Caracterização molecular da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do nematóide *Primasubulura jacchi* obtido de saguis híbridos (*Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus*) da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/ Mico-leão-dourado

JÚLIO CÉZAR ROSA DE SOUZA JUNIOR

Campos dos Goytacazes, RJ
Fevereiro – 2026

Caracterização molecular da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do nematóide *Primasubulura jacchi* obtido de saguis híbridos (*Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus*) da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/ Mico-leão-dourado

JÚLIO CÉZAR ROSA DE SOUZA JUNIOR

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. Glauber Monteiro Dias

Campos dos Goytacazes, RJ
Fevereiro – 2026

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

S729 Souza Júnior, Júlio Cezar Rosa de.

Caracterização molecular da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do nematóide Primasubulura jacchi obtido de saguis híbridos (*Callithrix penicillata x Callithrix jacchus*) da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/ Mico-leão-dourado / Júlio Cezar Rosa de Souza Júnior. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

51 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.
Orientador: Glauber Monteiro Dias.

1. *Primasubulura jacchi*. 2. ITS2. 3. Filogenia . 4. Primatas neotropicais. 5. Parasitologia. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

Caracterização molecular da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do nematóide *Primasubulura jacchi* obtido de saguis híbridos (*Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus*) da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/ Mico-leão-dourado

JÚLIO CÉZAR ROSA DE SOUZA JUNIOR

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.

Aprovado em 23 de fevereiro de 2026.

Banca examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
BIANCA CARDOZO AFONSO
Data: 09/07/2026 07:46:18-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Bianca Cardozo Afonso – (Doutora em Ciência Animal) - IFRO

Edwards Frazão Teixeira – (Doutor em Ciência Animal) - FIOCRUZ gov.br Documento assinado digitalmente
EDWARDS FRAZAO TEIXEIRA
Data: 09/07/2026 08:40:38-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Renato Augusto DaMatta – (Doutor em ciências Biológicas) - UENF gov.br Documento assinado digitalmente
RENATO AUGUSTO DA MATTA
Data: 13/07/2026 16:43:09-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Glauber Monteiro Dias – (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF (Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, razão maior de tudo.
Por ter sido presença constante quando as respostas faltaram, por sustentar minha fé nos dias de silêncio e por me lembrar, em cada etapa, que propósito vale mais do que pressa. Nada do que foi construído aqui caminha fora da Sua vontade.

Aos meus pais, por tudo o que sou.
Nada veio pronto; foi construído com exemplo, constância e verdade. Aprendi que o caráter sustenta aquilo que o talento começa, que o respeito abre portas e que confiar em si mesmo é um exercício diário. Se hoje sigo em frente com firmeza, é porque fui preparado para enfrentar, e não apenas para vencer.

À minha noiva e breve futura esposa, Dra. Letícia Fontes,
por caminhar comigo com paciência, amor e firmeza. Por compreender ausências, dividir angústias, celebrar conquistas e ser abrigo nos dias difíceis. Sua presença tornou o percurso mais leve e mais significativo.

Aos meus irmãos na fé, pelo apoio, orações e comunhão.
“É melhor serem dois do que um... porque, se um cair, o outro levanta o seu companheiro” (Eclesiastes 4:9–10). Obrigado por me lembrarem que a caminhada não precisa ser solitária.

Aos meus amigos, pela presença, pelas conversas e pelo apoio constante. Caminhar acompanhado torna o percurso mais leve e mais humano.

À Bianca, à Jeanne e aos demais professores colaboradores, pela disponibilidade, contribuições acadêmicas e apoio ao longo deste percurso, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Glauber, pela confiança, orientação e compromisso com a ciência, essenciais para minha formação acadêmica.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela estrutura e ambiente acadêmico proporcionados.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro que viabilizou este trabalho.

RESUMO

O conhecimento sobre endoparasitas de animais de vida livre ainda é limitado devido à dificuldade de acesso aos hospedeiros, à sazonalidade na eliminação de ovos e à ausência de características morfológicas espécie-específicas. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar, por meio de análise molecular e filogenética, parasitas intestinais obtidos durante necropsias de saguis híbridos (Callithrix penicillata × Callithrix jacchus) provenientes da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado. Protocolos convencionais de amplificação da região ITS não foram inicialmente eficazes, sendo necessárias etapas de otimização, incluindo ajustes nas condições de PCR e uso de enzimas de alta fidelidade. A utilização da enzima Platinum SuperFi II possibilitou a obtenção de fragmentos entre 406 e 466 pares de bases, com qualidade adequada para análises moleculares. A análise filogenética baseada na região ITS2, conduzida pelo método de Máxima Verossimilhança sob o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P), revelou agrupamentos biologicamente coerentes, sustentados por valores de bootstrap moderados a elevados. As sequências dos isolados PJ39B e PJ24C58 agruparam-se próximas a representantes da família Subuluridae, corroborando a identificação morfológica previamente realizada. Não foi observada correspondência direta com sequências disponíveis em bancos de dados públicos, evidenciando a escassez de registros moleculares para o grupo. Assim, este estudo amplia o conhecimento molecular sobre nematódeos associados a primatas neotropicais e contribui para a caracterização genética de espécimes morfologicamente compatíveis com Primasubulura jacchi.

Palavras-chave: *Primasubulura jacchi*; ITS2; filogenia; primatas neotropicais; parasitologia.

ABSTRACT

Knowledge regarding endoparasites of free-ranging animals remains limited due to difficulties in host access, seasonal variation in egg shedding, and the lack of species-specific morphological characteristics. In this context, the present study aimed to identify intestinal parasites obtained during necropsies of hybrid marmosets (Callithrix penicillata × Callithrix jacchus) from the Environmental Protection Area of the Rio São João Basin/Golden Lion Tamarin Reserve through molecular and phylogenetic analyses. Conventional amplification protocols targeting the ITS region were initially unsuccessful, requiring optimization steps, including adjustments to PCR conditions and the use of high-fidelity enzymes. The use of Platinum SuperFi II polymerase enabled the amplification of fragments ranging from 406 to 466 base pairs with suitable quality for molecular analyses. Phylogenetic analysis based on the ITS2 region, inferred using the Maximum Likelihood method under the Kimura 2-parameter (K2P) model, revealed biologically coherent groupings supported by moderate to high bootstrap values. Sequences from isolates PJ39B and PJ24C58 clustered close to representatives of the Subuluridae family, corroborating the previous morphological identification. No direct correspondence with sequences available in public databases was observed, highlighting the scarcity of molecular records for this group. Therefore, this study expands the molecular knowledge of nematodes associated with Neotropical primates and contributes to the genetic characterization of specimens morphologically compatible with Primasubulura jacchi.

Keywords: *Primasubulura jacchi*; ITS2; phylogeny; Neotropical primates; parasitology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécies de primatas registradas na Mata Atlântica 14

Figura 2. Mapa da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado 16

Figura 3. Ciclo de vida de Primasubulura jacchi 19

Figura 4. Componentes da região do DNA ribossomal (rDNA) 22

Figura 5. Características morfológicas de Primasubulura jacchi 27

Figura 6. Detalhes morfológicos de Primasubulura jacchi 27

Figura 7. Procedimentos de coleta e visualização macroscópica de endoparasitas 29

Figura 8. Representação esquemática da região do DNA ribossomal (rDNA) 34

Figura 9. Amplificação por PCR de regiões ITS 1/2 do parasita PJ 38

Figura 10. Amplificação por PCR das regiões ITS1 e ITS2 em diferentes amostras 38

Figura 11. Amplificação por PCR de diferentes regiões gênicas do parasita PJ 39

Figura 12. Amplificação por PCR da região ITS utilizando combinações de primers 40

Figura 13. Alinhamento múltiplo das sequências da região ITS2 44

Figura 14. Árvore filogenética inferida pelo método de Máxima Verossimilhança 45

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Sequências de DNA de representantes da superfamília Subuluroidea disponíveis no banco de dados GenBank e utilizadas como referência comparativa para análises moleculares e filogenéticas neste estudo..... 26
Tabela 2. Caracteres morfométricos de machos e fêmeas de *Primasubulura jacchi* obtidos por microscopia óptica e comparados com dados da literatura..... 29
Tabela 3. Condições da reação de PCR convencional para amplificação da região ITS..... 33
Tabela 4. Comparação das condições de PCR utilizando Master Mix com PCR Enhancer para amplificação da região ITS..... 34
Tabela 5. Condições das reações de PCR utilizando Platinum Superfi II DNA polymerase..... 34
Tabela 6. Primers utilizados na reação de PCR..... 35
Tabela 7. Programa 1 – Platinum Taq Pol 58..... 35
Tabela 8. Programa 2 – NC2–NC5..... 36
Tabela 9. Programa 3 – ITS-1..... 36
Tabela 10. Programa 4 – SuperFi II DNA polymerase..... 36
Tabela 11. Programa 5 – touchdown PCR (68–58°c)..... 36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 11

2. REFERENCIAL TEÓRICO..... 13

2.1 Espécies da Mata Atlântica..... 13

2.2 Área de estudo: APA da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado..... 15

2.3 Ecologia parasitária de saguis híbridos em ambientes fragmentados..... 17

2.4 Helmintos intestinais em primatas neotropicais..... 18

2.5 O gênero Primasubulura e a espécie Primasubulura jacchi..... 19

2.6 Limitações da identificação morfológica em nematódeos..... 21

2.7 A região ITS como marcador molecular em nematódeos..... 21

2.8 Importância da caracterização molecular de Primasubulura jacchi..... 25

2.9 Aspectos morfológicos de Primasubulura jacchi..... 26

3. OBJETIVOS..... 29

3.1 Objetivo geral..... 29

3.2 Objetivos específicos..... 29

4. METODOLOGIA..... 29

4.1 Origem das amostras..... 29

4.2 Extração de DNA..... 30

4.3 Amplificação por PCR..... 32

4.3.1 Master mix utilizados na PCR..... 33

4.3.2 Primers utilizados na reação de PCR..... 34

4.3.3 Programas de PCR utilizados para amplificar as regiões ITS e COI..... 35

4.4 Sequenciamento de Sanger..... 37

4.5 Análise Filogenética..... 38

5. RESULTADOS..... 38

5.1 Otimização do protocolo de amplificação da região ITS..... 38

5.2 Sequenciamento e caracterização molecular..... 42

5.3 Análise filogenética..... 44

6. DISCUSSÃO..... 45

6.1 Aplicação molecular na identificação de helmintos..... 45

6.2 Análise filogenética de Primasubulura jacchi..... 46

6.3 Contexto ecológico e implicações parasitológicas..... 47

6.4 Integração entre dados moleculares e morfológicos..... 48

6.5 Limitações do estudo..... 48

6.6 Perspectivas futuras..... 49

7. CONCLUSÃO..... 49

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 50

1. INTRODUÇÃO

A diversidade parasitária em primatas neotropicais constitui um campo ainda marcado por lacunas relevantes, especialmente no que se refere à caracterização taxonômica e molecular de helmintos intestinais. Embora levantamentos parasitológicos tenham registrado uma ampla variedade de espécies associadas a esses hospedeiros, a identificação em nível específico permanece frequentemente limitada pela dependência de caracteres morfológicos, os quais nem sempre permitem a distinção entre táxons próximos ou são prejudicados pela conservação inadequada dos espécimes (Anderson, 2000; Gasser et al., 1993; Blouin, 2002).

Entre os primatas neotropicais, espécies do gênero Callithrix têm sido amplamente estudadas em função de sua plasticidade ecológica e de sua capacidade de ocupar ambientes antropizados (Rylands & Mittermeier, 2009). No estado do Rio de Janeiro, populações de *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* foram introduzidas fora de suas áreas de distribuição natural, estabelecendo populações híbridas que se dispersaram em diferentes fragmentos da Mata Atlântica (Rylands & Mittermeier, 2009). Essas populações apresentam elevada densidade e capacidade de exploração de recursos, características que favorecem sua permanência e expansão em ambientes modificados (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018).

A Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado insere-se nesse contexto como um mosaico de fragmentos florestais submetidos a diferentes níveis de perturbação antrópica. A paisagem local é caracterizada pela presença de remanescentes florestais inseridos em uma matriz composta predominantemente por áreas de pastagem e outras formas de uso do solo, refletindo um histórico de alterações ambientais que influenciam diretamente a dinâmica ecológica da região (Brasil, 2002; Ruiz-Miranda et al., 2006). Esse cenário favorece o contato entre hospedeiros, o ambiente e possíveis hospedeiros intermediários, contribuindo para a manutenção de ciclos parasitários (Nunn & Altizer, 2006).

Nesse ambiente, saguis híbridos apresentam elevada capacidade de adaptação e desempenham papel relevante na manutenção de comunidades parasitárias. A combinação entre hábitos alimentares generalistas, incluindo o

consumo de artrópodes, e o uso intensivo do substrato florestal favorece a exposição a estágios infectantes de helmintos, especialmente aqueles com ciclos de vida indiretos (Rylands & Mittermeier, 2009; Anderson, 2000). Como consequência, esses primatas podem atuar como reservatórios de endoparasitos, contribuindo para sua persistência e circulação no ambiente (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018).

