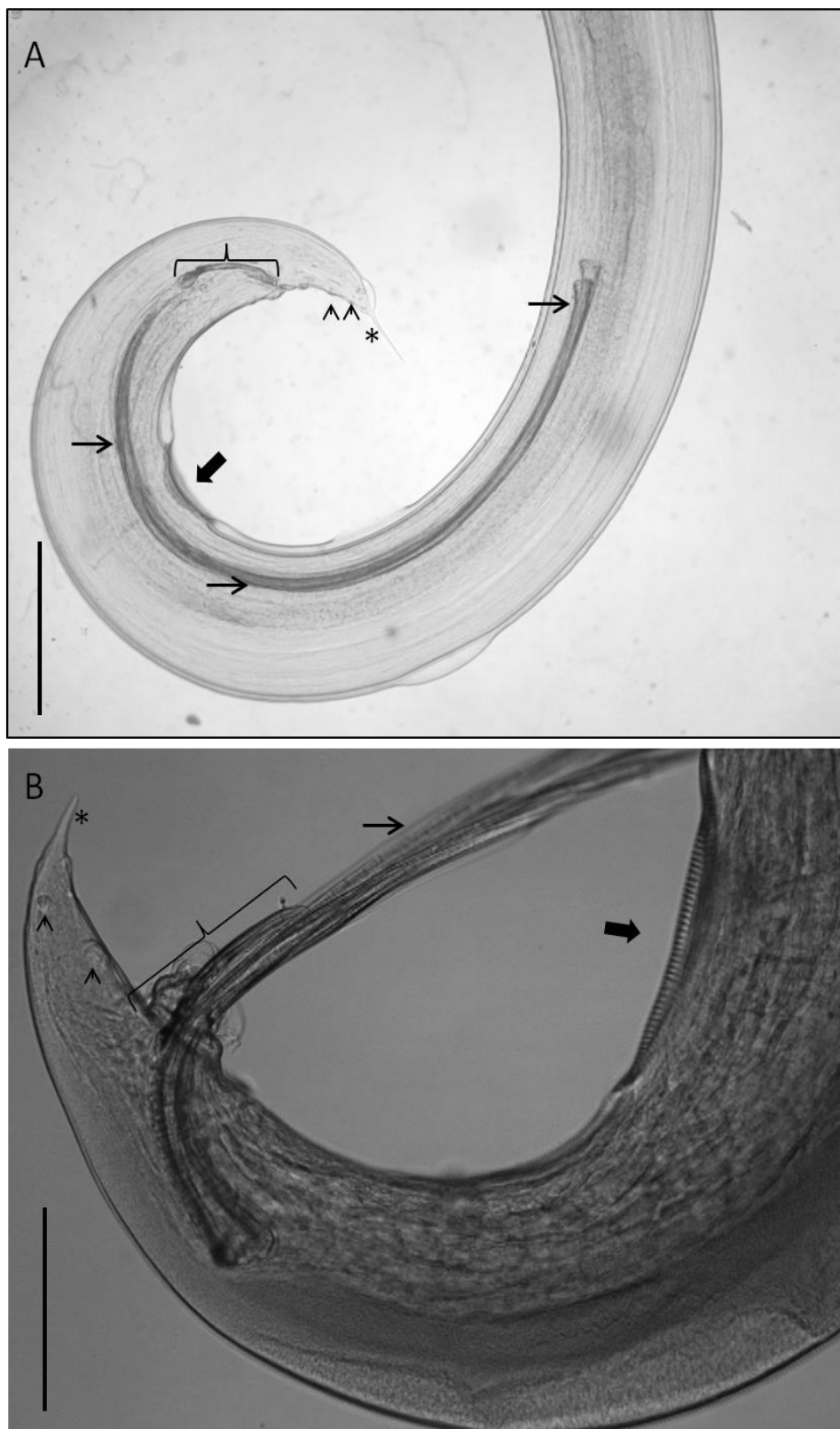




Figura 9 - Região posterior de macho de *P. jacchi* com espículos retraídos (A) e projetados (B). Barras 20  $\mu$ m, setas pretas: espículos, seta grossa: Ventosa, chave: gubernáculo, Ponta de seta: papilas genitais, asterisco: filamento caudal. Microscopia de campo claro na imagem A e microscopia óptica de contraste interferencial na imagem B.



Fêmeas de *P. jacchi* (Figura 9 e 10): corpo com 18 – 26 mm ( $21,5 \pm 3,496$ ) comprimento, 0,4 – 0,57 mm ( $0,46 \pm 0,064$ ) largura na junção esôfago intestino. Cápsula bucal pequena 0,04 – 0,05 mm ( $0,04 \pm 0,004$ ) e 0,04 – 0,05 mm ( $0,04 \pm 0,004$ ) largura. Esôfago retilíneo medindo 1,43 – 1,59 mm ( $1,52 \pm 0,05$ ), com dilatação piriforme na porção terminal, unido por um curto istmo ao bulbo esferoide, medindo 0,27 – 0,37 mm ( $0,33 \pm 0,031$ ) comprimento e 0,23 – 0,35 mm ( $0,29 \pm 0,036$ ) largura. Distância do poro excretor à extremidade anterior medindo 0,6 – 0,73 mm ( $0,66 \pm 0,052$ ). Distância da vulva a extremidade anterior medindo 4 – 11,25 mm ( $9,55 \pm 2,394$ ). Filamento caudal medindo 0,07 – 0,26 mm ( $0,16 \pm 0,092$ ).

Figura 10 - Micrografia de microscopia óptica de contraste interferencial de uma fêmea de *P. jacchi*. A- Parte do segmento anterior detalhando bulbo esferoide e istmo. Nota-se a presença de ovos. B- Extremidade anterior onde é possível observar asas cervical reduzida e cápsula bucal. C- Detalhe do poro excretor. Barras A e B: 20 $\mu$ m, C: 200  $\mu$ m. seta branca: istmo, estrela: bulbo esférico, triângulo: ovos, pontas de seta: asa cervical, seta preta: poro excretor.

