

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE CONSERVAÇÃO DA
NATUREZA

Gabriel Faria Sell

Inferências evolutivas com base na filogenia molecular de Spiruromorpha (De Ley & Blaxter, 2002) (Nematoda: Rhabditida)

Juiz de Fora

2023

Gabriel Faria Sell

Inferências evolutivas com base na filogenia molecular de Spiruromorpha (De Ley & Blaxter, 2002) (Nematoda: Rhabditida)

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação da natureza.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Maturano Pinheiro

Coorientadora: Profa. Dra. Sueli de Souza Lima

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sell, Gabriel Faria.

Inferências evolutivas com base na filogenia molecular de Spiruromorpha (De Ley & Blaxter, 2002) (Nematoda: Rhabditida) / Gabriel Faria Sell. -- 2023.

36 f. : il.

Orientador: Ralph Maturano Pinheiro

Coorientadora: Sueli de Souza Lima

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2023.

1. Filogenia. 2. Evolução. 3. Spiruromorpha. I. Pinheiro, Ralph Maturano, orient. II. Souza Lima, Sueli de, coorient. III. Título.

Gabriel Faria Sell

Inferências evolutivas com base na filogenia molecular de Spiruromorpha (De Ley & Blaxter, 2002) (Nematoda: Rhabditida)

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Biodiversidade e
Conservação da
Natureza
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Biodiversidade e
Conservação da
Natureza. Área de
concentração: Comportamento,
Ecologia e
Sistemática.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ralph Maturano Pinheiro - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Sueli de Souza Lima - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Luís Cláudio Muniz Pereira

Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Philippe Vieira Alves

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Juiz de Fora, 30/01/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Ralph Maturano Pinheiro, Professor(a)**, em 28/02/2023, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Philippe Vieira Alves, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luís Cláudio Muniz Pereira, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sueli de Souza Lima, Professor(a)**, em 22/03/2023, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1131289** e o código CRC **F4D0ECDB**.

Dedico à Cida, Anderson e Thamires, que sempre me incentivaram, e a todos aqueles que contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais (especialmente minha mãe) e a minha irmã que estiveram ao meu lado nos tempos difíceis durante a realização do trabalho. Aos meus amigos mais próximos (Nathan, Itamar, Thiago, Amanda) e ao Manoel que me aturaram, acolheram e me distraíram nos momentos que eu precisei. À professora Sueli de Souza Lima que sempre foi e será um exemplo e uma fonte de inspiração e conhecimento não só acadêmico como humano. Ao professor Ralph Maturano Pinheiro por ter me acolhido na pós graduação e ter sempre demonstrado uma calma contagiante que foi essencial para a conclusão do trabalho.

Também agradeço à professora Mariana Fonseca Rossi que auxiliou valiosamente a realização do trabalho no sentido metodológico. Aos meus colegas do LABTECH Odile Bain, que foram meus companheiros em momentos diversos durante minha passagem por lá. À UFJF por ter sido um local de desenvolvimento e aprendizado que possibilitou a realização deste trabalho e à CAPES que permitiu o acesso, por meio de apoio financeiro, a ferramentas essenciais para que eu pudesse realizar essa pesquisa.

E finalmente agradeço a todos aqueles que acreditaram em mim e ficaram ao meu lado durante os momentos de tristeza e alegria.

RESUMO

O desenvolvimento de novas técnicas para o estudo da evolução de características dos nematoides trouxe soluções para diversos problemas encontrados nos estudos clássicos. Porém, também surgiram diversos obstáculos para a resolução de questões importantes, como a incompatibilidade entre dados moleculares e morfológicos, bem como o enviesamento de dados. Alguns estudos prévios já levantaram dados e hipóteses sobre o surgimento de estados de caracteres observáveis nas espécies viventes, no entanto ainda existem muitos questionamentos acerca do valor desses caracteres no sucesso evolutivo dos nematoides parasitos. A infraordem Spiruromorpha, por exemplo, é representada atualmente por dez superfamílias de espécies morfológicamente heterogêneas, caracterizadas por nematoides com modo de vida parasitário e com ciclos de vida heteroxenos. Com o objetivo de elucidar as relações evolutivas em Spiruromorpha associando fatores como os diferentes tipos de estruturas cefálicas, o tipo de mecanismo termorregulador dos hospedeiros vertebrados e o sítio infecção nos mesmos, dados genéticos da região 18S RNAr disponíveis em biorepositórios eletrônicos foram coletados e processados para uma reconstrução filogenética e posterior estimativa de sinal filogenético de caracteres e seus estados. As estruturas cefálicas representam uma característica morfológica de grande importância para a taxonomia e demonstraram, através do sinal positivo, ter uma influência direta no processo evolutivo das espécies. O mecanismo fisiológico de termorregulação do hospedeiro vertebrado e o sítio de infecção do parasito no hospedeiro também representaram um valor significativo na análise proposta, o que demonstra que os estados associados a estes caracteres foram determinantes para o sucesso evolutivo das espécies estudadas.

Palavras-Chave: Sinal filogenético, Hospedeiro vertebrado, Sítio de infecção.