Entre os helmintos registrados em saguis, os nematódeos destacam-se pela frequência de ocorrência, sendo frequentemente observados em levantamentos parasitológicos realizados em diferentes regiões (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018). Dentre esses, *Primasubulura jacchi* tem sido consistentemente reportado como uma das espécies mais comuns, parasitando o trato intestinal de hospedeiros do gênero Callithrix (Resende et al., 1994). Apesar de sua ampla distribuição, o conhecimento sobre essa espécie ainda é predominantemente baseado em descrições morfológicas, com limitada disponibilidade de dados moleculares que permitam sua caracterização genética e comparação entre populações (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018; Blouin, 2002).

A identificação morfológica de nematódeos, embora fundamental, apresenta limitações reconhecidas, especialmente em casos de espécimes danificados, estágios imaturos ou espécies com características sobrepostas (Anderson, 2000; Gasser et al., 1993). Nesse contexto, a utilização de marcadores moleculares tem se consolidado como uma abordagem essencial para a delimitação taxonômica e para a compreensão das relações evolutivas entre os organismos (Blouin, 2002).

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal destaca-se como um dos marcadores mais amplamente utilizados em estudos de identificação e filogenia de helmintos. Composta pelos espaçadores ITS1 e ITS2, localizados entre os genes 18S, 5.8S e 28S, essa região apresenta elevada variabilidade entre espécies, ao mesmo tempo em que mantém regiões conservadas que permitem sua amplificação por PCR (Hillis & Dixon, 1991; Gasser et al., 1993). Essas características tornam a região ITS particularmente adequada para a diferenciação de espécies próximas e para a inferência de relações filogenéticas (Blouin, 2002).

Apesar de sua ampla aplicação, a disponibilidade de sequências da região ITS para nematódeos associados a primatas neotropicais ainda é limitada, especialmente para espécies como *Primasubulura jacchi*, o que restringe análises comparativas mais abrangentes e evidencia a necessidade de estudos que ampliem

os dados moleculares disponíveis (Blouin, 2002; Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018).

Diante desse cenário, o presente estudo se propõe a realizar a caracterização molecular da região ITS do nematódeo *Primasubulura jacchi* obtido de saguis híbridos (*Callithrix penicillata* × *Callithrix jacchus*) provenientes da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, com o objetivo de contribuir para o conhecimento da diversidade genética dessa espécie e para sua inserção em análises filogenéticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécies da Mata Atlântica

Na região da Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil, são reconhecidas seis espécies de primatas nativos — *Leontopithecus rosalia*, *Callithrix aurita*, *Alouatta guariba clamitans*, *Callicebus nigrifrons*, *Sapajus nigritus* e *Brachyteles arachnoides* além de duas espécies introduzidas de saguis, *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* (ICMBio, 2018) (Figura 1). Dentre essas, ao menos quatro espécies nativas encontram-se sob ameaça significativa de extinção, em decorrência da perda e fragmentação de habitat, tendo suas populações recentemente impactadas por surtos de febre amarela, o que resultou em declínios expressivos (Dietz et al., 2019; Berthet et al., 2021).

Esses fatores contribuíram para a formação de populações reduzidas e vulneráveis a eventos estocásticos, como epidemias e incêndios, além de aumentarem a suscetibilidade aos impactos de espécies exóticas invasoras, incluindo competição, predação e disseminação de patógenos (Ballou et al., 1995; Dobson, 1988; Fritts & Rodda, 1998; Woodroffe & Ginsberg, 1998). Nesse contexto, espécies invasoras são reconhecidas como uma das principais causas de perda de biodiversidade em escala global (CDB, 2020; Vitousek et al., 1997; Simberloff et al., 2013).

As populações introduzidas de *C. jacchus* e *C. penicillata*, bem como seus híbridos férteis, estão amplamente distribuídas na Mata Atlântica em decorrência do tráfico ilegal de fauna e de solturas acidentais ou deliberadas, apresentando elevado sucesso ecológico e representando ameaça direta aos calitriquídeos nativos, devido à

sobreposição de nicho ecológico e à facilitação da transmissão de doenças (Ruiz-Miranda et al., 2000; Malukiewicz et al., 2013; 2015; Santos et al., 2007; Silva et al., 2018; Nunn et al., 2006; Rylands & Faria, 1993).

Na APA da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, única área de ocorrência de *L. rosalia*, essas espécies foram introduzidas há mais de três décadas, estabelecendo populações híbridas cujo tamanho pode igualar ou até superar o da espécie endêmica ameaçada (Ruiz-Miranda et al., 2000; de Morais Júnior et al., 2008; 2010; Malukiewicz et al., 2013; 2015).

De forma geral, espécies exóticas invasoras são definidas como organismos introduzidos fora de sua área de distribuição natural que conseguem se estabelecer, se dispersar e causar impactos negativos sobre ecossistemas, biodiversidade e saúde pública, atuando por meio de mecanismos como competição por recursos, alteração de habitats, hibridização e disseminação de parasitos e patógenos (Vitousek et al., 1997; Simberloff et al., 2013; CDB, 2020). Em ecossistemas altamente fragmentados, como a Mata Atlântica, esses efeitos são potencializados, agravando o risco para espécies nativas e reforçando a relevância ecológica do estudo de interações hospedeiro-parasito nesse contexto.



Figura 1. Espécies de primatas registradas na Mata Atlântica. São apresentadas espécies nativas, incluindo o mico-leão-dourado (Leontopithecus rosalia), muriqui-do-sul (Brachyteles arachnoides), bugio-ruivo (Alouatta guariba clamitans), sauá (Callicebus nigrifrons), macaco-prego (Sapajus nigritus) e sagui-caveirinha (Callithrix aurita). As espécies invasoras do gênero Callithrix — sagui-de-tufo-preto (Callithrix penicillata) e sagui-de-tufo-branco (Callithrix jacchus) — estão destacadas pelo quadrado vermelho.

2.2 Área de estudo: APA da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado

A APA da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado está localizada no estado do Rio de Janeiro e constitui uma das principais unidades de conservação da Mata Atlântica voltadas à proteção de ecossistemas costeiros e de espécies ameaçadas (Brasil, 2002) (Figura 2). Criada com o objetivo de promover o uso sustentável dos recursos naturais e conservar a biodiversidade regional, a APA abrange municípios inseridos em uma paisagem caracterizada por intensa fragmentação florestal e histórico de ocupação antrópica (Brasil, 2002; Kierulff et al., 2012).

A região apresenta um mosaico de remanescentes de Floresta Atlântica intercalados com áreas de pastagem, agricultura e ocupação urbana, refletindo um longo processo de degradação ambiental (Brasil, 2002; Rocha et al., 2003). Esse cenário influencia diretamente a dinâmica ecológica das populações de vertebrados, incluindo primatas, ao modificar padrões de distribuição, disponibilidade de recursos e interação entre espécies (Fahrig, 2003; Haddad et al., 2015).

A APA da Bacia do Rio São João destaca-se por abrigar a maior e mais importante população remanescente do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), espécie endêmica da Mata Atlântica e classificada como ameaçada de extinção (Rylands et al., 2002). Programas de conservação implementados na região têm contribuído para a recuperação populacional dessa espécie, incluindo ações de reflorestamento, manejo de habitat e monitoramento de populações (Kierulff et al., 2012; Ruiz-Miranda et al., 2019).

Entretanto, a introdução de espécies exóticas, como os saguis do gênero *Callithrix*, representa um dos principais desafios para a conservação da biodiversidade local (Ruiz-Miranda et al., 2000). Populações de *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*, bem como seus híbridos, encontram-se amplamente distribuídas na APA, competindo com espécies nativas por recursos e atuando como potenciais vetores de patógenos e parasitos (Malukiewicz et al., 2015; Nunn & Altizer, 2006). Além disso, a fragmentação do habitat e a redução da conectividade entre áreas florestais favorecem o aumento do contato entre indivíduos e espécies, o que pode intensificar a transmissão de parasitos e influenciar a estrutura das comunidades parasitárias (Nunn & Altizer, 2006). Nesse contexto, a APA da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado configura-se como um ambiente de grande

relevância para estudos ecológicos e parasitológicos, especialmente aqueles voltados à compreensão das interações entre hospedeiros e parasitos em ambientes fragmentados.

Dessa forma, investigações conduzidas nessa região contribuem não apenas para o conhecimento da biodiversidade parasitária associada a primatas neotropicais, mas também para a compreensão dos impactos de mudanças ambientais sobre a dinâmica de transmissão de parasitos, fornecendo subsídios importantes para estratégias de conservação.

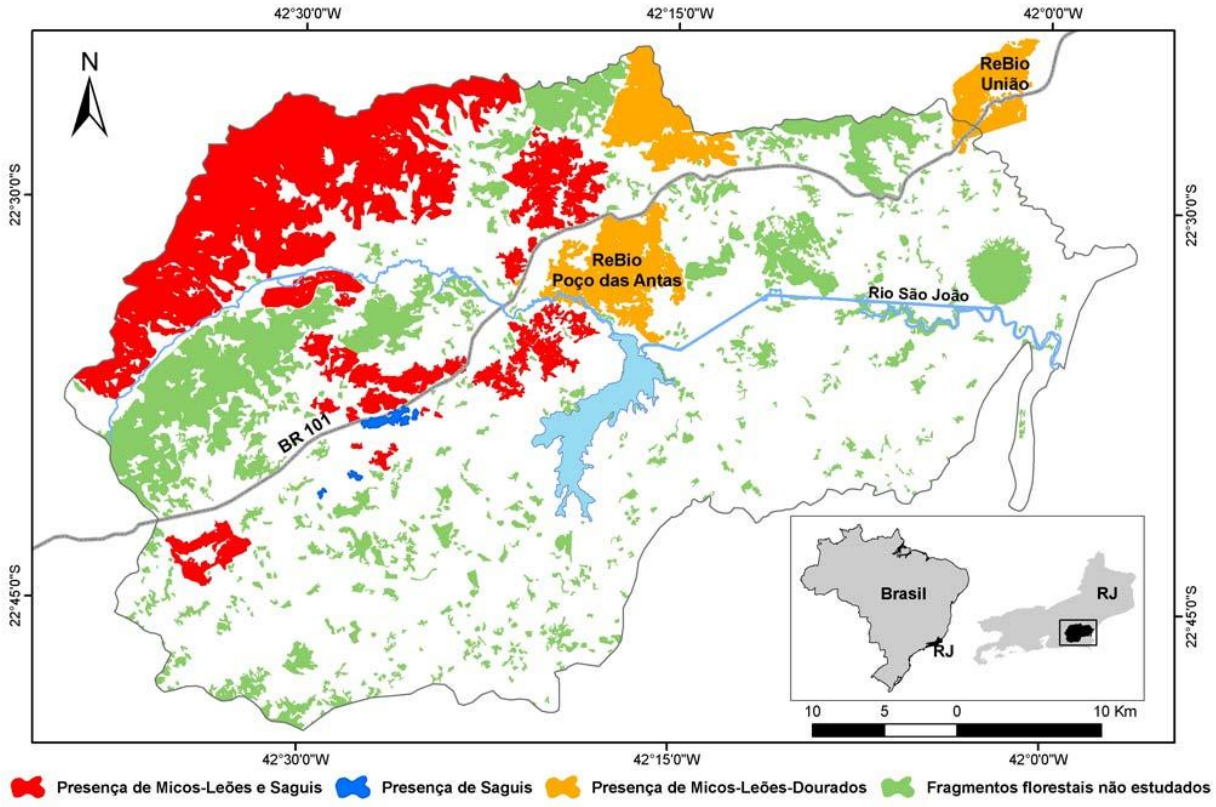


Figura 2. Mapa da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado (RJ), evidenciando a distribuição de primatas e fragmentos florestais na região. As áreas em vermelho indicam a ocorrência de micos-leões e saguis, em azul a presença de saguis, em amarelo a ocorrência de micos-leões-dourados e em verde os fragmentos florestais não estudados. Destacam-se as unidades de conservação Rebio Poço das Antas e Rebio União, bem como o curso do rio São João. Fonte: Laboratório de Ciências Ambientais/UENF.

2.3 Ecologia parasitária de saguis híbridos em ambientes fragmentados

A introdução de espécies do gênero Callithrix fora de suas áreas de distribuição natural resultou no estabelecimento de populações híbridas em diferentes regiões da Mata Atlântica, particularmente no sudeste do Brasil (Rylands & Mittermeier, 2009). Essas populações apresentam elevada plasticidade ecológica,

o que lhes permite explorar ambientes altamente modificados e manter densidades populacionais relativamente altas (Rylands & Faria, 1993; Malukiewicz et al., 2015).

Esse cenário influencia diretamente a dinâmica ecológica das populações de primatas e de seus parasitos, promovendo maior contato entre indivíduos, aumento da sobreposição de áreas de uso e maior interação com o ambiente.

A fragmentação do habitat pode afetar tanto a diversidade quanto a prevalência de parasitos, uma vez que altera a disponibilidade de hospedeiros intermediários e as condições ambientais necessárias para a sobrevivência dos estágios infectantes (Nunn & Altizer, 2006). Em ambientes fragmentados, a concentração de indivíduos em áreas reduzidas pode favorecer a transmissão de parasitos, contribuindo para o aumento da carga parasitária nas populações.

Saguis híbridos, ao explorarem intensamente o ambiente e apresentarem comportamento oportunista, podem atuar como importantes reservatórios de helmintos intestinais. Sua dieta, que inclui a ingestão frequente de artrópodes, favorece a infecção por nematódeos com ciclo indireto, enquanto sua capacidade de adaptação a ambientes alterados contribui para a manutenção desses parasitos ao longo do tempo (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018).