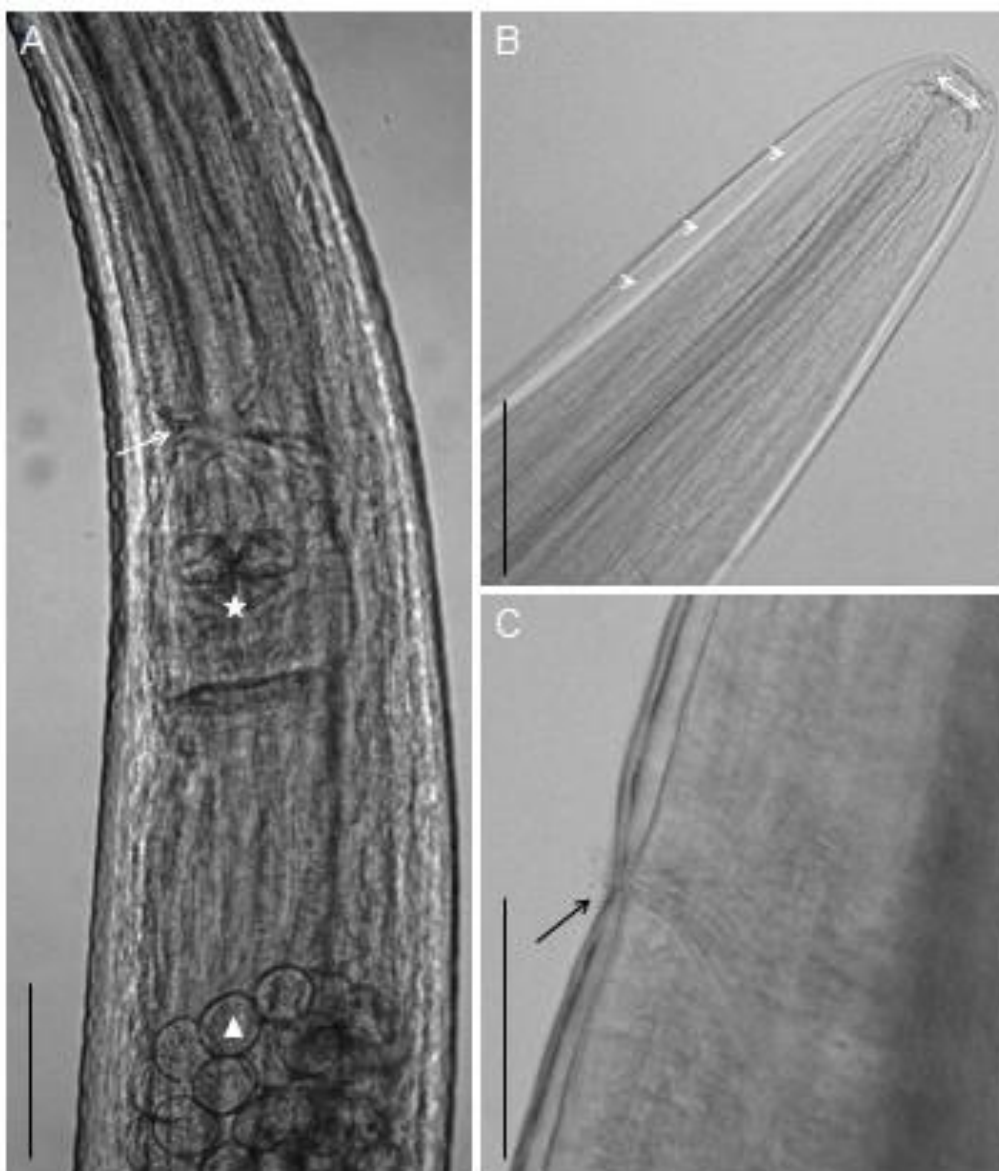


Figura 11 - Micrografia de microscopia óptica de contraste interferencial de fêmea de *P. jacchi*. A- Região caudal onde é possível visualizar anus e filamento. B- Detalhe do anus C- Detalhe da vulva. Barras A e B: 20 $\mu$ m, C: 200  $\mu$ m. chave: anus, seta preta: poro excretor.

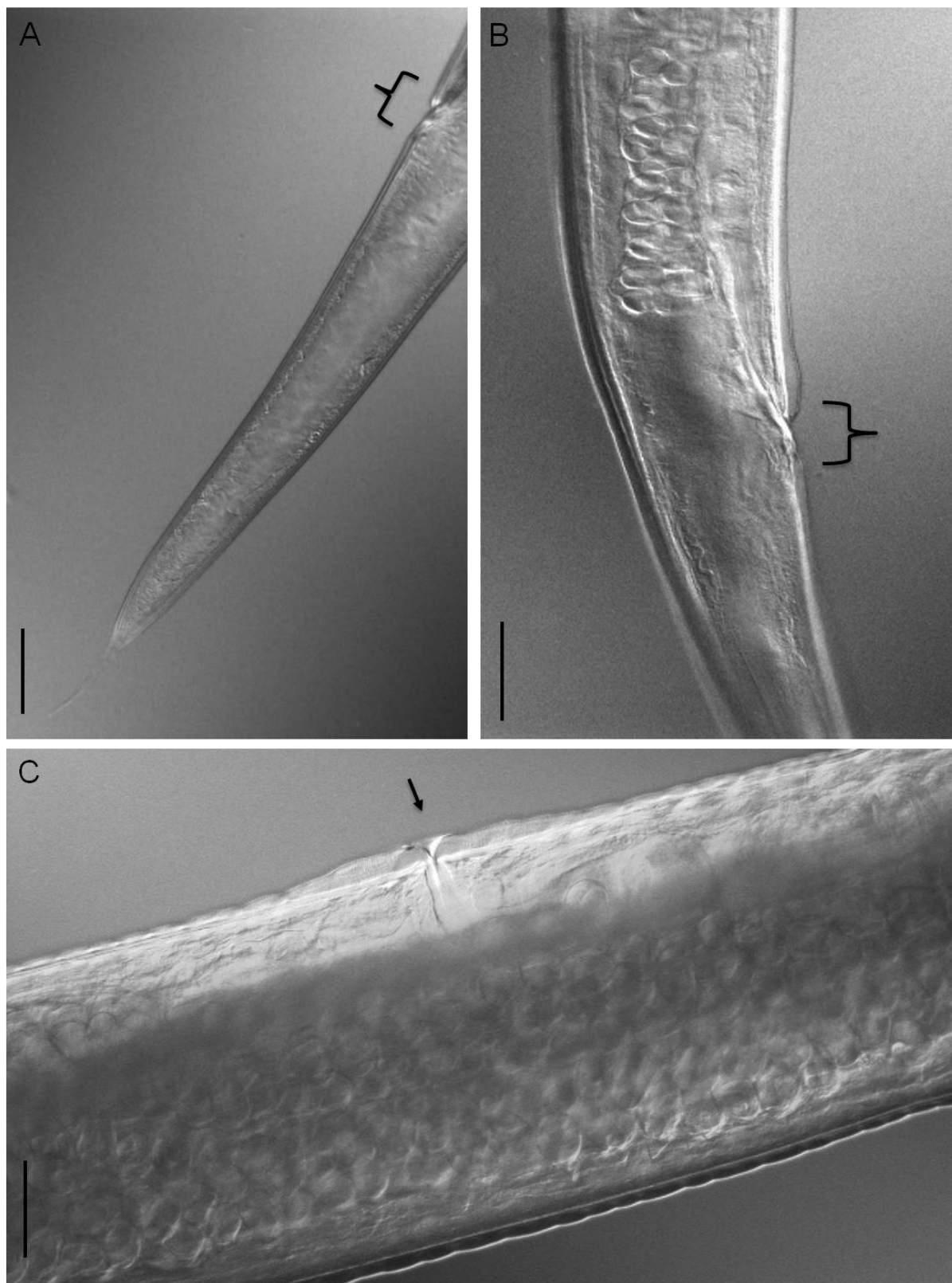


Tabela 1 - Caracteres morfométricos de machos e fêmeas de *P. jacchi* (Marcel, 1857) Railet & Henry, 1913 do estudo atual comparado a dados da literatura com distribuição de média, desvio padrão e valores máximos e mínimos observados da amostra analisada. Medidas em milímetros.

Caracteres	Estudo atual		Soares et al. 2024		Descrição original	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
			11.51±1.72	20.78±2.52	(8.29 -	(13.9 -
Comprimento total	14,3±0,871 (13,5-16)	21,5±3,497 (18-26)	(9.19– 14.02)	(17.41–24.41)	12.6)	19.2)
Largura máxima (junção esôfago intestino)	0,36±0,01 (0,35-0,38)	0,46±0,064 (0,4-0,57)	0.46±0.04 (0.40–0.50)	0.53±0.02 (0.51–0.55)	(0.50)	(0.53 - 0.66)
Comprimento cápsula bucal	0,03±0,005 (0,03-0,04)	0,04±0,004 (0,04-0,05)	0.03±0.01 (0.03–0.04)	0.04±0.01 (0.03–0.04)	(0.033)	(0.033)
Largura cápsula bucal	0,03±0 (0,03)	0,04±0,004 (0,04-0,05)	0.03±0.01 (0.03–0.04)	0.04±0.01 (0.03–0.04)	(0.033)	(0.053)
Comprimento esôfago	1,34±0,522 (1,26-1,4)	1,52±0,05 (1,43-1,59)	1.20±0.07 (1.11–1.28)	1.55±0.10 (1.39–1.66)	(1.09)	(1.34)
Comprimento bulbo esôfago	0,27±0,014 (0,25-0,29)	0,33±0,031 (0,27-0,37)	0.29±0.01 (0.28–0.30)	0.33±0.03 (0.29–0.37)	(0.26)	(0.34)
Largura bulbo esôfago	0,23±0,01 (0,22-0,25)	0,29±0,036 (0,23-0,35)	0.26±0.02 (0.21–0.27)	0.27±0.04 (0.20–0.31)	(0.24)	(0.31)
Anel nervoso a extremidade anterior	-	-	0.30±0.05 (0.27–0.37)	0.52±0.06 (0.43–0.56)	(0.30)	(0.32)
Distância do poro excretor extremidade anterior	0,63±0,01 (0,62-0,64)	0,66±0,052 (0,6-0,73)	0.45±0.04 (0.38–0.48)	0.68±0.07 (0.61–0.80)	-	(0.64)
Comprimento espículo maior	1,83±0,03 (1,79-1,87)	-	1.76±0.08 (1.70–1.88)	-	-	-
Comprimento espículo menor	1,77±0,039 (1,7-1,82)	-	1.73±0.07 (1.66–1.84)	-	-	-
Comprimento gubernáculo	0,2±0,007 (0,19-0,21)	-	0.20±0.03 (0.18–0.25)	-	(0.17)	-
Distância da cloaca a Extremidade posterior	-	-	0.27±0.02 (0.25–0.30)	-	(0.24)	-
Distância da vulva a Extremidade anterior	-	9,55±2,394 (4-11,25)	-	8.11±1.46 (6.64–10.04)	-	(5.67)

## 6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise mostrou superfície cuticular contendo estriações no sentido transversal a intervalos regulares (1-2,5  $\mu\text{m}$ ), intercaladas por cristas longitudinais curtas, e aleta cervical pouco desenvolvida. A boca hexagonal continha 06 papilas próximas dispostas em 2 fileiras. Machos apresentaram 11 pares de papilas genitais circulares com estriações duplas na extremidade proximal e uma na extremidade distal possuindo ao centro uma conformação arredondada, sendo distribuídas na pré-cloaca (03), junto à cloaca (02) e pós-cloaca (06). Uma das papilas pré-cloacais situa-se anexa a ventosa (Figura 11). A ventosa apresentou-se de forma elíptica sendo alongada no sentido longitudinal e possuindo um padrão na superfície cuticular próprio ao centro e nas bordas. Ao centro a superfície apresenta-se apenas com as estriações cuticulares enquanto nas bordas as cristas cuticulares atingem seu tamanho máximo (Figura 12). O apêndice caudal variou de 35-80  $\mu\text{m}$ , possuindo extremidade distal afilada e pontiaguda. Os espículos levemente desiguais continham cristas longitudinais que terminam próximo a extremidade distal afilada com ápice arredondado (Figura 13).