2.4 Helmintos intestinais em primatas neotropicais

Os helmintos intestinais constituem um dos componentes mais representativos da fauna parasitária de primatas neotropicais, sendo amplamente registrados em estudos conduzidos em diferentes regiões da América Latina (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018). Esses organismos desempenham papel relevante na dinâmica ecológica das populações hospedeiras, influenciando aspectos como saúde, comportamento e interações interespecíficas (Nunn & Altizer, 2006).

Entre os helmintos, os nematódeos destacam-se pela elevada frequência de ocorrência e diversidade de espécies associadas a primatas, especialmente em ambientes naturais (Anderson, 2000). A prevalência desses parasitos está diretamente relacionada a fatores ecológicos e comportamentais, incluindo densidade populacional, hábitos alimentares e uso do habitat, os quais determinam o grau de exposição aos estágios infectantes presentes no ambiente (Nunn & Altizer, 2006; Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018).

Primatas do gênero Callithrix apresentam características ecológicas que favorecem a infecção por helmintos intestinais. Esses animais possuem dieta generalista, que inclui frutos, exsudatos vegetais e uma variedade de artrópodes, além de apresentarem comportamento de forrageamento que envolve contato frequente com o substrato (Rylands & Mittermeier, 2009). Esse conjunto de fatores aumenta a probabilidade de ingestão de formas infectantes, especialmente em parasitos com ciclo de vida indireto.

Adicionalmente, a ocupação de ambientes antropizados por espécies de Callithrix tem sido associada a alterações na dinâmica parasitária. A fragmentação florestal e a modificação do habitat podem influenciar a abundância de hospedeiros intermediários e a persistência de estágios infectantes no ambiente, favorecendo a manutenção de ciclos parasitários (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018).

Apesar da ampla ocorrência de helmintos em primatas neotropicais, muitos estudos ainda apresentam limitações metodológicas, especialmente no que se refere à identificação taxonômica. A utilização de análises baseadas exclusivamente em morfologia ou em identificação indireta por meio de ovos pode comprometer a precisão dos resultados, evidenciando a necessidade de abordagens complementares na identificação destes organismos (Anderson, 2000; Gasser et al., 1993).

2.5 O gênero *Primasubulura* e a espécie *Primasubulura jacchi*

O gênero *Primasubulura* integra a superfamília Subuluroidea, sendo composto por nematódeos que parasitam o trato gastrointestinal de vertebrados (Anderson, 2000). As espécies desse grupo apresentam características biológicas semelhantes, incluindo ciclo de vida indireto e associação com hospedeiros intermediários artrópodes (Anderson, 2000). Entre as espécies descritas, *Primasubulura jacchi* destaca-se por sua associação com primatas do gênero *Callithrix*, sendo frequentemente registrada em levantamentos parasitológicos realizados tanto em condições de vida livre quanto em cativeiro (Resende et al., 1994; Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018). Essa recorrência sugere uma adaptação eficiente dessa espécie às condições ecológicas associadas a esses hospedeiros.

No hospedeiro definitivo, os indivíduos adultos de *P. jacchi* localizam-se no intestino, onde realizam a reprodução sexuada. Os ovos produzidos são eliminados nas fezes, permitindo a contaminação do ambiente e a continuidade do ciclo biológico (Yamaguti, 1963). O desenvolvimento larval ocorre em artrópodes, que atuam como hospedeiros intermediários, sendo posteriormente ingeridos pelos primatas durante o forrageamento (Anderson, 2000) (Figura 3).

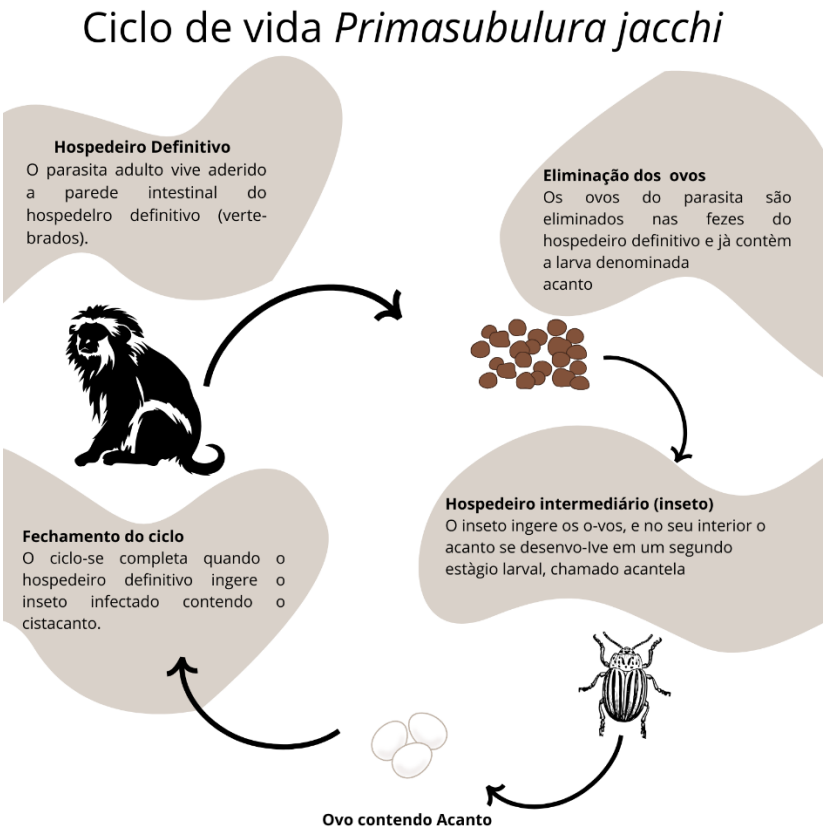


Figura 3. Esquema do ciclo de vida de *Primasubulura jacchi*, evidenciando a participação de hospedeiros definitivos (primatas do gênero *Callithrix*) e intermediários (artrópodes). Os adultos localizam-se no intestino do hospedeiro definitivo, onde produzem ovos eliminados nas fezes. Após ingestão por insetos, ocorre o desenvolvimento larval até o estágio infectante, sendo o ciclo completado quando o hospedeiro definitivo ingere o hospedeiro intermediário infectado.

Do ponto de vista morfométrico, os espécimes adultos apresentam comprimento variando entre aproximadamente 5 e 12 mm, com dimorfismo sexual evidente, sendo as fêmeas geralmente maiores que os machos (Yamaguti, 1963). Embora essas características auxiliem na identificação, sua utilização isolada pode ser insuficiente para a distinção entre espécies próximas. Estudos indicam que *P. jacchi* pode apresentar elevada prevalência em populações de saguis, especialmente em ambientes onde fatores ecológicos favorecem a manutenção de seu ciclo de vida. No entanto, a maior parte das informações disponíveis ainda se

baseia em dados morfológicos, havendo escassez de estudos que explorem sua variabilidade genética.

2.6 Limitações da identificação morfológica em nematódeos

A identificação morfológica de nematódeos constitui uma abordagem tradicional e amplamente utilizada na parasitologia (Anderson, 2000). No entanto, essa metodologia apresenta limitações importantes, especialmente em grupos nos quais há elevada similaridade morfológica entre espécies. A presença de espécies crípticas representa um dos principais desafios para a taxonomia baseada em morfologia, uma vez que organismos geneticamente distintos podem apresentar características externas semelhantes (Blouin, 2002). Além disso, a variação intraespecífica e o dimorfismo sexual podem dificultar a delimitação taxonômica (Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011). Outro fator limitante é a qualidade do material analisado. Em muitos estudos, os espécimes encontram-se fixados ou preservados por longos períodos, o que pode comprometer a integridade das estruturas diagnósticas (Gasser et al., 1993). Essa limitação é particularmente relevante em análises retrospectivas ou em estudos que utilizam material de coleções.

Diante dessas dificuldades, a integração de abordagens morfológicas e moleculares tem sido amplamente recomendada, permitindo maior precisão na identificação e contribuindo para a resolução de questões taxonômicas.

2.7 A região ITS como marcador molecular em nematódeos

A região ITS do DNA ribossomal é amplamente utilizada como marcador molecular na identificação e caracterização de nematódeos, sendo composta pelos espaçadores ITS1 e ITS2, localizados entre os genes 18S, 5.8S e 28S (Hillis & Dixon, 1991). Essas regiões apresentam elevada variabilidade entre espécies, o que as torna particularmente úteis para estudos de diferenciação taxonômica (Gasser et al., 1993; Chilton, 2004). A presença de regiões conservadas flanqueando os espaçadores permite a utilização de primers universais para amplificação por PCR, facilitando sua aplicação em diferentes grupos de organismos (Gasser et al., 1993).

Essa característica tem contribuído para a ampla adoção da região ITS em estudos de sistemática e filogenia de helmintos (Blouin, 2002; Nadler & Hudspeth, 2000).

A análise da região ITS tem sido utilizada com sucesso na diferenciação de espécies próximas, na identificação de espécies crípticas e na inferência de relações evolutivas (Blouin, 2002). Em nematódeos, essa abordagem tem permitido avanços significativos na compreensão da diversidade genética e na organização taxonômica dos grupos. Entretanto, a eficácia dessas análises depende da disponibilidade de sequências de referência em bancos de dados públicos. Para muitos nematódeos associados a primatas neotropicais, incluindo *Primasubulura jacchi*, essas informações ainda são limitadas, o que dificulta comparações mais abrangentes.

A identificação tradicional de parasitas baseia-se em características morfológicas, frequentemente obtidas a partir de necropsias ou análises de ovos e larvas em fezes (Read, 1974). Contudo, limitações desse método incluem a ausência de caracteres diagnósticos em estágios imaturos e a semelhança entre espécies próximas, dificultando análises taxonômicas mais refinadas (Gasser et al., 1993).

A identificação morfológica continua sendo uma ferramenta fundamental na parasitologia, especialmente para a descrição inicial de espécies e para a caracterização de grupos taxonômicos bem estabelecidos. Em helmintos, essa abordagem baseia-se na análise de características como forma e tamanho do corpo, organização dos órgãos internos, estruturas reprodutivas, presença e disposição de ganchos, espinhos ou ventosas, além da morfologia dos ovos e larvas, quando disponíveis (ANDERSON, 2000; YAMAGUTI, 1963). No caso de acantocéfalos, por exemplo, a morfologia da probóscide, incluindo o número, o arranjo e o tamanho dos ganchos, é considerada um dos principais caracteres diagnósticos para a distinção entre gêneros e espécies.

Entretanto, a identificação exclusivamente morfológica pode ser limitada pela escassez de material bem preservado, pela ocorrência de estágios imaturos, pelo dimorfismo sexual e pela presença de espécies crípticas, o que reforça a necessidade de abordagens complementares, como as ferramentas moleculares, para uma delimitação taxonômica mais precisa.

DNA barcoding é uma técnica de identificação de espécies baseada na análise de um curto fragmento padronizado de DNA. Esse método funciona como

um "código de barras genético", permitindo distinguir organismos de forma rápida e precisa (LIRA, 2013). O DNA ribossomal (rDNA), localizado no nucléolo, é frequentemente usado em *DNA barcoding*. Esta região contém os genes dos RNAs ribossomais (rRNA) 18S, 5.8S e 28S, separados por regiões ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacers* 1 e 2) que são sequências não codificantes. Cada região rDNA é separada da outra por espaçadores não transcritos (NTS, em inglês) (Figura 4).

Essas regiões apresentam alta variabilidade entre espécies próximas, embora se mantenham conservadas dentro de uma mesma espécie, tornando-se ferramentas cruciais em estudos filogenéticos e taxonômicos de helmintos. Sua aplicabilidade inclui a diferenciação de espécies crípticas e a investigação das relações evolutivas entre parasitas. Além disso, a presença de regiões flanqueadoras conservadas permite sua amplificação eficiente por PCR, enquanto as sequências internas fornecem dados úteis para análises moleculares (SCHOCH *et al.,* 2012).

A região de NTS possui a maior parte dos elementos que regulam a transcrição do rDNA, enquanto que a região do espaçador transcrito externo (ETS, em inglês) é parte do transcrito primário. A transcrição do rDNA inicia-se no promotor através do ETS-5’ e na seguinte ordem: rRNA 18S - ITS1 - rRNA 5.8S - ITS2 - rRNA 28S até que a enzima RNA-polimerase receba um sinal para terminar a transcrição. Posteriormente, o transcrito primário do rDNA é processado em três moléculas de rRNA: 18S, 28S e 5.8S que resultam da eliminação dos espaçadores ITS1 e ITS2 (HILLIS; DIXON, 1991).

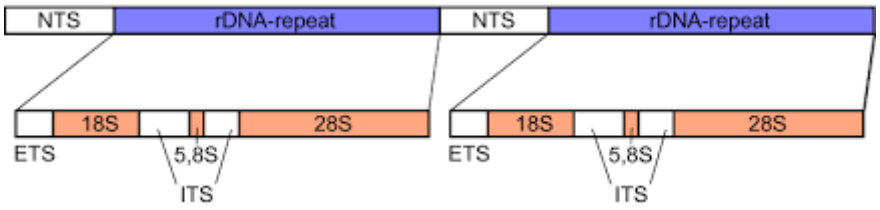


Figura 4. Componentes da região do DNA ribossomal (rDNA). O esquema apresenta duas unidades repetitivas do rDNA, destacando os espaçadores não transcritos (NTS), os espaçadores transcritos externos (ETS), os genes ribossomais 18S, 5,8S e 28S, e os espaçadores transcritos internos (ITS)

2.8 Importância da caracterização molecular de *Primasubulura jacchi*

A geração de dados moleculares para *Primasubulura jacchi* representa uma contribuição relevante para o avanço do conhecimento sobre a diversidade parasitária em primatas neotropicais. A caracterização da região ITS permite não apenas a confirmação taxonômica da espécie, mas também sua inserção em análises filogenéticas mais amplas. Além disso, a disponibilização de novas sequências em bancos de dados contribui para o enriquecimento das informações disponíveis, facilitando estudos futuros e permitindo comparações entre diferentes populações e regiões geográficas (Blouin, 2002).

Nesse contexto, estudos que integram dados moleculares à análise parasitológica tradicional desempenham papel fundamental na compreensão da biodiversidade de helmintos, contribuindo para o desenvolvimento da sistemática e para o entendimento das relações evolutivas desses organismos.

Apesar da importância taxonômica e filogenética de representantes da família Subuluridae, os dados moleculares disponíveis em bancos públicos ainda são limitados. Até o momento da realização deste estudo, não foram encontradas sequências atribuídas especificamente a *Primasubulura jacchi* depositadas no GenBank. Entretanto, encontram-se disponíveis sequências de espécies filogeneticamente próximas pertencentes ao gênero *Subulura* e à superfamília Subuluroidea, incluindo regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do DNA ribossomal.

Entre os registros disponíveis destacam-se as sequências de *Subulura chinensis* isolados ZW4, ZW5, ZW8, ZW10, ZW11 e ZW16, contendo ITS1 parcial, gene 5.8S completo e ITS2 parcial (MK770250.1, MK770254.1, MK770255.1, MK770253.1, MK770252.1 e MK770249.1). Também estão disponíveis sequências de *Primasubulura* cf. distans CS-2021, incluindo regiões ITS e gene mitocondrial COI (MW679021.1, MW679022.1, MW679061.1 e MW679062.1), além de sequências mitocondriais de *Aulonocephalus pennula* para o gene COI (LC590659.1 e LC2171085.1).

A baixa representatividade molecular de Subuluridae em bancos públicos limita análises comparativas mais robustas e reforça a importância da caracterização molecular realizada neste estudo, que contribui para ampliar a biblioteca genética de nematódeos associados a primatas neotropicais.

Tabela 1. Sequências de DNA de representantes da superfamília Subuluroidea disponíveis no banco de dados GenBank e utilizadas como referência comparativa para análises moleculares e filogenéticas neste estudo, incluindo marcadores das regiões ITS e COI, com seus respectivos números de acesso.

Espécie	Região Genômica	Código GenBank
Subulura chinensis ZW4	ITS1 parcial + 5.8S + ITS2 parcial	MK770250.1
Subulura chinensis ZW5	ITS1 parcial + 5.8S + ITS2 parcial	MK770254.1
Subulura chinensis ZW8	ITS1 parcial + 5.8S + ITS2 parcial	MK770255.1
Subulura chinensis ZW10	ITS1 parcial + 5.8S + ITS2 parcial	MK770253.1
Subulura chinensis ZW11	ITS1 parcial + 5.8S + ITS2 parcial	MK770252.1
Subulura chinensis ZW16	ITS1 parcial + 5.8S + ITS2 parcial	MK770249.1
Primasubulura cf. distans CS-2021	ITS1 parcial + 5.8S + ITS2 parcial	MW679021.1
Primasubulura cf. distans CS-2021	COI parcial	MW679061.1
Aulonocephalus pennula	COI parcial	LC590659.1

2.9 Aspectos morfológicos de *Primasubulura jacchi*

Estudos demonstram que a integração entre dados morfológicos e moleculares permite maior precisão na identificação, possibilitando a descrição de espécies crípticas e a elucidação de relações filogenéticas (Hajibabaei et al., 2007). Essa abordagem é especialmente relevante para helmintos, cuja diversidade em primatas neotropicais ainda é pouco conhecida e possivelmente subestimada (Solórzano-García; Pérez-Ponce de León, 2018).

A identificação morfológica de *Primasubulura jacchi* baseia-se em características observadas por microscopia óptica, incluindo estruturas da extremidade anterior, região caudal e órgãos reprodutivos. Segundo Castro (2024, dados não publicados), os espécimes apresentam corpo retilíneo, extremidade anterior em formato cônico e asas cervicais pouco desenvolvidas. O dimorfismo sexual é evidente, sendo os machos menores e apresentando a extremidade posterior fortemente recurvada ventralmente, enquanto as fêmeas possuem região posterior reta terminando em apêndice caudal.

Os machos apresentaram comprimento corporal variando entre 13,5 e 16 mm, enquanto as fêmeas variaram entre 18 e 26 mm. A cápsula bucal mostrou-se pequena em ambos os sexos, associada a um esôfago retilíneo com dilatação piriforme terminal ligada a um bulbo esferoide. Nos machos, destacaram-se ainda espículos levemente desiguais e gubernáculo quase retilíneo, estruturas importantes para a identificação taxonômica da espécie.

As análises morfológicas realizadas por microscopia óptica permitiram a visualização de estruturas diagnósticas relevantes, incluindo cápsula bucal, cutícula, região caudal e estruturas copulatórias. Essas características corroboram descrições clássicas do gênero *Primasubulura* e reforçam a importância da integração entre dados morfológicos e moleculares na delimitação taxonômica de helmintos parasitos de primatas neotropicais.

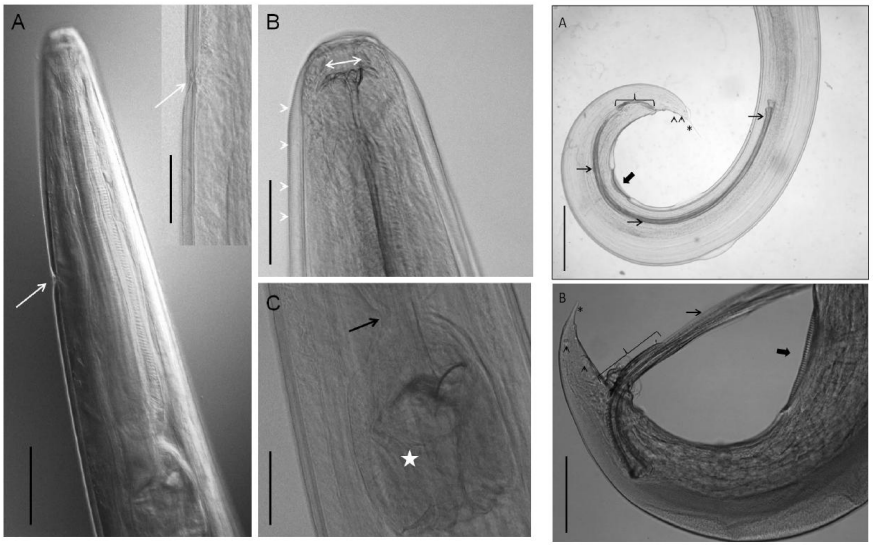


Figura 5. Características morfológicas de nematódeos identificados como *Primasubulura jacchi*. (A–C) Região anterior evidenciando estruturas associadas à extremidade cefálica; (D–E) Região posterior destacando curvatura caudal e estruturas relacionadas ao dimorfismo sexual. As setas indicam caracteres diagnósticos utilizados na identificação taxonômica. Imagens de microscopia ótica obtidas por Castro (2024, dados não publicados) e utilizadas com autorização.

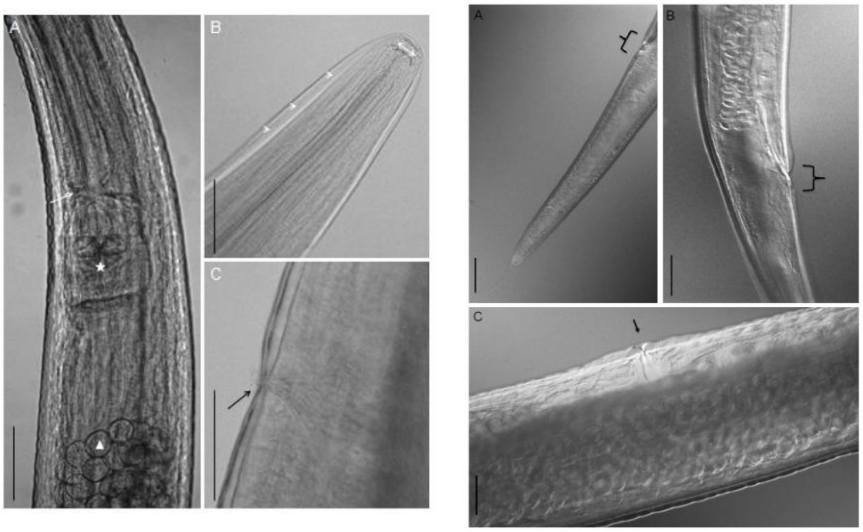


Figura 6. Detalhes morfológicos de *Primasubulura jacchi* evidenciando estruturas corporais relevantes para a identificação taxonômica. (A–C) Regiões do corpo com destaque para estruturas internas e cuticulares; (D–F) Detalhes da extremidade posterior e porções do tegumento. As marcações indicam características morfológicas diagnósticas. Imagens de microscopia ótica obtidas por Castro (2024, dados não publicados) e utilizadas com autorização.

Os espécimes analisados apresentaram características morfológicas compatíveis com *Primasubulura jacchi*, incluindo dimorfismo sexual evidente, cápsula bucal reduzida, esôfago com dilatação terminal e presença de espículos desiguais nos machos. Os principais caracteres morfométricos observados por Castro (2024, dados não publicados) estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 2. Caracteres morfométricos de machos e fêmeas de *Primasubulura jacchi* obtidos por microscopia óptica e comparados com dados da literatura. Valores expressos em média ± desvio padrão, seguidos pelos valores mínimo e máximo entre parênteses. Medidas em milímetros. Dados adaptados de Castro (2024, dados não publicados).

Caracteres morfológicos	**Machos**	**Fêmeas**
Comprimento total	14,3 ± 0,87 (13,5–16)	21,5 ± 3,49 (18–26)
Largura máxima	0,36 ± 0,01	0,46 ± 0,06
Comprimento do esôfago	1,34 ± 0,52	1,52 ± 0,05
Comprimento do bulbo esofagiano	0,27 ± 0,01	0,33 ± 0,03
Comprimento espículo maior	1,83 ± 0,03	—
Comprimento espículo menor	1,77 ± 0,03	—
Comprimento do gubernáculo	0,20 ± 0,00	—
Distância da vulva à extremidade anterior	—	9,55 ± 2,39

Fonte: Adaptado de Castro (2024, dados não publicados).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar molecularmente endoparasitas *Primasubulura jacchi* coletados do intestino de saguis híbridos (*Callithrix penicillata* × *Callithrix jacchus*) que coabitam fragmentos florestais na Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-leão-dourado, por meio da análise de regiões genômicas utilizadas em *DNA barcoding*, e estabelecer suas relações filogenéticas.

3.1 *Objetivos específicos*

- Estabelecimento do protocolo para amplificação da região ITS de *P. jacchi* intestinais de saguis (*Callithrix* spp.).
- Identificar a sequência das regiões genômicas ITS-1 e ITS-2 de *P. jacchi* por sequenciamento direto de DNA.
- Construir uma árvore filogenética com base na sequência da região ITS-1 e/ou ITS-2 de *P. jacchi* e outros nematoides.

4. METODOLOGIA

4.1 Origem das amostras

Foram analisados espécimes parasitários armazenados em álcool etílico a 70%, provenientes de necropsias de saguis híbridos oriundos da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, no estado do Rio de Janeiro. As amostras parasitárias foram previamente coletadas, acondicionadas e disponibilizadas pela Dra. Bianca Cardoso Afonso (2019), no contexto de estudos conduzidos na área.

As amostras parasitárias foram identificadas por siglas alfanuméricas correspondentes aos indivíduos hospedeiros, preservando a rastreabilidade do material biológico. Todos os espécimes analisados foram provenientes de saguis híbridos (*Callithrix penicillata* × *Callithrix jacchus*) oriundos da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, no estado do Rio de Janeiro.

No momento do repasse das amostras para o presente estudo, não foi disponibilizada a associação individual detalhada entre cada parasito e seu respectivo hospedeiro. Dessa forma, as análises taxonômicas e moleculares foram conduzidas considerando os espécimes como pertencentes a saguis híbridos provenientes da área de estudo.

Todos os procedimentos de coleta e uso do material biológico foram autorizados pelo órgão ambiental competente (licença SISBIO nº 35931-8).



Figura 7. Procedimentos de coleta e visualização macroscópica de endoparasitas obtidos durante necropsias de primatas provenientes da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, Rio de Janeiro, Brasil. Material coletado e disponibilizado pela Dra. Bianca Cardoso Afonso.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA genômico de parasitas adultos foi realizada com base nos protocolos descritos por Andrade et al. (2013; 2018). Para isso, foram utilizados kits comerciais, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes. Métodos *in-house* também foram empregados em algumas amostras para comparação de eficiência. O método *in-house* consistiu em uma abordagem personalizada desenvolvida no laboratório, incluindo etapas de lise celular, purificação e precipitação de DNA adaptadas às especificidades das amostras analisadas. Foi utilizado um único parasita para cada extração.