Figura 12 - Micrografias de MEV de *P. jacchi*. A) superfície cuticular contendo estriações no sentido transversal a intervalos regulares (1-2,5  $\mu\text{m}$ ), intercaladas por cristas longitudinais curtas, B) aleta cervical pouco desenvolvida, C) Boca hexagonal contendo 06 papilas próximas. D) região caudal do macho apresentando onze pares de papilas genitais sendo distribuídas na pré-cloaca (03), junto a cloaca (02) e pós-cloaca (06), presença de espículos levemente desiguais, E) Inset mostrando detalhe da papila com estriações duplas na extremidade proximal e uma na extremidade distal possuindo ao centro uma conformação arredondada. Barras A e E:2 $\mu\text{m}$ , B:20 $\mu\text{m}$ , C:10 $\mu\text{m}$ , D:200 $\mu\text{m}$ , asterisco: papilas, estrela: espículos, setas brancas: estriações transversais, ponta de seta: cristas longitudinais curtas, triangulo: asa cervical.

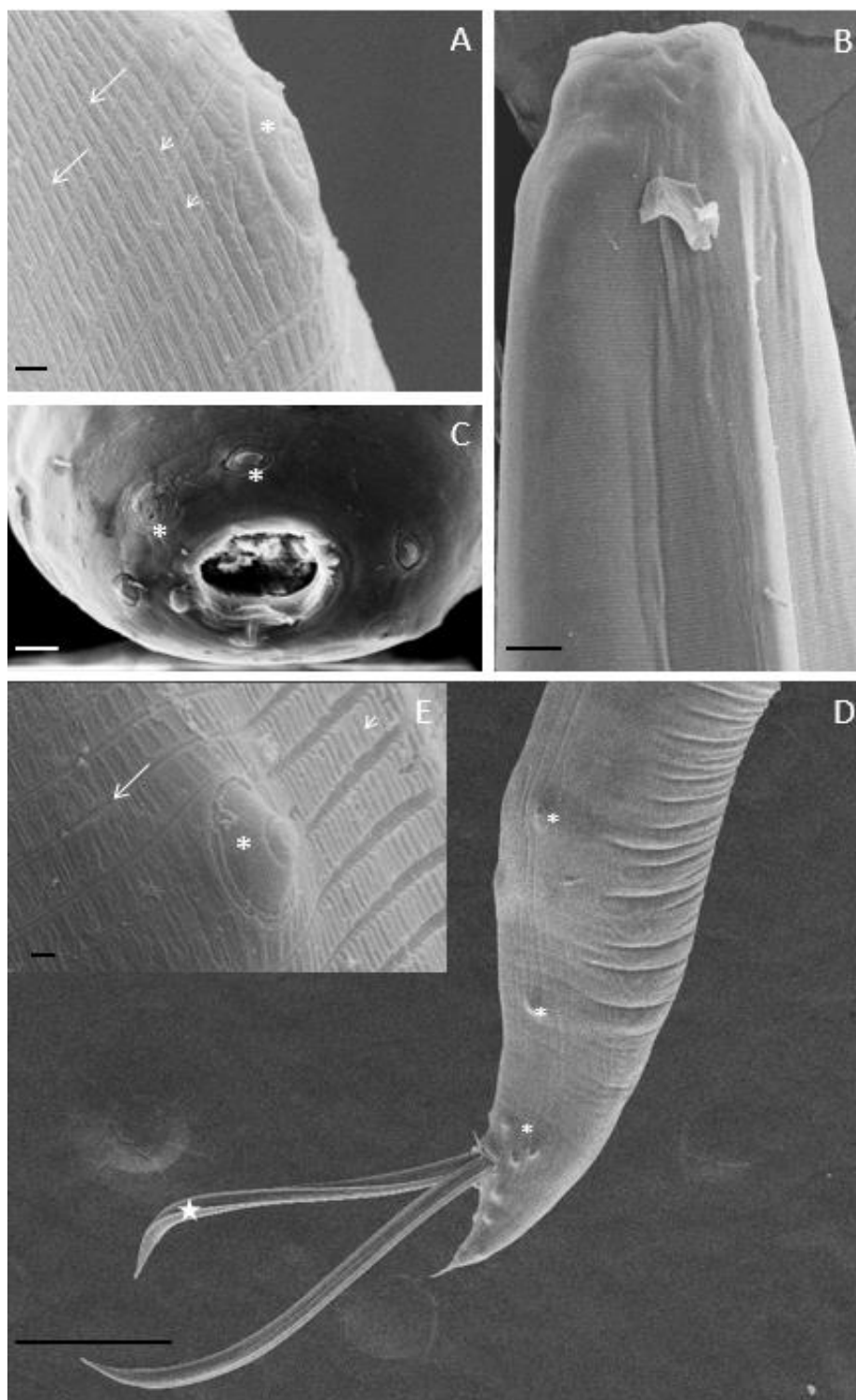


Figura 13 - Micrografias de MEV de *P. jacchi*. A) Região caudal de macho, B e D) Ventosa mostrando padrão distribuição cuticular e forma alongada longitudinalmente, C e E) Detalhe da superfície cuticular ao centro e bordas da ventosa. Barras A e D: 100  $\mu$ m, B: 20  $\mu$ m, C e E: 10  $\mu$ m. asterisco: papila genital, estrela: espículo, triangulo: apêndice caudal, seta preta: borda da ventosa, seta grossa: região central da ventosa, ponta de seta: cristas, seta branca: estriações.