Foram utilizados três métodos de extração: (1) o kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN); (2) o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega); e (3) um método *in-house* baseado em SDS e proteinase K.

Para a extração utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), cada nematódeo foi transferido para um tubo de 1,5 mL com auxílio de pinça, sendo posteriormente lavado com PBS e submetido à agitação em vortex. O PBS foi removido com pipeta e, em seguida, foram adicionados 600 µL de solução de lise de núcleos, 3 µL de RNase e 10 µL de proteinase K. A mistura foi incubada a 37 °C *overnight*, permitindo a completa degradação dos tecidos do nematódeo. Após a incubação, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e foram adicionados 200 µL de solução de precipitação de proteínas, sendo então vortexada para homogeneização. Posteriormente, a amostra foi mantida em congelador por 5 minutos para facilitar a precipitação proteica. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13.400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi cuidadosamente transferido para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol à temperatura ambiente, promovendo a precipitação do DNA. Após mistura por inversão suave, a amostra foi novamente centrifugada a 13.400 rpm por 1 minuto para sedimentação do DNA. O sobrenadante foi removido cuidadosamente, e o pellet foi lavado com 600 µL de etanol 70% à temperatura ambiente, seguido de nova centrifugação a 13.400 rpm por 1 minuto. O etanol foi descartado e a amostra foi deixada secar à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, o DNA precipitado foi ressuspendido em 50 µL de água ultrapura e incubado *overnight* à temperatura ambiente.

Adicionalmente, foi utilizado um método *in-house* baseado em SDS e proteinase K, conforme descrito por Carneiro et al. (2011). Após a lavagem do nematódeo com PBS, foram adicionados 1 µL de proteinase K (25 mg/mL) e 49 µL de SDS a 0,005%. Os microtubos foram incubados a 55 °C por 1 hora, seguidos de incubação a 99 °C por 30 minutos, garantindo a completa degradação das amostras. Para purificação e remoção do SDS, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foram adicionados dois volumes de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada suavemente e centrifugada a 3.200 rpm por 10 minutos. Após verificação da formação do precipitado, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 5 µL de etanol 70%, e a amostra foi novamente centrifugada a 3.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado secar em bancada, sendo posteriormente incubado destampado a 37°C por 5 a 10 minutos. Após essa etapa, o precipitado foi ressuspendido em 300 a 350 µL de água para PCR e mantido em temperatura ambiente *overnight*. No dia seguinte, a amostra foi incubada a 37 °C por 30 minutos e transferida para um tubo Eppendorf devidamente identificado. Finalmente, o material foi armazenado a 4 °C ou -20 °C, conforme a necessidade de uso posterior. Esse procedimento visou garantir a purificação eficaz da amostra, preparando-a para análises subsequentes com DNA livre de SDS.

4.3 Amplificação por PCR

As regiões ITS do DNA ribossomal foram amplificadas utilizando diferentes combinações de primers (Tabela 3). A região ITS1 foi amplificada com os primers SS1 (forward) e SS2 (reverse), conforme descrito por Newton et al. (1998). Para a amplificação da região ITS2 foram utilizados os primers NC13 (forward) e NC2 (reverse) (Gasser et al., 1993; Newton et al., 1998), enquanto a região ITS1/ITS2 foi amplificada utilizando os primers NC5 (forward) e NC2 (reverse).

Tabela 3. Primers utilizados na reação de PCR.

Sequência Forward 5’-3’	**Sequência Reverse 5’-3’**
(NC5) GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT	(NC2) TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT
(NC13) ATCGATGAAGAACGCAGC	(NC2) TTA GTT TCT TTT CCT CCGCT
(SS1) GTTTCCGTAGGTGAACCTGCG	(SS2) AGTGCTCAATGTGTCTGCAA

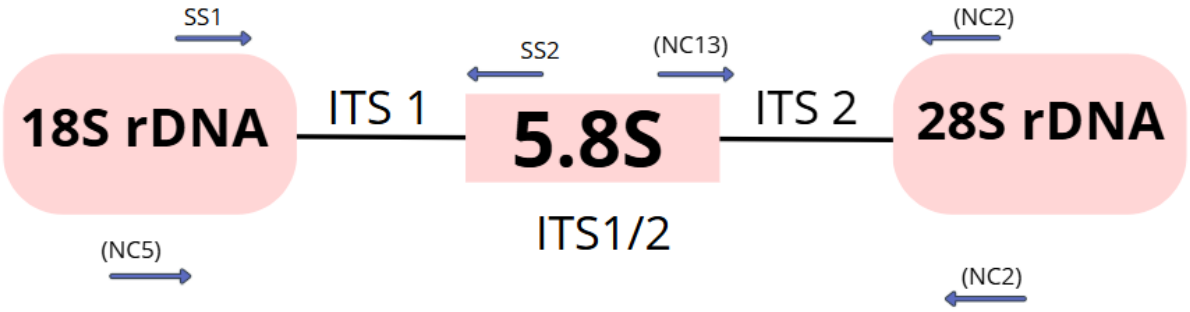


Figura 8. Representação esquemática da região do DNA ribossomal (rDNA), evidenciando os genes 18S, 5.8S e 28S, bem como os espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2, e os sítios de anelamento dos primers utilizados nas reações de PCR. O primeiro esquema ilustra a amplificação da região ITS1 por meio dos primers SS1 (forward) e SS2 (reverse), e da região ITS2 utilizando os primers NC13 (forward) e NC2 (reverse). O segundo esquema representa a amplificação do fragmento contínuo ITS1–5.8S–ITS2, obtido a partir da combinação dos primers NC5 (forward) e NC2 (reverse). As setas indicam a direção de síntese no sentido 5'–3', e as diferentes cores destacam os fragmentos amplificados em cada reação, conforme descrito na metodologia.

As reações de PCR foram preparadas com os kits da enzima hot-start Platinum Taq Polimerase com e sem PCR Enhancer Solution (Tabela 4) e com o kit da enzima de alta fidelidade Plartinum SuperFi II DNA Polimerase com e sem suplementação de $MgCl_2$ (Tabela 5).

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems). Para a amplificação das diferentes regiões ITS de *P. jacchi*, foram testadas variadas condições de amplificação especificadas nas tabelas 6 a 10.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE. As amostras foram preparadas utilizando tampão de amostra e GelRed, juntamente com marcador de peso molecular (DNA Ladder). Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em sistema de fotodocumentação.

Tabela 4. Master mix Platinum Taq Polimerase (Invitrogen) com e sem PCR Enhancer (Invitrogen)

Componente	**Concentração final**	**Concentração final**
Tampão 10X	1X	1x
10X PCRx Enhancer Solution	-	1x
dNTP mix	0,2 mM de cada dNTP	0,2 mM de cada dNTP
MgCl2	1,5 mM	1,5 mM
Primer forward	0,2 µM	0,2 µM
Primer rerverse	0,2 µM	0,2 µM
Platinum Taq Polimerase	1,0 U	2,5 U

Tabela 5. Master Mix das reações de PCR utilizando Platinum SuperFi II DNA Polymerase (Invitrogen) com e sem suplementação de $MgCl_2$.

Componente	Concentração final	Concentração final
Tampão 5X c/ $MgCl_2$	1x / 1,75 mM	1x / 1,75 mM
Primer forward	0,5 µM	0,5 µM
Primer rerverse	0,5 µM	0,5 µM
dNTP	0,2 mM de cada dNTP	0,2 mM de cada dNTP
Platinum SuperFi II DNA Polymerase	0.4 µL	0.4 µL
$MgCl_2$ adicional	-	1,5 mM

Tabela 6. Condições da PCR para amplificar as regiões ITS. Programa 1 – Platinum Taq Pol 58

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	2 min	1
Desnaturação	94	30 s	
Anelamento	58	30 s	35
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	4 min	1

Tabela 7. Condições da PCR utilizados para amplificar as regiões ITS. Programa 2 – NC2–NC5

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	3 min	1
Desnaturação	94	40 s	
Anelamento	55	40 s	40
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	7 min	1

Tabela 8. Condições da PCR para amplificar as regiões ITS. Programa 3 – ITS-1

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	2 min	1
Desnaturação	94	30 s	
Anelamento	55	30 s	30
Extensão	72	30 s	
Extensão final	72	4 min	1

Tabela 9. Condições da PCR para amplificar as regiões ITSI. Programa 4 – SuperFi II DNA Polymerase

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	98,0	30 s	1

Desnaturação	98,0	10 s	
Anelamento	60,0	10 s	35
Extensão	72,0	30 s	
Extensão final	72,0	5 min	1

Tabela 10. Condições da PCR para amplificar as regiões ITS. Programa 5 – Touchdown PCR (68–58 °C)

Etapa	**Temperatura (°C)**	**Tempo**	**Nº de ciclos**
Desnaturação inicial	95	1 min	1
Desnaturação	95	15 s	
Anelamento (68→58°C)	68–58	15 s	11
Extensão	72	30 s	
Desnaturação	94	15 s	

4.4 Sequenciamento de Sanger

As sequências de DNA amplificadas por PCR foram purificadas com ExoSAP-IT™ Express (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, 1 µL da amostra purificada foi adicionado a um poço de placa de 96 poços, juntamente com 1 µL do respectivo primer forward ou reverse e 8 µL do master mix BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific). A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific) sob as seguintes condições: 95°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, sendo posteriormente mantida a 4°C até a remoção do equipamento.

A purificação da reação de sequenciamento foi realizada pelo método de precipitação com etanol, adicionando-se 2,5 µL de EDTA 125 mM e 30 µL de etanol absoluto em cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, e a placa foi centrifugada de cabeça para baixo a 1160 rpm por 1 minuto para secagem dos poços. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de etanol 70% (preparado no momento) a cada poço, seguidos de nova centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado, e a placa foi submetida a uma nova centrifugação de cabeça para baixo a 1160 rpm por 1 minuto. Após a completa remoção do etanol, 10 µL de formamida foram adicionados a cada poço, e a placa foi levada ao termociclador para desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida

de resfriamento a 4°C por 3 minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese capilar em analisador genético automático ABI 3500, utilizando polímero POP-7 e capilares de 50 cm. As sequências obtidas foram analisadas no software Geneious (Dotmatics).

4.5 Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada no software Geneious com base em sequências da região ITS do DNA ribossomal, incluindo sequências obtidas neste estudo e sequências homólogas de nematoides recuperadas do banco de dados GenBank. A região correspondente ao ITS2 foi mapeada e extraída das sequencias do GenBank por meio do Blastn no Geneious usando o database “Internal Transcribed Spacer Region (ITS)”. As sequencias foram alinhadas pelo método MAFFT. A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood /PhyML). A confiabilidade estatística dos agrupamentos foi avaliada por meio de análise de bootstrap com 100 repetições (Felsenstein, 1985). Os comprimentos dos ramos foram estimados como número de substituições por sítio, conforme calculado pelo modelo evolutivo selecionado.

5. RESULTADOS

5.1 *Otimização do protocolo de amplificação da região ITS*

As reações de PCR foram submetidas a diferentes condições experimentais com o objetivo de otimizar a amplificação da região ITS1/2 dos nematódeos analisados com os primers NC5/NC2. Inicialmente, foi utilizado o protocolo convencional de amplificação empregando o máster mix descrito na Tabela 4 e o Programa 1 de PCR (Tabela 6) com o DNA genômico de um pool de 10 espécimes. Nessas condições, não foram observados produtos de amplificação satisfatórios nos géis de agarose, indicando que o protocolo inicial não era adequado para as amostras analisadas.

Diante desse resultado, foram realizados ajustes nas condições de reação, incluindo alterações na composição do máster mix, nas temperaturas de anelamento e nos programas de ciclagem. Utilizando o máster mix descrito na Tabela 5 associado ao Programa 3 de PCR (Tabela 8), observou-se a amplificação de apenas uma amostra, evidenciada pela presença de uma única banda compatível com o tamanho esperado para o fragmento-alvo (Figura 9). O sequenciamento desta amostra revelou uma sequencia de 1177pb de boa qualidade, como algumas bases degeneradas. A análise desta sequencia por Blastn usando o *database* “Core nucleotide database (core_nt)” revelou 60% da sequencia tinha mais de 85% de identidade com a espécie Subulura chinensis e mais de 84% com espécies da superfamília Subuluroidea de nematódeos parasitas pertencentes à ordem Ascaridida (Tabela 11).

Embora a amplificação e o sequenciamento tenham sido exitosos com o pool de nematoides, a presença de bases degeneradas indicava que seria necessário o sequenciamento individual dos espécimes. Muitas tentativas de extração de DNA e amplificação da região ITS1/2 foram realizadas, mas nenhuma foi capaz de gerar uma sequencia informativa.

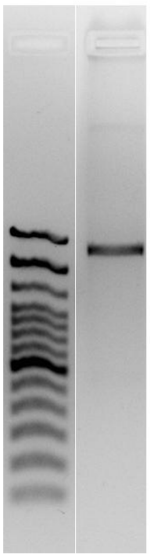
A continuidade dos testes com amostras individualizadas permitiu obter resultados mais satisfatórios de amplificação da região ITS2 utilizando os primers NC13 (forward) e NC2 (reverse), mantendo-se o máster mix da Tabela 5 e o Programa 3 de PCR (Tabela 8). Nessas condições, foram observadas amplificações em quatro amostras distintas, todas apresentando bandas bem definidas e

compatíveis com o tamanho esperado do fragmento amplificado (Figura 10). Esse protocolo apresentou o melhor desempenho entre todas as combinações avaliadas, sendo posteriormente selecionado para obtenção dos produtos destinados ao sequenciamento.

Também foi avaliada uma condição alternativa utilizando o máster mix da Tabela 5 associado ao Programa 4 (Tabela 9). Nessa condição, observou-se amplificação em apenas uma amostra; entretanto, o produto apresentou três bandas distintas no gel de agarose (Figura 11), indicando ocorrência de amplificação inespecífica. A presença de múltiplos amplicons inviabilizou a utilização direta desse produto para as análises subsequentes de sequenciamento.

De modo geral, os resultados demonstraram que a eficiência da amplificação variou conforme as condições experimentais empregadas. Entre os protocolos testados, a combinação dos primers NC13 e NC2 com o máster mix descrito na Tabela 5 e o Programa 3 de PCR (Tabela 8) apresentou os melhores resultados, produzindo bandas únicas, bem definidas e adequadas para as análises moleculares e filogenéticas desenvolvidas neste estudo.

PJ ITS-1/2 (NC5-NC2)



>Seq_1 length=1177bp

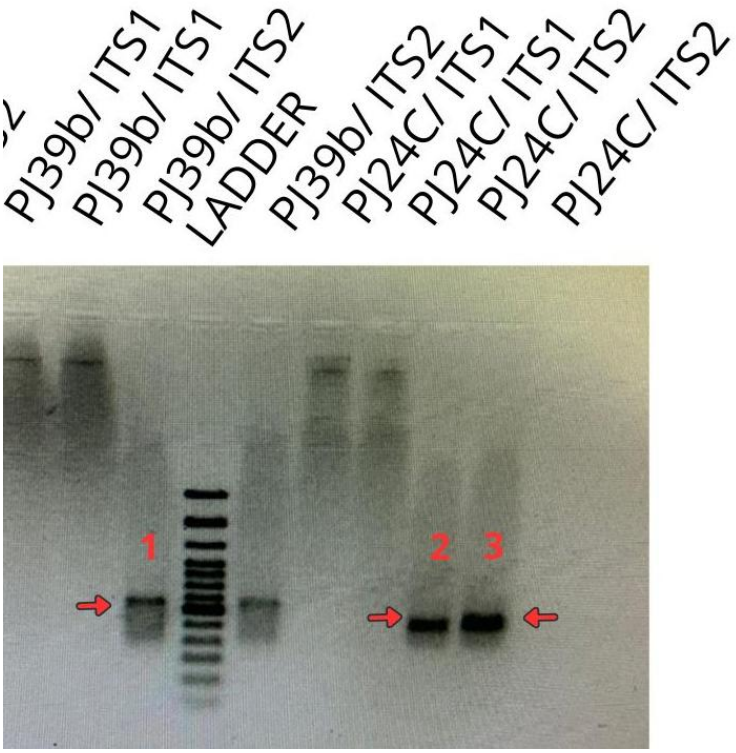
GGGGTCTCCGCACTGAGCTGAGGTCGAAATTAATCAACAATCCGCGTTCTCTGGAA**R**CTGTCACT
GAGTGTCGCTTTACTGGCGCGCATTGCTCGTCTGTGCGGATGCATAGCGAACTCGTCTCACCAA
CATTGTTTGAACAAGCACACGTTGGTTACGAGGCATCAGAGCAACACAGCAACAACTCTGACATC
CCATACGGATATCGTCCCGTCGGGCCGCCCGATGCTGGCTGG**S**TGGACTGACCAC**S**CGTCC**S**TC
CGATCAGGGTGGAGCGATC**K**AAGCCGCC**W**CCGCC**R**CCAACGAACGA**S**CGG**M**AGAGCGAGACC
CACCCACCAA**S**C**W**GGTGGGTGTTGCTTGCTATGTAAGGTGTGTGCTTTCGGCGGG**M**A**SK**CGC**R**
CATAC**M**TTATCTACCACCCACTC**R**CTCTCTCTTTCTTCTCAAGCGCGAATCGTTGTGAAACACGCA
CTACACACCGACTC**R**AGGAGACCGCAAGCGAGCGT**K**ATTGCTTTTTGAAATTGACCCTCAG**M**CA

GACGTGCCAACGGGAATGAACCCGATGGCGCA**R**TGTGCGTTCGAA**K**TTTTAGTGCTCAATGTGT
CTGCAATTC**K**CACTAGTTATCGCAGCTAGCTGCGTTCTTCATCGATCCGCGAGCCGAGTGATCCA
CC**R**CTAAGAGTTATACAGCTTTTATGAACGAGAGGAGTGTTCATGAGGVGCTAGAGC**W**CA**W**YAC
TCATTATACATATTC**W**CACCATACATACATGGGTGAATACCACATTGTACATAGTATTTGTGGTGT
TTTGGTTGCTGGCAGCGCACTAGCTGAACGCTTATTAAGTCTGCTCAACACACTTGACAGGCAGC
AGTGTGGAACTAAACCCGCATCTTTCATCGCTATCCACGGTCCGAAGATAGCTCGATGCGGCGTA
GACGCCAGCAGTGGACACCGTTGTTACCAATAACGAGTCGCCGAACGCTAGCGATACGTCTAAA
TTAGCGGCGACGTATCATYCGGCTGCTCTCAACGTGTACGCACCTCAGCTGTCTACCAACGTTAC
CATCAGAAGACATTCAACGCTAGTCGCAACAACATCGCTTTTCAGGCGGCGCGTTGTGTTGCGCT
ATGTTGAGTGCTGAGAAGTAGCCAGAATGCGACACGGCTCACTTTTCGTGCAAATGGATGGTATG
CACGGTATGAG**W**CTTT

Figura 9. Amplificação por PCR das regiões ITS1-2 a partir do DNA extraído do pool de 10 nematóides *P. jachhi* após eletroforese em gel de agarose 1,5%. A respectiva sequencia de nucleotídeos obtida a partir do sequenciamento de Sanger do produto amplificado, com indicação do seu comprimento. A presença de nucleotídeos ambíguos (K,M,R,S,W) reflete regiões de baixa qualidade de leitura no sequenciamento.

Tabela 11. Análise por Blastn da sequencia gerada pelo sequenciamento da amostra PJ ITS1/2 amplificada com os primer NC5-NC2.

Identificação	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len
Subulura chinensis isolate ZW16 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2	737	737	60%	0.0	85.54	1256
Subulura chinensis isolate ZW4 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2	737	737	60%	0.0	85.50	1256
Subulura chinensis isolate ZW11 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2	737	737	60%	0.0	85.54	1256
Subulura chinensis isolate ZW8 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2	737	737	60%	0.0	85.54	1256
Subulura chinensis isolate ZW5 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2	737	737	60%	0.0	85.54	1256
Subuluroidea sp. N2 ITS1, 5.8S rRNA gene	691	691	60%	0.0	84.87	1166
Subuluroidea sp. EN11 ITS1, 5.8S rRNA gene	665	665	60%	0.0	84.41	1063
Subulura baeri isolate W5_Mr_99-15 ITS1, 5.8S rRNA gene	664	664	59%	0.0	84.46	1034
Subulura baeri isolate W6_Mm_70-15 ITS1, 5.8S rRNA gene	652	652	59%	0.0	84.33	1048
Subuluroidea sp. N26 ITS1, 5.8S rRNA gene	616	616	60%	$4x10^{-171}$	82.92	1100
Primasubulura cf. distans CS-2021 isolate adult-female ITS1, 5.8S rRNA gene	477	477	50%	$2x10^{-129}$	81.73	626
Primasubulura cf. distans CS-2021 isolate adult-male ITS1, 5.8S rRNA gene	440	440	49%	$3x10^{-118}$	81.26	605

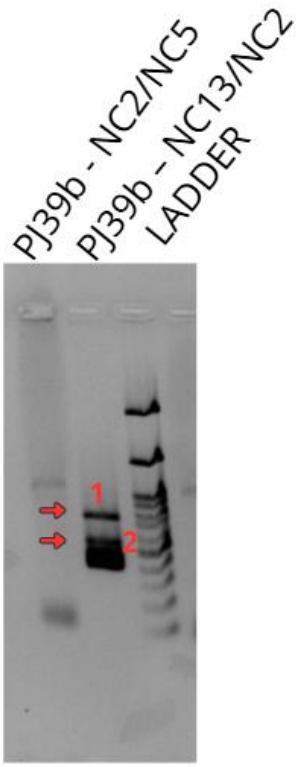


>Seq_1 length=
NNNNNNNNNNNNNNNNN

>Seq_2 length=389bp
ATTTAGTTTCTT**K**TC**S**TCC**KM**TTATTGATATG**S**TTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAG
GTCAAGTCATGAAAGGTCTTGBTGGAGCGCGGATCCVCCGTTTTCTCCGAGAAGCGCAAATGTG
CTGCGCGAGGAGCCGGCGAGACCGCTGCCAATGACTTTGAGGCGAGTCCGCGCACAGAGGCG
GGACAGACGCCCAACACCAAGCGTAGCTTGAGGGDGTAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
ACGGAATACC**R**AGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTYA**M**
ACTACTTATCG**M**ATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAAAACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCG
ATA

>Seq_3 length=357bp
TATTTAGTTTCGTTTCCTCC**KM**TTATTGATA**W**G**S**TTAAGTTCAGCGGGTATCCCTAC**M**TGATCCGA
GGTCAAGTCATGAAAGGTYYTGYTGGAGYGCGGAT**M**C**R**C**S**GTTTTCTCCGAGAAGCGCAAATGT
GCTGCGCGAGGAGCCGGCGAGACCGCTGCCAATGACTTTGAGGCGAGTCCGCGCACAGAGGC
GGGACAGACGCCCAACACCAAGCGTAGCTTGAGGGTGTAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCC
CACGGAATACCGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAA**M**GAT**K**CAATGATTCACTGAATTCTGC**RW**TTC
A**M**ACTAYTTATCG**M**ATTTCGCTGC**K**TTCTACATC**R**AT

Figura 10. Amplificação por PCR da região ITS2. O gel de agarose 1,5% mostra a amplificação da reguião ITS2 das amostras PJ39b e PJ24c. A região ITS1 não falhou em amplificar. As setas e numerações (1, 2 e 3) indicam bandas específicas selecionadas para sequenciamento. Abaixo do gel, são apresentadas as sequências nucleotídicas representativas obtidas a partir dos produtos amplificados, em formato FASTA, com indicação do comprimento dos fragmentos. N representa falha no sequenciamento. A presença de nucleotídeos ambíguos (K,M,R,S,W) reflete regiões de baixa qualidade de leitura no sequenciamento.



>Seq_1 length=
NNNNNNNNNNNNNN

>Seq_2 length=428bp
TTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCCATCTGATTTGAGGT
CAAACGCAAAGTAAAATTGGAGGCGAAAAAAAATCGCCTTCTTCATTTTAAGCCCAGAGCTCTCCT
CGTGCAGCAGCTCAAAACCGACTACTTCAGCGCAGATAAAATATCACACCGTTTCGTCAGTCTTG
CCCCGCGCAAGACTCTGCAGGCAACAATGCATTTCGAGACGAGCCGTCGAACTAGCGACAGCAC
AGTCCAAGTCCATTTCACCCGAAGGGAAATGAGAGATTAACGTGACACTCAAACAGACGTGCCCC
TCGGAAAACCGAGCGGCGCAAGATGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC
ATTACGTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATG

Figura 11. Amplificação por PCR da região ITS1/2 utilizando os primers NC2/NC5 e ITS2 com os primers NC13/NC2 da amostra PJ39b, visualizadas em gel de agarose 1,5%. As setas (1,2) indicam bandas da amplificação da região ITS2 selecionadas para purificação e sequenciamento. Abaixo do gel são apresentadas as sequências obtidas em formato FASTA, com indicação do comprimento dos fragmentos. N representa falha no sequenciamento.

5.2 Análise Filogenética

A análise filogenética de Máxima Verossimilhança (PhyML) baseada na região ITS1, 5.8S, ITS2 revela um posicionamento filogenético bem definido da amostra PJ ITS1/2, caracterizado por uma forte divergência genética (Figura 12). A amostra PJ ITS1/2 posiciona-se como grupo irmão do clado principal que agrupa os nematódeos da família Subuluridae (representados aqui por *Subulura chinensis*, *Primasubulura*

cf. distans, Subuluroidea sp. e *Subulura baeri*). O agrupamento que une a amostra PJ ITS1/2 a esse clado de Subuluridae possui um valor de suporte de 94%, o que indica uma confiabilidade estatística alta para essa relação de parentesco. Embora seja próxima a eles, a amostra não se insere dentro dos gêneros Subulura ou Primasubulura. O nó que separa estritamente o clado desses gêneros da amostra PJ ITS1/2 possui um suporte ainda mais robusto, de 98%. O comprimento da linha horizontal (ramo) que leva diretamente à amostra PJ ITS1/2 é muito mais longo do que o de qualquer outra sequência na árvore.