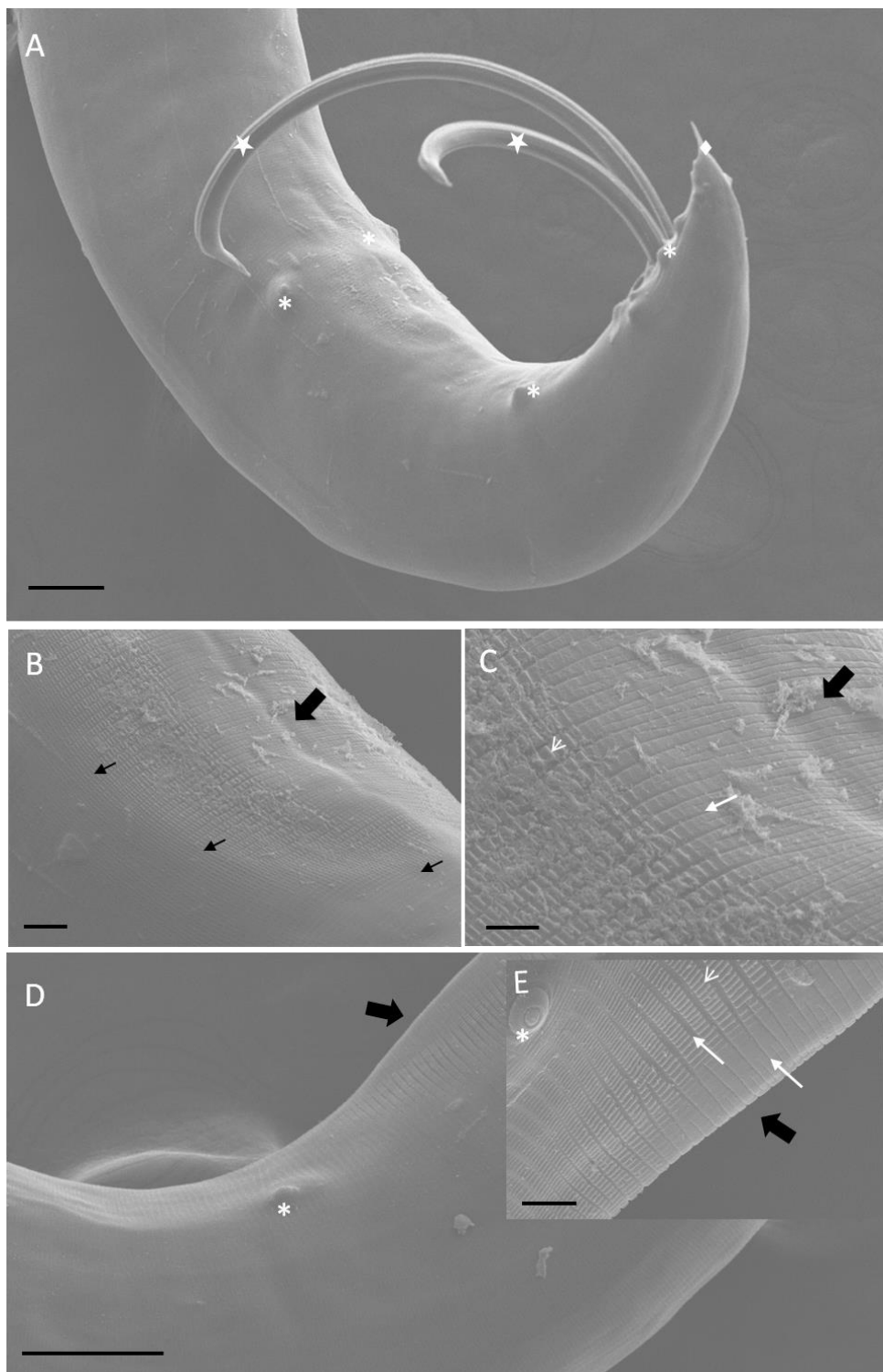
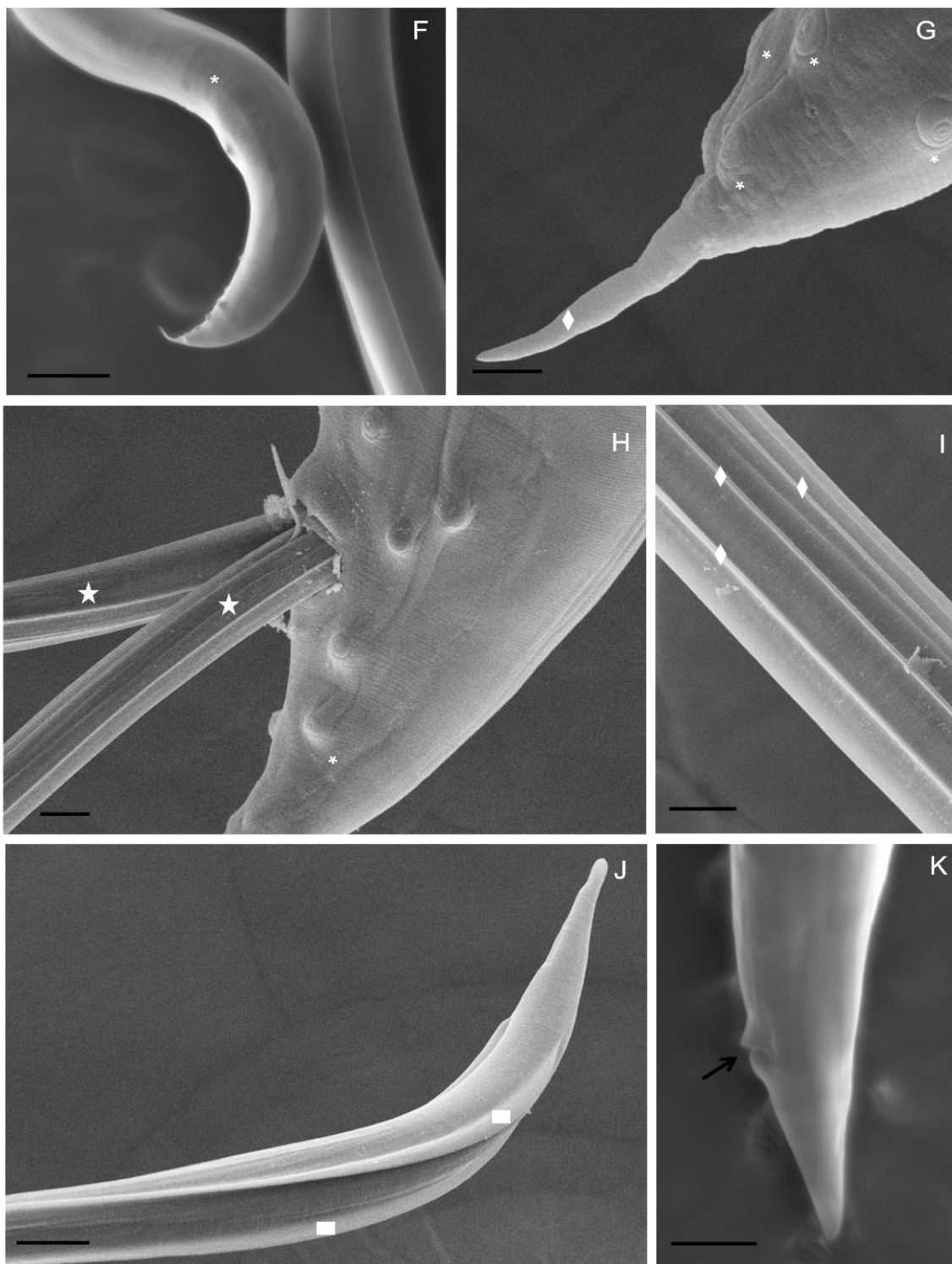


Figura 15 - Micrografias de MEV de *P. jacchi*. F) Região caudal de macho, G) apêndice caudal variou de 35- 80  $\mu\text{m}$ , possuindo extremidade distal afilada e pontiaguda. H) Detalhe da cloaca contendo espículos e papilas próximas, I) detalhe das cristas longitudinais ao longo do espículo, J) Espículos mostrando cristas terminando próximo a extremidade distal afilada com ponta arredondada, K) Região caudal de uma fêmeas mostrando o ânus. Barras H e J: 20 $\mu\text{m}$ , G e I: 10 $\mu\text{m}$ , F e K: 200 $\mu\text{m}$ , estrela: asterico: papilas, estrela: espículos, losango e quadrado: arranjo de cristas longitudinais, Seta preta: ânus.





### 6.3 ANÁLISE GENÉTICA

Inicialmente as análises moleculares foram realizadas com um pool de 10 parasitas de cada espécie: *H. contortus* (referência) e *P. jacchi*. A PCR amplificou uma banda de ~1200 pb para o *H. contortus* e ~1500 pb para o *P. jacchi* (Figura 15).

O sequenciamento da amostra referência gerou uma sequência de ~860 pb com boa qualidade, cujo BLAST confirmou a espécie *H. contortus* com 99,5% de identidade. O sequenciamento do fragmento de ~1500 pb do *P. jacchi* gerou duas sequências parciais de 450 pb e 228 pb com boa qualidade que não se sobrepunham (Figura 16). Parte da região amplificada foi perdida pela baixa qualidade da sequência gerada. O BLAST do fragmento de 450 pb foi correspondente com a espécie *Subulura chinensis* e a superfamília subuluroidea, ambos com 85% de identidade. A figura 17 mostra o alinhamento desta sequência com as sequências referências da região ITS1/2 de *Subulura chinensis* (MK770149) e da superfamília subuluroidea (MW520839). O alinhamento da sequência de 450 pb com a RefSeq da região ITS1/2 de *C. elegans* (MN519140) mostra que essa sequência cobre o final da região ITS1, todo o gene do rRNA 5.8S e boa parte do ITS2 (Figura 18).

O BLASTn do fragmento de 228 pb identificou a espécie *Subulura chinensis* (MK770149) com 75,6% de identidade. Esta região, diferentemente da de 450 pb, cobre uma parte da região do gene do rRNA 26S.

Figura 17 - PCR ITS1 e ITS2 (NC5-NC2). L- Ladder como referência, 1- *H. contortus* com temperatura a 55°C, 2- *H. contortus* com temperatura a 58°C e 3- *P. jacchi* com temperatura a 58°C. Gel de agarose. Imagem. Gel de agarose 1,5% contendo fragmentos amplificados das regiões gênicas do RNA ribossomal dos nematoides.

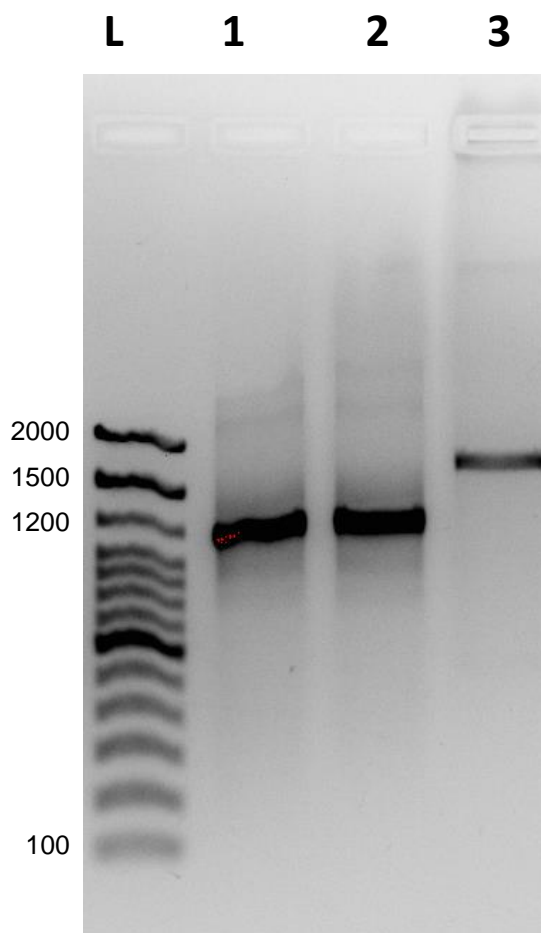


Figura 19 - Sequência de fragmento de 450 pb da região ITS1/2 do pool de *P. jacchi*. A) Sequência no formato FASTA. B) Eletroferograma da mesma região.

A >PJ\_58\_NC5\_A01\_01\_StdSeq50\_POP7\_Z.ab1

```

CTCATACCGTGCATACCATCCATTGACGAAAAGTGAGCCGTGTCGCATTCTGGCTACTTCTCAGCACTCAACATAGCGCAACACAACGGC
CCGCCTGAAAAGCGATGTTGTTGCGACTAGCGTTGAATGCTTCTGATGGTAACGTTGGTAGACAGCTGAGGTGCGTACACGTTGAGAGC
AGCCGRATGATACGTGCGCCGCTAATTTAGACGTATCGCTAGCGTTCCGGCGACTCGTTATTGGTAACAACGGTGTCCACTGTGGCGTCTACG
CCGCATCGAGCTATCTTCGGACCGTGATAGCGATGAAAGATGCGGGTTAGTCCACACTGCTGCCTGTCAAGTGTGTTGAGCAGACTTA
ATAAGCGTTCAGCTAGTGGCTGCCAGCAACCAAAACACCACAATACTATGTACAATGGTATTACCCATGTATGTATGGT

```

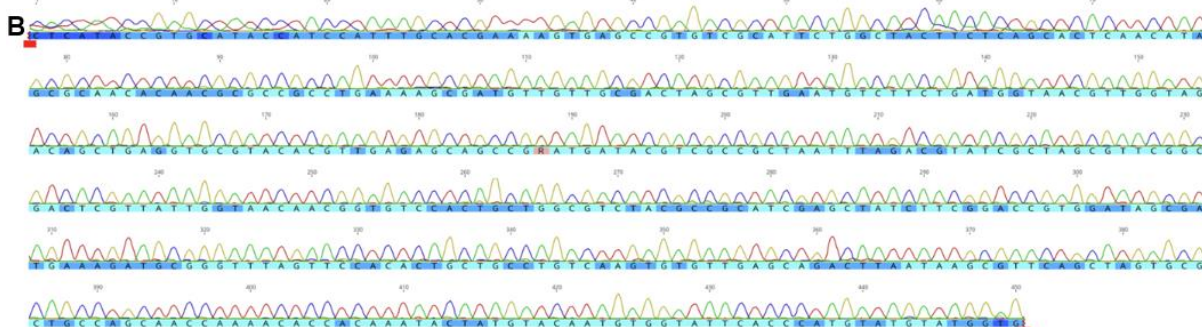


Figura 20 - Sequência de fragmento de 228 pb da região ITS1/2 do pool de *P. jacchi*. A) Sequência no formato FASTA. B) Eletroferograma da mesma região.

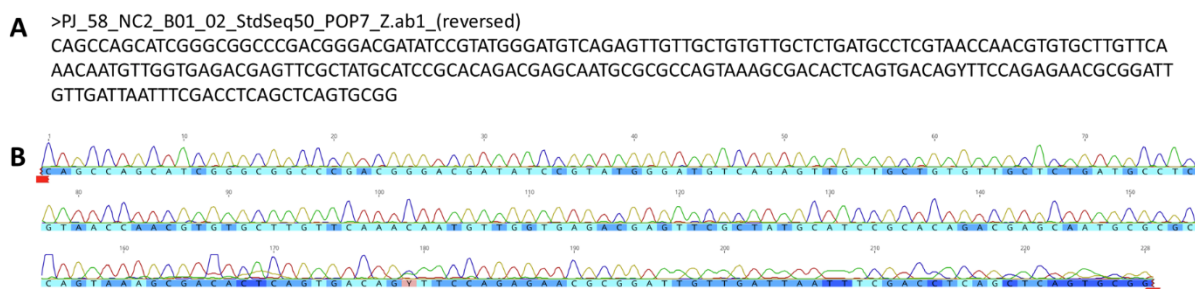


Figura 21 - Alinhamento da sequência de 450 pb com as sequências referências (RefSeq) da região ITS1/2 dos organismos com maior identidade no BLAST: A) superfamília *subuluroidea* e B) *Subulura chinensis*.

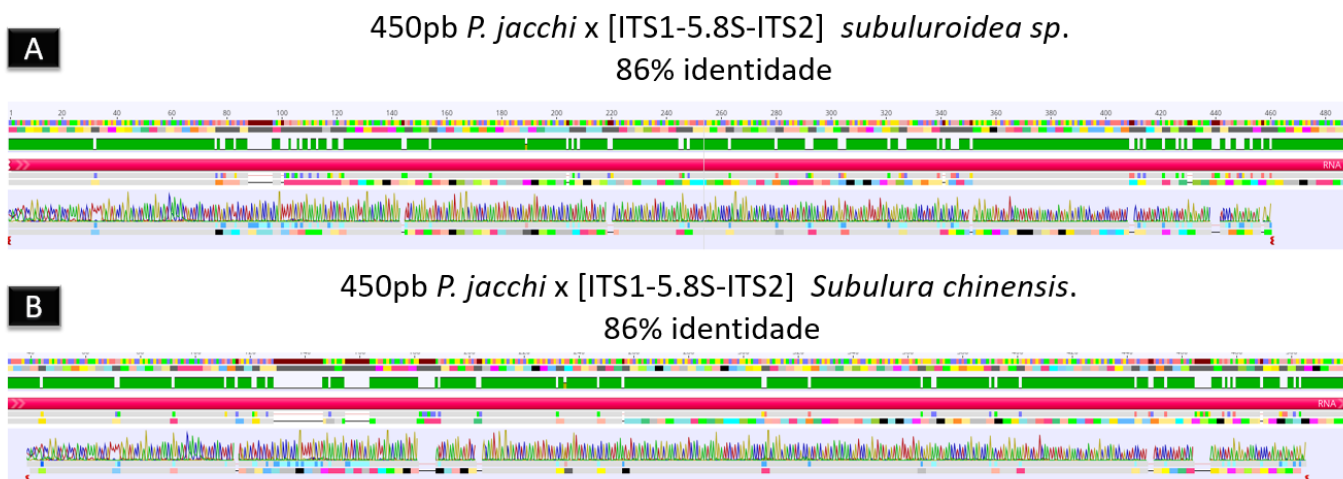


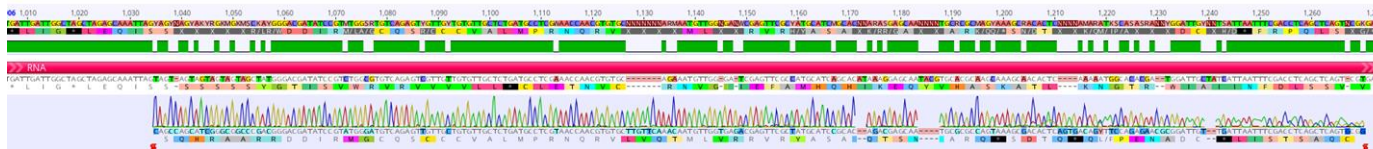
Figura 22 - Alinhamento da sequência de 450 pb de *P. jacchi* com a região ITS1-5.8S-ITS2 de *Caenorhabditis elegans*.