O clado composto por PJ ITS1/2 + Subuluridae compartilha um ancestral comum mais antigo com a espécie *Passalurus ambiguus* (nó com suporte de 91%). As espécies *Physaloptera tupinambae* e *Oesophagostomum columbianum* aparecem nas posições mais basais da árvore, servindo como grupos externos mais distantes.

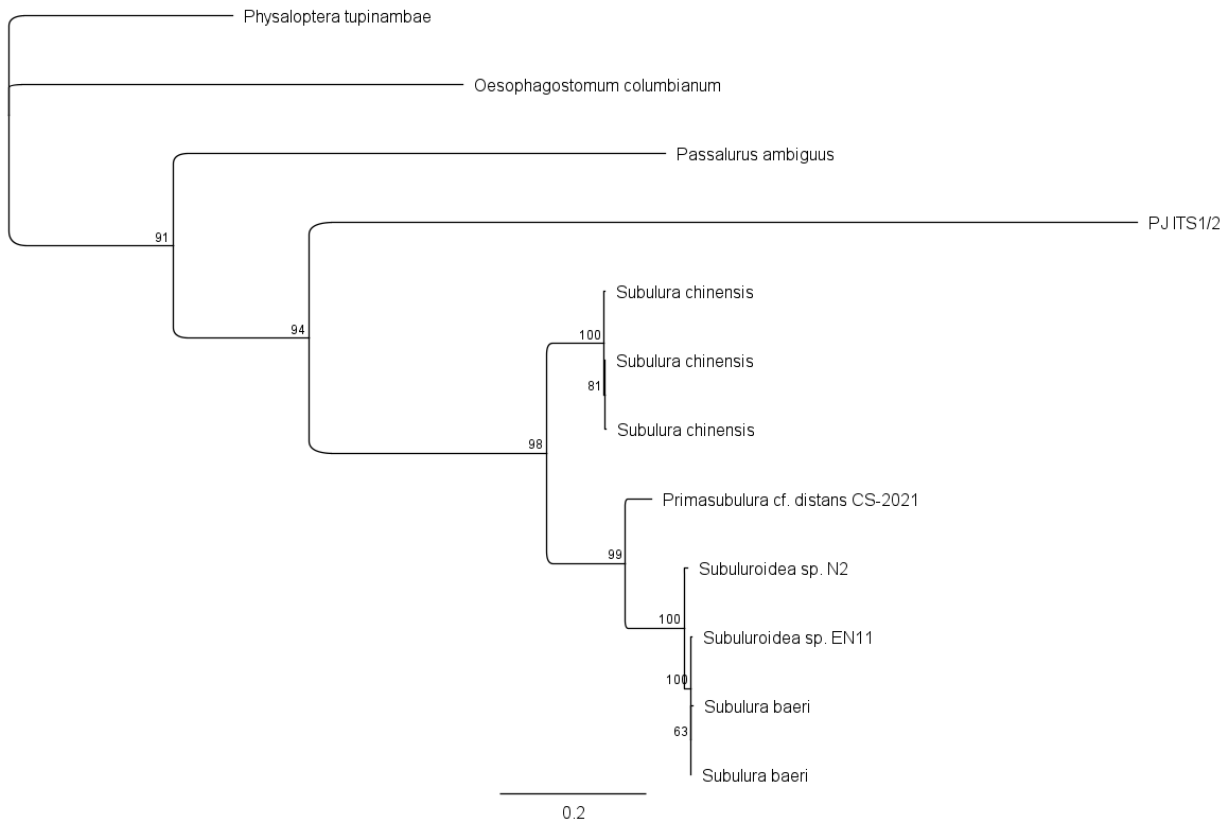


Figura 12. Árvore filogenética de inferência baseada em sequências da região ITS1, rRNA 5.8S, ITS2. Os valores nos nós representam o suporte de bootstrap (100 réplicas). A amostra gerada neste estudo é PJ ITS1/2.

A análise filogenética baseada na região do espaçador transcrito interno 2 (ITS2) foi realizada para avaliar a posição taxonômica das amostras PJ39B-B2, PJ24 SS e PJ24 S8, inicialmente triadas como o nematódeo *Primasubulura jacchhi*. A topologia da árvore consensus (Figura 13) revelou uma clara separação filogenética entre os táxons de referência de Nematoda e as sequências obtidas neste estudo.

O clado correspondente à superfamília Subuluroidea e ao gênero relacionado Physaloptera (Ordem Spirurida) foi recuperado com alto valor de suporte de bootstrap (95%), validando a acurácia do alinhamento para os táxons de referência. Dentro de Subuluroidea, o gênero Primasubulura (*P. cf. distans*) divergiu do clado composto pelas espécies de Subulura (*S. chinensis* e *S. baeri*) com suporte moderado (84%). Contudo, as relações internas do gênero Subulura exibiram baixos valores de suporte (38% e 39%), sugerindo uma saturação nucleotídica ou resolução limitada do marcador ITS2 para discriminar estas espécies terminais de forma robusta.

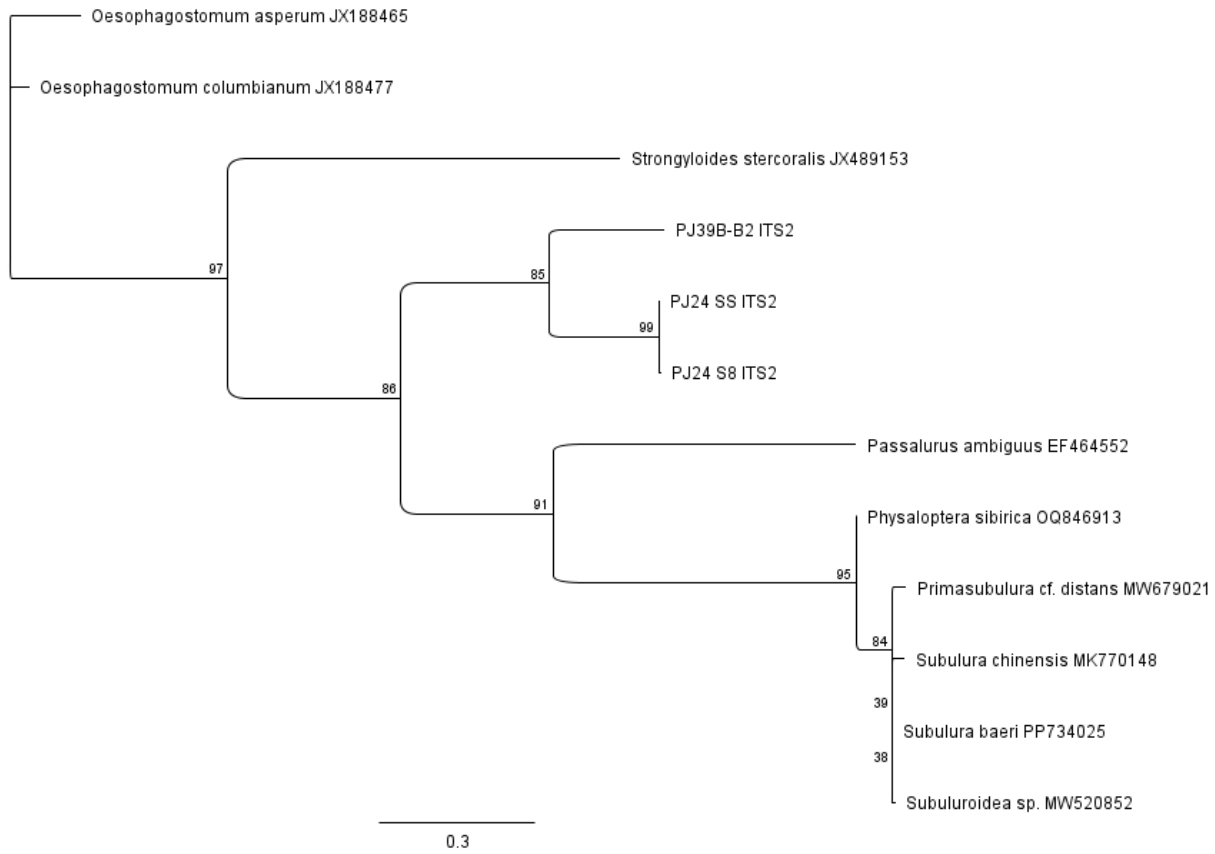


Figura 13. Árvore filogenética de inferência baseada em sequências da região ITS2. Os valores nos nós representam o suporte de bootstrap (100 réplicas). As amostras geradas neste estudo são PJ39B-B2 ITS2, PJ24 SS ITS2, PJ24 S8 ITS2.

Divergindo drasticamente da hipótese taxonômica inicial, as sequências geradas neste trabalho (PJ39B-B2, PJ24 SS e PJ24 S8) agruparam-se em um clado monofilético isolado e altamente suportado (85% e 99%), posicionando-se fora de toda a radiação dos nematódeos da ordem Spirurida (91% de suporte de divergência).

A análise de homologia local por BLASTn elucidou a natureza dessa divergência, revelando que as sequências obtidas apresentaram alta identidade com fungos dos gêneros Periconia e Dothideomycetes (Ascomycota), e Myxarium e Exidia (Basidiomycota) (Tabela 12).

Tabela 12. Análise por Blastn da sequencia gerada pelo sequenciamento das amostras PJ39B-B2, PJ24_SS e PJ24_S8 amplificadas com os primer NC13-NC2.

Identificação	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len
PJ39B-B2-ITS2						
Myxarium minutissimum	632	632	99%	$2x10^{-176}$	93.26	819
uncultured Exidia	610	610	96%	$7x10^{-170}$	93.13	453
Myxarium fugacissimum	610	610	99%	$7x10^{-170}$	92.56	1022
uncultured Exidia	610	610	96%	$7x10^{-170}$	93.13	453
Myxarium podlachicum	610	610	99%	$7x10^{-170}$	92.56	1009
uncultured fungus	595	595	96%	$2x10^{-165}$	92.58	418
PJ24_SS_ITS2						
Periconia sp.	481	481	91%	$4x10^{-131}$	92.21	476
Dothideomycetes sp.	481	481	91%	$4x10^{-131}$	92.21	551
Periconia sp. LS4-MRL	481	481	91%	$4x10^{-131}$	92.21	492
Dothideomycetes sp. genotype 191	481	481	91%	$4x10^{-131}$	92.21	1080
Periconia sp.	481	481	91%	$4x10^{-131}$	92.21	623
PJ24_S8_ITS2						
Periconia sp.	366	366	84%	$1x10^{-96}$	85.92	476
Periconia cynodontis	366	366	84%	$1x10^{-96}$	85.92	601
Dothideomycetes sp.	366	366	84%	$1x10^{-96}$	85.92	551
Periconia sp. LS4-MRL	366	366	84%	$1x10^{-96}$	85.92	492
Dothideomycetes sp. genotype 191	366	366	84%	$1x10^{-96}$	85.92	1080

6. DISCUSSÃO

A aplicação de ferramentas moleculares na sistemática de helmintos tem promovido avanços significativos na delimitação taxonômica e na compreensão das relações evolutivas em grupos tradicionalmente definidos com base em caracteres morfológicos (Blaxter et al., 1998; Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011). No caso dos nematódeos intestinais associados a primatas neotropicais, entretanto, ainda persiste uma lacuna considerável de dados moleculares, especialmente para táxons pertencentes à família Subuluridae. Essa limitação impõe desafios tanto para a confirmação específica quanto para a inferência filogenética robusta.

No presente estudo, o principal resultado obtido foi a amplificação e o sequenciamento bem-sucedido da região ITS1, rRNA 5.8S e ITS2 de um *pool* de 10 nematóides (amostra PJ ITS1/2). A região ITS (Internal Transcribed Spacer), compreendendo ITS1, 5.8S e ITS2, tem sido amplamente empregada em estudos de nematódeos parasitos por apresentar combinação ideal entre conservação estrutural que permite alinhamento confiável e variabilidade nucleotídica suficiente para discriminação interespecífica (Gasser et al., 1993; Chilton, 2004; Nadler & Hudspeth, 2000). Nossos resultados sugerem que a amostra PJ ITS1/2 pertence a uma linhagem evolutiva que compartilha um ancestral comum recente com os nematódeos Subuluridae, mas que passou por um processo de evolução acelerada ou isolamento prolongado, resultando em uma sequência ITS bastante divergente das sequências de Subulura e Primasubulura atualmente depositadas nos bancos de dados. Tomando como referência a barra de escala no rodapé (0.2 substituições por sítio), esse ramo longo demonstra que a sequência da região ITS1-5.8S-ITS2 desta amostra acumulou uma quantidade significativamente maior de mutações/substituições nucleotídicas ao longo da evolução em comparação com os outros táxons correlatos. No entanto, este resultado carece de confirmação com o sequenciamento e análise de amostras individuais de parasitas.

Diante das dificuldades de amplificação das sequencias das regiões ITS com amostras de um único parasita, adotou-se uma abordagem alternativa com o uso da enzima Platinum SuperFi II, uma DNA polimerase de alta fidelidade recomendado para alvos complexos ou de baixa qualidade de DNA. Essa estratégia resultou em melhora significativa na amplificação para parte das amostras. No entanto, mesmo

com a SuperFi II, algumas amostras ainda não apresentaram amplificação, reforçando a variabilidade intrínseca do material genético disponível.

De forma geral, o processo de otimização exigiu a aplicação de múltiplos protocolos e condições experimentais. Não houve um único protocolo capaz de amplificar todas as amostras de maneira consistente; entretanto, determinadas combinações de reagentes e programas térmicos demonstraram maior eficiência. Os resultados de amplificação e sequenciamento de amostras individuais foram mais eficazes para a região ITS2 (NC13/NC2) do que para as demais reações (NC5/NC2, SS1/SS2).

O sequenciamento da região ITS2 do DNA ribossomal em duas amostras (PJ39B e PJ24C), morfologicamente compatíveis com *Primasubulura jacchi*, e a análise de homologia local por BLASTn elucidou a natureza de divergência filogenética, revelando que as sequências obtidas apresentaram alta identidade com fungos dos gêneros Periconia (Ascomycota), Myxarium e Exidia (Basidiomycota).

Este resultado evidencia um evento clássico de amplificação inespecífica via PCR, decorrente das seguintes pressões biológicas e metodológicas: (1) Inespecificidade de primers universais: Os oligonucleotídeos universais frequentemente desenhados para a região ITS de nematódeos compartilham sítios de hibridização altamente conservados com o rDNA fúngico, predispondo a reações cruzadas na presença de DNA heterólogo. (2) Ecologia Alimentar do Hospedeiro: O nematódeo *P. jacchhi* é um parasita do trato gastrointestinal do sagui (*Callithrix jacchus*). Este primata possui hábito marcadamente guminívoro e insetívoro, forrageando ativamente em cascas de árvores e madeira em decomposição — microhabitats estritamente associados ao desenvolvimento de fungos gelatinosos/saprófitas (como Protomerulius) e fungos endófitos/ambientais (como Periconia). (2) Copurificação de Esporos: Os esporos fúngicos ingeridos pelo hospedeiro aderem externamente à cutícula do nematódeo ou concentram-se em seu trato digestivo. Devido à robustez da parede celular fúngica e à abundância de esporos, o DNA desses microrganismos foi preferencialmente coextraído e amplificado em detrimento do DNA do parasita.

Diante disso, conclui-se que o marcador ITS2, embora eficiente para a sistemática de referências depositadas no GenBank, apresentou severas limitações práticas para o diagnóstico molecular direto dessas amostras sem uma triagem prévia contra o Reino Fungi. Para a elucidação da filogenia real de *P. jacchhi*, faz-se

necessária a adoção de lavagens seriadas rigorosas nos espécimes antes da extração, bem como o desenho de primers exclusivos para nematoides ou a migração para marcadores mitocondriais, como o Citocromo Oxidase I (COI).

A presença de *Primasubulura jacchi* em primatas provenientes da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado deve ser interpretada dentro de um contexto ecológico caracterizado pela fragmentação da paisagem. A região apresenta um mosaico de fragmentos florestais inseridos em matriz antrópica, o que altera significativamente a dinâmica ecológica das populações de hospedeiros e parasitas (ICMBio, 2018).

Ambientes fragmentados tendem a aumentar a densidade local de indivíduos e a sobreposição de áreas de uso, favorecendo o contato direto e indireto entre hospedeiros. Esse cenário pode facilitar a transmissão de parasitas, especialmente aqueles com ciclo de vida indireto, como é o caso de *P. jacchi*, que depende de hospedeiros intermediários artrópodes (Nunn & Altizer, 2006).

A presença de saguis híbridos (*Callithrix penicillata* × *Callithrix jacchus*) na região também pode influenciar essa dinâmica. Essas populações apresentam elevada plasticidade ecológica, ocupando diferentes nichos e explorando variados recursos alimentares, o que aumenta a probabilidade de contato com hospedeiros intermediários e, consequentemente, a exposição a parasitas (Malukiewicz et al., 2015; Ruiz-Miranda et al., 2000).

Em ambientes fragmentados, a alteração das interações ecológicas pode intensificar processos de spillover e spillback entre hospedeiros filogeneticamente próximos (Daszak et al., 2000; Nunn & Altizer, 2006). Esses processos não apenas afetam a epidemiologia das infecções, mas também podem influenciar a estrutura genética das populações parasitárias ao longo do tempo. Estudos em sistemas envolvendo primatas demonstram que a proximidade filogenética entre hospedeiros favorece o compartilhamento de helmintos e pode gerar padrões complexos de diversificação parasitária (Pedersen et al., 2005; Streicker et al., 2010). Portanto, as pequenas diferenças observadas entre PJ39B e PJ24C podem refletir esse cenário ecológico dinâmico.

A integração entre abordagens morfológicas e moleculares é considerada essencial na sistemática moderna de helmintos, uma vez que permite superar limitações inerentes a cada método quando utilizado isoladamente (Hajibabaei et al., 2007; De Ley & Blaxter, 2002). Essa abordagem combinada é particularmente

relevante em grupos com alta similaridade morfológica, nos quais a identificação baseada apenas em características anatômicas pode ser insuficiente.

6.1 Limitações do estudo

Apesar dos resultados promissores, algumas limitações devem ser reconhecidas. A dificuldade na amplificação de determinadas regiões usando primers universais restringe a possibilidade de comparações entre diferentes marcadores moleculares. Além disso, o número limitado de amostras com amplificação bem-sucedida pode reduzir a robustez das inferências filogenéticas.

A não amplificação do DNA do nematoide, devido a preferência a amplificação pelo genoma dos esporos de fungos que, possivelmente, estavam contaminando os espécimes de *P. Jachhi* obtidos do trato gastrointestinal de saguis.

Outra limitação importante refere-se à ausência de associação individual entre os parasitas analisados e seus respectivos hospedeiros, o que impede análises mais detalhadas sobre padrões de infecção e especificidade parasitária. Essas limitações são comuns em estudos com material previamente coletado e reforçam a importância de protocolos padronizados de amostragem.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo estabelecer e otimizar protocolos para amplificação molecular de helmintos intestinais associados a primatas neotropicais, com ênfase na caracterização filogenética de nematódeos morfologicamente compatíveis com *Primasubulura jacchi*. Os resultados sugerem que estes parasitas, representados pela amostra PJ ITS1/2, pertencem a uma linhagem evolutiva que compartilha um ancestral comum com os nematódeos Subuluridae, mas que amostra acumulou uma grande quantidade de mutações/substituições nucleotídicas ao longo do processo evolutivo, resultando em uma sequência ITS bastante divergente das sequências de Subulura e Primasubulura atualmente depositadas nos bancos de dados. Nosso resultados também demonstram que, dentre os marcadores avaliados, a região ITS2 do DNA ribossomal amplificado se refere a contaminantes de fungos, que, provavelmente, estavam associados à cutícula dos

parasitas *P. Jachhi* coletados do trato gastrointestinal de saguis híbridos do gênero Callithrix.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. C. *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. 2. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2000.

ARCHIE, E. A.; EZENWA, V. O. Population genetic structure and history of parasite populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 278, n. 1709, p. 2121–2131, 2011.

BALLOU, J. D.; GILPIN, M.; FOOSE, T. J. *Population management for survival and recovery: analytical methods and strategies in small population conservation*. New York: Columbia University Press, 1995.

BERTHET, N. et al. Mass mortality in non-human primates due to yellow fever in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 27, n. 1, p. 1–9, 2021.

BLAXTER, M. L. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 359, p. 669–679, 2004.

BLAXTER, M. L. et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, v. 392, p. 71–75, 1998.

BLOUIN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 527–531, 2002.

BRASIL. Decreto s/nº, de 16 de setembro de 2002. Cria a Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, no Estado do Rio de Janeiro, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 17 set. 2002.

CASTRO, J. C. S. G. *[Inserir título completo da dissertação]*. 2024. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2024.

CDB – CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. *Global Biodiversity Outlook 5*. Montreal: Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2020.

CHILTON, N. B. The use of ribosomal DNA markers for studies of helminth systematics and epidemiology. *International Journal for Parasitology*, v. 34, p. 1207–1217, 2004.

CRISCIONE, C. D. et al. Landscape genetics reveals host-specific parasite gene flow in a nematode. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 1345–1356, 2005.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science*, v. 287, p. 443–449, 2000.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 85, p. 407–415, 2005.

DESALLE, R.; EGAN, M. G.; SIDDALL, M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 360, p. 1905–1916, 2005.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D. L. (ed.). *The biology of nematodes*. London: Taylor & Francis, 2002. p. 1–30.

DIETZ, J. M. et al. Population decline of Atlantic Forest primates due to yellow fever outbreaks. *Biological Conservation*, v. 237, p. 149–158, 2019.

DOBSON, A. P. Restoring island ecosystems: the potential of parasites to control introduced mammals. *Conservation Biology*, v. 2, n. 1, p. 31–39, 1988.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 34, p. 487–515, 2003.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v. 3, p. 294–299, 1994.

FRITTS, T. H.; RODDA, G. H. The role of introduced species in the degradation of island ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 29, p. 113–140, 1998.

GARCÍA-VARELA, M.; NADLER, S. A. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala inferred from SSU and LSU rDNA sequences. *Journal of Parasitology*, v. 91, p. 1401–1409, 2005.

GASSER, R. B. et al. Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification. *Molecular and Cellular Probes*, v. 7, p. 213–218, 1993.

HADDAD, N. M. et al. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances*, v. 1, n. 2, e1500052, 2015.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, v. 23, n. 4, p. 167–172, 2007.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 270, p. 313–321, 2003.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, v. 66, n. 4, p. 411–453, 1991.

ICMBIO. *Plano de ação nacional para a conservação dos primatas da Mata Atlântica*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018.

KIERULFF, M. C. M. et al. The Golden Lion Tamarin *Leontopithecus rosalia*: a conservation success story. *International Zoo Yearbook*, v. 46, p. 36–45, 2012.

MALUKIEWICZ, J. et al. Hybridization effects and the conservation of two species of marmosets in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, v. 24, p. 2703–2718, 2015.

MORAIS JÚNIOR, M. M. de et al. Population structure of introduced marmosets in Brazil. *Neotropical Primates*, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2008.

MORAIS JÚNIOR, M. M. de et al. Ecological interactions of introduced *Callithrix*. *American Journal of Primatology*, v. 72, n. 1, p. 1–10, 2010.

NADLER, S. A.; HUDSPETH, D. S. Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea. *Journal of Parasitology*, v. 86, p. 380–393, 2000.

NADLER, S. A.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Integrating molecular and morphological approaches for parasitic nematode systematics. *Journal of Parasitology*, v. 97, p. 1096–1106, 2011.

NUNN, C. L.; ALTZIZER, S. *Infectious diseases in primates: behavior, ecology and evolution*. Oxford: Oxford University Press, 2006.

PEDERSEN, A. B. et al. Patterns of host specificity and transmission among parasites of wild primates. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 647–657, 2005.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; NADLER, S. A. What we don't recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species. *Journal of Parasitology*, v. 96, p. 453–464, 2010.

POULIN, R.; MORAND, S. *Parasite biodiversity*. Washington: Smithsonian Institution Press, 2004.

POULIN, R. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *International Journal for Parasitology*, v. 44, p. 581–589, 2014.

READ, C. P. *Parasitism and symbiosis*. New York: Ronald Press, 1974.

RESENDE, J. A. et al. Helmintos de *Callithrix jacchus* no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 11, n. 1, p. 123–130, 1994.

ROCHA, C. F. D. et al. The remnants of Atlantic Forest in Rio de Janeiro. *Biotropica*, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2003.

RUIZ-MIRANDA, C. R. et al. Introduced marmosets and their ecological impacts. *Biological Conservation*, v. 94, n. 2, p. 1–7, 2000.

RUIZ-MIRANDA, C. R. et al. Reintroduction and conservation of the golden lion tamarin in Brazil. *Oryx*, v. 53, n. 1, p. 109–115, 2019.

RYLANDS, A. B.; FARIA, D. S. Habitats, feeding ecology and home range size in the genus *Callithrix*. In: RYLANDS, A. B. (Ed.). *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour and ecology*. Oxford: Oxford University Press, 1993.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The diversity of the New World primates (Platyrrhini). In: MITTERMEIER, R. A. et al. *Handbook of the mammals of the world*. Barcelona: Lynx Edicions, 2009.

RYLANDS, A. B. et al. Conservation status of the golden lion tamarin. *Neotropical Primates*, v. 10, n. 2, p. 1–8, 2002.

SANTOS, C. V. et al. Distribution of introduced marmosets. *Neotropical Primates*, v. 14, n. 2, p. 1–5, 2007.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SILVA, I. O. et al. Hybridization and conservation of *Callithrix*. *Primates*, v. 59, n. 3, p. 1–10, 2018.

SIMBERLOFF, D. et al. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 28, n. 1, p. 58–66, 2013.

SOLÓRZANO-GARCÍA, B.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Parasites of neotropical primates: a review. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 7, p. 155–182, 2018.

STREICKER, D. G. et al. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus. *Science*, v. 329, n. 5992, p. 676–679, 2010.

THOMPSON, R. C. A.; KUTZ, S. J.; SMITH, A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. *International Journal for Environmental Research and Public Health*, v. 7, p. 678–693, 2010.

VITOUSEK, P. M. et al. Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zealand Journal of Ecology*, v. 21, n. 1, p. 1–16, 1997.

WOODROFFE, R.; GINSBERG, J. R. Edge effects and the extinction of populations. *Science*, v. 280, n. 5372, p. 2126–2128, 1998.

YAMAGUTI, S. *Systema helminthum: nematodes of vertebrates*. New York: Interscience Publishers, 1963.