450pb *P. jacchi* x [ITS1-5.8S-ITS2] *C. elegans*



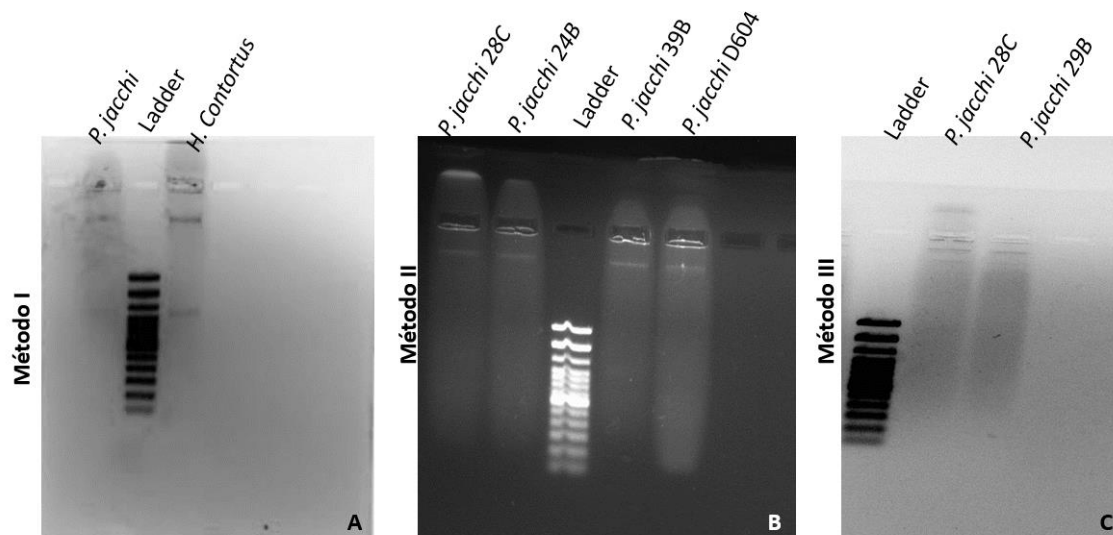
Figura 20- Alinhamento da região do rDNA 26S das espécies *P. jacchi* x *Subulura chinensis*, mostrando 88% de identidade entre as espécies.

### 228pb *P. jacchi* x [26S rDNA] *Subulura chinensis* com 88% identidade



O DNA genômico dos parasitos individuais foram extraídos usando diferentes métodos: 1) Qiamp DNA Mini kit (Qiagen); 2) Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega); 3) métodos in-house baseado em digestão com 1µl proteinase K (25 mg/ml) e 49 µl de SDS a 0.005 %, seguido de precipitação alcoólica. O método 1 purificou uma baixa quantidade de DNA de *H. contortus* e *P. jacchi*. Nas PCRs foram aplicados os volumes máximos de template, porém apenas *H. contortus* amplificou uma banda de ~1200pb. O método 2 falhou em purificar o DNA genômico dos parasitos. Já com o método 3, foram obtidas quantidades de DNA suficientes para a PCR, no entanto o excesso de SDS inibiu a amplificação. Ajustes nos métodos serão realizados para aperfeiçoar a extração e amplificação das regiões ITS1 e 2 para o posterior sequenciamento de Sanger.

Figura 25- DNA extraído pelos três métodos. A: método 1, utilizando 15  $\mu$ L de DNA para a reação. B: foi realizada a PCR do DNA extraído pelo método 2, também utilizando 15  $\mu$ L de DNA para a reação. C: foi realizada a PCR do DNA extraído pelo método 3, utilizando 7  $\mu$ L de DNA para a reação.



## 7. DISCUSSÃO

*Primasubulura jacchi* é um nematoide que foi descrito há cerca de 17 décadas originalmente como *Subulura jacchi* por MARCEL (1857) e mais tarde transferida por RAILLIET e HENRY (1913) para o gênero *Primasubulura*. Cerca de 100 anos após tal descrição, INGLIS (1958) reorganiza os membros da família subuluridae a nova classificação com base em caracteres morfológicos da região anterior destes nematoides. Neste estudo, trazemos novas informações acerca da ultraestrutura e genética que complementam as informações sobre esta espécie.

Os caracteres qualitativos apresentaram concordância com a descrição original e com SOARES et al. (2004). Da mesma forma, a maioria das medidas dos espécimes deste estudo foram compatíveis com aqueles da descrição original e com SOARES et al. (2004). Algumas medidas tais como, comprimento total de machos e fêmeas e o comprimento do esôfago foram maiores que na descrição original (Tabela 1).

Os achados para análise ultraestrutural ainda não haviam sido descritos para *P. jacchi*. Detalhes da superfície cuticular, espículos, conformação bucal e papilas genitais enriquecem os caracteres descritivos da espécie. O padrão de conformação da superfície corporal observado na ventosa se assemelha muito ao observado em algumas espécies do gênero *Subulura* (MING e ZHANG, 2010; ASHOUR e AL-GODY 2013; DU et al., 2014; DEWI et al 2018) mostrando que a nível cuticular esta estrutura corporal pode se apresentar de forma comum aos representantes destas duas subfamílias distintas.

A metodologia adotada em nosso estudo para identificação das espécies *H. contortus* e *P. jacchi* envolveu diversas etapas, desde a coleta dos parasitos até a extração do DNA, amplificação por PCR, eletroforese e análise das sequências de DNA. Inicialmente, *H. contortus* foi escolhido como referência devido à sua ampla utilização e estudo prévio, enquanto *P. jacchi* foi a espécie de interesse. Os resultados do sequenciamento de *H. contortus* revelaram uma correspondência altamente precisa com a espécie, com 99,5% de identidade confirmada pelo BLAST, demonstrando a robustez do método para esta espécie.

Por outro lado, o sequenciamento do fragmento de ~1500 pb de *P. jacchi* resultou em duas sequências parciais de 450 pb e 228 pb, ambas de boa qualidade, mas não sobrepostas. O fragmento de 450 pb mostrou uma correspondência de 85%

com a espécie *Subulura chinensis* e a superfamília *Subuluroidea*, indicando uma relação taxonômica próxima.

No contexto da genética molecular, a amplificação da região ITS1 e ITS2 foi realizada utilizando os primers NC2 e NC5, escolhidos pela sua eficácia na amplificação das regiões ITS, que incluem o ITS-1, o gene do rRNA 5.8S e o ITS-2. A análise comparativa com o estudo de NEWTON et al. (1998) que também utilizou esses primers, revelou diferenças metodológicas significativas. Enquanto Newton empregou padrões de restrição e confirmou a identidade dos produtos por hibridização, nossa abordagem priorizou o sequenciamento direto dos fragmentos amplificados seguido de análise BLAST para que assim pudéssemos obter a sequência de nossa espécie de interesse *P. jacchi*. Esta estratégia permitiu uma caracterização detalhada das sequências de ITS de *P. jacchi* e *H. contortus*, revelando fragmentos específicos que expandem a compreensão da diversidade genética dessas espécies. Em outro estudo conduzido por Gasser et al. (2001), foi destacada a sensibilidade do sequenciamento para diagnóstico e estudos epidemiológicos. Nosso estudo atual, por sua vez, concentrou-se na caracterização detalhada das sequências ITS, devido à falta de conhecimento prévio dessas sequências para uma melhor compreensão da taxonomia molecular das espécies investigadas.

Nossos resultados destacam a importância de técnicas de sequenciamento direto para uma caracterização mais precisa e detalhada das regiões ITS em nematoides parasitas. Enquanto *H. contortus* demonstrou ser uma referência bem estabelecida e altamente identificável, *P. jacchi* apresentou desafios relacionados à otimização dos métodos de extração e amplificação de DNA. A necessidade de ajustes nos métodos *in-house* para melhorar a quantidade e pureza do DNA sem inibidores foi evidenciada, sugerindo que abordagens personalizadas podem ser mais eficazes para estudos futuros.

Os próximos passos deste estudo incluem refinamentos nos métodos de extração e amplificação para aprimorar a obtenção de sequências completas e de alta qualidade das regiões ITS1 e ITS2 de *P. jacchi*. Além disso, a ausência de sequências de referência para *P. jacchi* nas bases de dados quando se refere às regiões ITS1 e ITS2, destacamos a necessidade de depositar sequências de alta qualidade para apoiar futuras pesquisas taxonômicas e epidemiológicas. Essas iniciativas são essenciais para uma compreensão mais abrangente da biodiversidade genética e evolutiva dos nematoides parasitos.

## 8. CONCLUSÃO

A pesquisa sobre *P. jacchi* fornece novas informações significativas baseadas em estudos de ultraestrutura e genética molecular. A análise morfológica confirmou a maioria das características descritas anteriormente, com algumas diferenças nas medidas dos espécimes. Notavelmente, a ultraestrutura corporal da ventosa mostrou semelhança com outras espécies do gênero *Subulura*, sugerindo características comuns entre as duas subfamílias.

Os resultados do sequenciamento do DNA revelaram variações nas regiões ITS1 e ITS2 do DNA de *P. jacchi*. Os três métodos de extração de DNA foram testados, com o método in-house apresentando maior potencial, embora necessite de otimizações. A identificação de *H. contortus* foi altamente precisa, servindo como uma referência robusta para futuras análises.

A ausência de sequências de referência para *P. jacchi* nas regiões ITS1 e ITS2 no banco de dados NCBI destaca a necessidade de mais pesquisas para a confirmação precisa dessa espécie. Em suma, enquanto *H. contortus* já está bem estabelecido como referência, *P. jacchi* requer aprimoramentos na obtenção de sequências completas e de alta qualidade para validação taxonômica.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE JG, IÑIGUEZ AM, SOUZA AN, MARQUES VC, DE SOUZA FILHO GA, SANTOS CP, DAMATTA RA. (2013). Genetic characterization of the blood-sucking nematodes *Libyostrongylus dentatus* and *Libyostrongylus douglassii* supports their different evolutionary history. *Vet Parasitol.* 2013;193:193–9.
- ANDRADE, J. G., KUMSA, B., AYANA, D., VIEIRA, R., SANTOS, C. P., IÑIGUEZ, A. M., & DAMATTA, R. A. (2018). First record of the nematode *Libyostrongylus dentatus* Hoberg, Lloyd & Omar, 1995 (Trichostrongylidae) in ostriches (*Struthio camelus* Linnaeus, 1758) (Struthionidae) outside the Americas. *Parasites and Vectors*, 11(1), 243.
- Ashour AA, Al-Gody MH. Scanning electron microscopy of *Subulura brumpti* from domestic chicken *Gallus gallus domesticus* from Taif, Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.* 2013 Apr;43(1):269-74. doi: 10.12816/0006383. PMID: 23697032.
- BALLOU, J. D., GILPIN, M. AND FOOSE, T. J. (1995) *Population management for survival and recovery; analytical methods and strategies in small population conservation*. New York. Columbia University Press.
- AMATO, J.F.R.; W. A. BOEGER & S. B. AMATO. 1991. Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado. Soropédica, Imprensa Universitária, UFRRJ. Seropédica. 81p
- BARIJAN, B. C. Diagnóstico populacional e comportamental de saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) em ambiente peri-urbano. 2013. 1 CD-ROM. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.
- BERTHET M., MESBAHI G., DUVOT G., ZUBERBUHLER K., CASAR C., BICCA MARQUES J. C. (2021). Dramatic decline in a titi monkey population after the 2016-2018 sylvatic yellow fever outbreak in Brazil. *American Journal Primatology*, e23335.
- CATENACCI, L. S., OLIVEIRA, J. B. S., De VLEESCHOUWER, K. M., OLIVEIRA, L. de C., DEEM, S. L., DE SOUSA JUNIOR, S. C., & DOS SANTOS, K. R. (2022). Gastrointestinal parasites of *Leontopithecus chrysomelas* in the Atlantic Forest, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 31(1), 1–10. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022005>.
- CHILTON NB, NEWTON LA, BEVERIDGE I, GASSER RB (2001). Evolutionary relationships of trichostrongyloid nematodes (Strongylida) inferred from ribosomal

- DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19(3), 367-386. doi: 10.1006/mpev.2001.0938. PMID: 11399147.
- COLEMAN, ANNETTE. Pan- eukaryote ITS2 homologies revealed by rna secondary structure (2007). *Nucleic Acids Reserch*.
- CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY (2020). *Global Biodiversity Outlook 5*. Montreal. 211p.
- COSTA, A.G; MIRANDA, R.R.C; SANTOS, C.P. (2022). Parasitic helminths of introduced marmosets that cohabit área of occurrence of the Golden lion tamarins in Brazil. *Nova Science Publisher* 1-68, 507-522.
- DEINHARDT, F., HOLMES, A. W., DEVINE, J., E DEINHARDT, J. (1967). Marmosets as laboratory animals. IV. The microbiology of laboratory kept marmosets. *Laboratory Animal Care*, 17, 48-70.
- DE MORAIS JR, M. M., RUIZ-MIRANDA, C. R., GRATIVOL, A. D., DE ANDRADE, C. C., LIMA, C. S., MARTINS, A., BECK B. B. (2008). Os sagüis, *Callithrix Jacchus* e *penicillata*, como espécies invasoras na região de ocorrência do mico-leão dourado In: Oliveira, P. P.; Grativol, A. D. and Ruiz-Miranda, C. R. (Orgs.) *Conservação do mico-leão-dourado: enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada*. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Centro de Biociências e Biotecnologia; Laboratório de Ciências Ambientais, p. 86-117.
- DE MORAIS JR, M. M. (2010). Os saguis (*Callithrix* spp., ERXLEBEN, 1777) exóticos invasores na bacia do rio São João, Rio de Janeiro: biologia populacional e padrão de distribuição em uma paisagem fragmentada. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense. 78 p.
- DE SOUZA, W., HADDAD, A.; SESSO, A.; WEISSMULLER, G.; ROCHA, M.G.; ATTIAS, M.; FARINA, M.; MOTTA, M.C.; MEIRELLES, M.N.; SILVEIRA, M.; BENCHIMOL, M.; MONÇORES, M.C.; SOARES, M. J.; BARTH, O. M.; ZORN, T.M.T.; SOUTO-PADRON, T.; LINS, U.C. (2007) *Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas*. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 357 pp.
- DE SOUZA, W., SESSO, A., SOUTO-PADRÓN, T., MACHADO, R.D., HADDAD, A., SILVEIRA, M. & BARTH, O.M. (1989) *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica*. Vol. I - Técnicas básicas. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 105 pp.

- DIETZ, J. M., HANKERSON, S. J., ALEXANDRE, B. R., HENRY, M. D., MARTINS, A. F., FERRAZ, L. P., RUIZ-MIRANDA, C. R. (2019). Yellow fever in Brazil threatens successful recovery of endangered golden lion tamarins. *Scientific Reports* 9: 12926.
- DEWI K, HASEGAWA H, ASAKAWA M. Redescription of *Subulura (Murisubulura) andersoni* (Cobbold, 1876) (Nematoda: Subuluridae) from *Bunomys* spp. (Rodentia: Muridae) of Sulawesi, Indonesia, with special reference to *S. (M.) suzukii* and other related species in the adjacent areas. *J Vet Med Sci.* 2018 Nov 1;80(10):1639-1645. doi: 10.1292/jvms.18-0163. Epub 2018 Aug 15. PMID: 30111686; PMCID: erbi
- DINIZ, L. S. M. (1997). Primatas em cativeiro: Manejo e Problemas Veterinários – enfoque para espécies Neotropicais – São Paulo: Ícone, 196p.
- DOBSON, A. P. (1988). Restoring Island Ecosystems: the potential of parasites to control introduced mammals. *Conservation Biology*, 2: 31-39.
- DU LQ, XU Z, LI SC, LI L. *Subulura halli* (Ascaridida: Subuluridae) from the endangered great bustard *Otis tarda* Linnaeus (Aves: Gruiformes) in China. *Folia Parasitol (Praha)*. 2014 Feb;61(1):69-75. PMID: 24684055.
- FALCÃO, B. M. R., ARAÚJO, D. V. F. de, SOUZA, J. G. DE, CARREIRO, A. DA N., OLIVEIRA, J. B. DE, ABRANTES, S. H. F., SANTOS, J. R. S. DOS, MENEZES, D. J. A. DE, & MEDEIROS, G. X. (2018). Infestação parasitária por *Spirura* sp. em *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758): relato de caso. *Pubvet*, 12(9), 1–4. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v12n9a162.1-4>
- FRITTS, T. H., RODDA, G. R. (1988). The role of introduced species in the degradation of island ecosystems. A case history of Guam. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 113-140.
- GASSER, R. B., CHILTON, N. B., HOSTE, H., BEVERIDGE I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res.* 21: 2525 –2526.
- MALUKIEWICZ, J. (2018). A Review of Experimental, Natural, and Anthropogenic Hybridization in *Callithrix* Marmosets. *International Journal of Primatology* 40: 72-98.
- MALUKIEWICZ, J., BOERE, V., FUZESSY, L. F. AND GRATIVOL, A. D., SILVA, I. O., PEREIRA, L. C. M., RUIZ-MIRANDA, C. R., VALENÇA, Y. M., STON, A. C. (2015). Natural and Anthropogenic Hybridization in Two Species of Eastern Brazilian Marmosets (*Callithrix jacchus* and *C. penicillata*). *PloS one* 10: e0127268.

- MALUKIEWICZ, J., BOERE, V., FUZESSY, L. F., GRATIVOL, A. D., PEREIRA, L. C. M., SILVA, I. O., RUIZ-MIRANDA, C. R., STONE, A. C., VALENCA, Y. M. (2013). Genetic diversity and phylogenetics of two hybridizing Atlantic Forest marmoset species, common marmosets (*Callithrix jacchus*) and black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*). *American Journal of Physical Anthropology* 150:188.
- MARTINS, S. S., FERRARI, S. F. AND SILVA, C. S. (2008). Gastro-intestinal parasites of free-ranging red-handed howlers (*Alouatta belzebul*) in Eastern Amazonia. In: *A Primatologia no Brasil* (SF Ferrari and J Rímoli, eds.). Sociedade Brasileira de Primatologia, Biologia Geral e Experimental, Sao Cristóvão, Aracajú. 114-124p.
- MARTINS, J.R.; MEDRI, I.M.; OLIVEIRA, C.M.; GUGLIELMONE, A. Ocorrência de carrapatos em Tamanduá Bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal Sul Mato-grossense, Brasil. *Ciência Rural*, v. 34(1): 293-295. 2004.
- MENEZES, J.P; LUPATINI, M; ANTONIOLLI, Z.I; BLUME, E.; JUNGES,E.; MANZONI, C.G. (2009). Variabilidade genética na região ITS do rRNA de isolados de *trichoderma spp.* (Biocontrolador) de *Fusarium oxysporum f.sp Chrysanthemi*. *Ciência agrotecnológica*.
- MING, Z., ZHANG, L. *Subulura (Murisubulura) tanjinensis* sp. nov. (Nematoda, Subuluroidea) from *Eutamias sibiricus* (Laxmann) (Rodentia) in Tianjin, China. *Acta Parasit.* **55**, 133–137 (2010). <https://doi.org/10.2478/s11686-010-0027-1>
- MONTEIRO, R. V., DIETZ, J. M., BECK, B. B., BAKER, A. J., MARTINS, A., JANSEN A. M. (2007). Prevalence and intensity of intestinal helminths found in free-ranging golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*, Primates, Callitrichidae) from Brazilian Atlantic forest. *Veterinary Parasitology* 145:77-85.
- MORAIS JR., M. M.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; GRATIVOL, A. D.; ANDRADE, C.C.; LIMA, C.S.; MARTINS, A.; BECK, B.B; Os sagüis como espécies invasoras na região de ocorrência do mico-leão dourado. *Conservação do Mico Leão-Dourado: Enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada*. Ministério do meio ambiente, 2008
- NEWTON L, CHILTON N, BEVERIDGE I, HOSTE H, NANSEN P, GASSER R. (1998). Genetic markers for strongyloid nematodes of livestock defined by PCR-based restriction analysis of spacer rDNA. *Acta Trop.* 69:1–15.
- NUNN, C., ALTIZER, S., ALTIZER, S. M. (2006). *Infectious diseases in primates: behavior, ecology and evolution*: Oxford University Press.

- PEREIRA, F. V., LUCENA, F. P., RODRIGUES, R. L., BARROS, L. A., PIRES, C. A., FERREIRA, A. M. R., & MELLO, M. F. V. (2020). Prevalência e distribuição espacial da ocorrência de helmintos em primatas não humanos de vida livre no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72(5), 1705–1712. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11868>
- POULIN, R., MORAND, S. (2004). *Parasite biodiversity*. Smithsonian Books, Washington D.C., 216 p.
- REGO, A. A.; SCHAËFFER, G. (1980). *Filariopsis barretoii* (Travassos, 1921) (Nematoda: Metastrongyloidea) lung parasite of primates from South America – taxonomy, synonyms and pathology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83: 183–188.
- RESENDE, D. M., PEREIRA L. H., MELO, A. L., TAFURI, W. L., MOREIRA, N. I. B., OLIVEIRA, C. L. (1994). Parasitism by *Primasubulura jacchi* (Marcel, 1857) Inglis 1958 and *Trichospirura leptostoma* (Smith and Chitwood, 1967) in *Callithrix penicillata* Marmosets, trapped in the wild environment and maintained in captivity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 123–125.
- RUIZ-MIRANDA, C. R., AFFONSO, A. G., MARTINS, A., BECK, B. B. (2000). Distribuição do sagüi (*Callithrix jacchus*) nas áreas de ocorrência do mico leão dourado no Estado de Rio de Janeiro. *Neotropical Primates* 8:98-101.
- RUIZ MIRANDA, C. R., AFFONSO, A. G., DE MORAIS, M. M., VERONA, C. E., MARTINS, A., BECK, B. B. (2006). Behavioral and Ecological Interactions between Reintroduced Golden Lion Tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) and Introduced Marmosets (*Callithrix* spp, Linnaeus, 1758) in Brazil's Atlantic Coast Forest Fragments. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49:99-109.
- RUIZ MIRANDA, C. R., DE MORAIS JR, M. M., DE PAULA V. R., GRATIVOL, A. D., RAMBALDI D. M. (2011). O problema dos saguis introduzidos no Rio de Janeiro: vítimas ou vilões? *Ciência Hoje* 48:44-49.
- RYLANDS, A. B., FARIA, D. S. (1993). Habitats, feeding ecology, and homerange size in the genus *Callithrix*. In: Rylands AB, editor. *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology*. Oxford: Oxford University Press. p 262-272.
- SALES, I. S. (2015). Avaliação da sanidade e da microbiota de híbridos de saguis (*Callithrix* sp.) e mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) de vida livre no estado do Rio de Janeiro. 2015. 108f [Doctoral]. Campos dos Goytacazes: Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Universidade Estadual do Norte Fluminense.

- SALES, I. S., RUIZ-MIRANDA, C. R., SANTOS, C. P. (2010). Helminths found in marmosets (*Callithrix penicillata* and *Callithrix jacchus*) introduced to the region of occurrence of golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*) in Brazil. *Veterinary Parasitology* 171:123-129.
- SANTOS, C. V., DE MORAIS JR, M. M., OLIVEIRA, M. M., MIKICH, S. B. AND RUIZ-MIRANDA, C. R. 2007. Ecologia, comportamento e manejo de primatas invasores e populações-problema. In: Bicca-Marques J, editor. A primatologia no Brasil, vol 10. Porto Alegre, Brazil: Sociedade Brasileira de Primatologia. p101-118.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SERRAVALLE, A. Vocabulário de parasitologia médica. Salvador, Centro Editorial e Didático da UFBA., 1987. 164 P.
- SILVA, F., MALUKIEWICZ, J., SILVA, L., CARVALHO, R. S., RUIZ-MIRANDA, C. R., COELHO, F. A. S., FIGUEIRA, M. P., BOERE, V., SILVA, I. O. (2018). A survey of wild and introduced marmosets (*Callithrix*: Callitrichidae) in southern and eastern portions of the State of Minas Gerais, Brazil. *Primate Conservation*, 32:1-18.
- SOLÓRZANO-GARCÍA, B., PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. (2018). Parasites of Neotropical Primates: A Review. *International Journal of Primatology*, 39:155-182.
- SOUZA, G. V., SENNA, C. C., SALES, I. S., SARMIENTO-LIMA, C., SANTOS, C. P., ALMEIDA, A. AND RUIZ-MIRANDA, C. R. (2004). Ectoparasitas de saguis (*Callithrix* spp) de vida livre no entorno da reserva biológica de poco das antas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, suplemento 13: 326.
- STONER, K. (1996). Prevalence and Intensity of Intestinal Parasites in Mantled Howling Monkeys (*Alouatta palliata*) in Northeastern Costa Rica: Implications for Conservation Biology. *Conservation biology*, 10: 539-546.
- TAMURA K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725–2729.
- TAVELA, A. DE O., FUZESSY, L. F., SILVA, V. H. D. e., SILVA, F. DE F. R. DA, JUNIOR, M. C., Silva, I. DE O., & SOUZA, V. B. (2013). Helminths of wild hybrid marmosets (*Callithrix* sp.) living in an environment with high human activity. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 22(3), 391–397. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000300012>
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.

VALE, C., PREZOTO, F. (2015). Invasões biológicas: O caso do mico estrela (*Callithrix penicillata*). *CES REVISTA*, 29, 58–76.

XIMENES, M. F. F. M. (1997). Parasitismo por helmintos e protozoários no sagüi-comum (*Callithrix jacchus*). In: *A primatologia no brasil*, 6, 1997, natal. anais... natal: sociedade brasileira de primatologia, p. 249–256.

WOODROFFE, R. , GINSBERG, J. R. (1998). Edge effects and the extinction of populations inside protected areas. *Sciense*, 280: 2126-2128.