ABSTRACT

The development of new techniques for studying the evolution of nematode traits has brought solutions to several problems encountered in classical studies. However, several obstacles have also arisen to resolve important issues, such as incompatibility between molecular and morphological data, as well as data bias. Some previous studies have already raised data and hypotheses about the emergence of observable character states in living species, however there are still many questions about the value of these characters in the evolutionary success of parasitic nematodes. The infraorder Spiruromorpha, for example, is currently represented by ten superfamilies of morphologically heterogeneous species, characterized by nematodes with a parasitic and heteroxenous lifestyle. In order to elucidate the evolutionary relationships in Spiruromorpha by associating factors such as the different types of cephalic structures, the type of vertebrate host thermoregulatory mechanism, and the infection site, genetic data from the 18S rRNA region available in electronic biorepositories were collected and processed for phylogenetic reconstruction and subsequent phylogenetic signal estimation of characters and their states. The cephalic structures represent a morphological trait of great importance for taxonomy and demonstrated through the positive sign to have a direct influence on the evolutionary process of the species. The physiological mechanism of thermoregulation of the vertebrate host and the site of infection of the parasite in the host also represented a significant value in the proposed analysis, which demonstrates that the states associated with these characters were paramount to the evolutionary success of the species studied.

Keywords: Phylogenetic signal, Vertebrate host, Infection site.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
IB	Inferência Bayesiana
s	Valor de Suporte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossomal
DNAr	DNA ribossomal
SSU	Sub unidade
Pb	par(es) de base(s)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida heteroxeno com inclusão de hospedeiro(s) paratênico(s).....	12
Figura 2 - Cladograma associado aos estados de caracteres considerados, grupo de hospedeiros vertebrados e superfamílias das espécies de Spiruromorpha.....	17
Figura 3 – Clado formado por representantes das superfamílias Camallanoidea, Filarioidea, Habronematoidea, Thelazioidea, Spiruroidea e Diplotriaenoidea.....	20
Figura 4 – Clado I correspondente a Filarioidea.....	21
Figura 5 – Clado II correspondente a Filarioidea.....	21
Figura 6 – Clados I correspondente a Thelazioidea.....	22
Figura 7 – Clados II e III correspondentes a Thelazioidea.....	23
Figura 8 – Clados associados a Physalopteroidea.....	24
Figura 9 – Cladograma associado ao tipo de termorregulação do hospedeiro vertebrado....	27
Figura 10 – Cladograma associado ao Sítio de infecção no hospedeiro vertebrado.....	29
Figura 11 – Cladograma associado aos tipos de estruturas cefálicas dos parasitos.....	31
Figura 12 – Interesse ao longo do tempo sobre o termo “Phylogeny” de 01/01/2010 a 01/01/2023.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.2	RESULTADOS.....	16
2.3	DISCUSSÃO.....	18
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
4	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, a sistemática dos nematoides foi baseada apenas em aspectos morfológicos e biológicos, como características do sistema digestório, órgãos reprodutivos, região anterior e região posterior, especificidade de hospedeiro e características do ciclo biológico (DURETTE-DESSET *et al.*, 1994).

VIEIRA *et al.* (2017), ressaltam que um dos problemas que persistem neste tipo de estudo é de que as identificações específicas baseadas apenas em abordagens tradicionais podem ser trabalhosas, já que certas espécies apresentam grande similaridade morfológica e, em alguns casos, descrições de espécies antigas foram baseadas em um pequeno número de espécimes, com poucas ilustrações devido à baixa quantidade de material, problemas na conservação e tecnologia disponível na época.

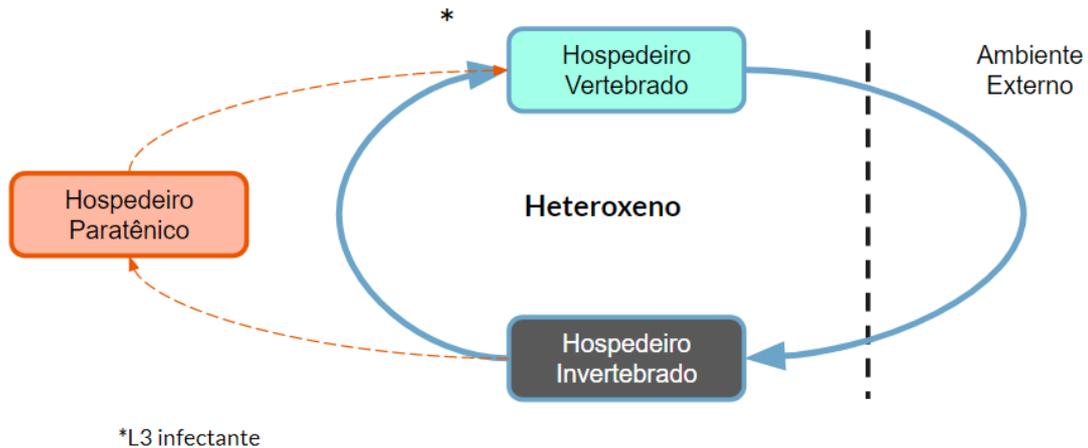
Com o avanço e a combinação de tecnologias e técnicas, vários problemas foram solucionados no estudo da filogenia dos nematoides, como a dificuldade de caracterizar traços morfológicos, juntamente com alto nível de homoplasia e falta de informação sobre a biologia de diversos grupos, que levou a problemas na determinação das relações filogenéticas dos nematoides por muitos anos, como discutido por CHILTON *et al.* (1997); ČERNOTÍKOVÁ *et al.* (2011). Contudo, novos problemas também foram levantados, como incompatibilidade de dados com a taxonomia morfológica e o enviesamento de dados causado por escassez de informações suficientes (ČERNOTÍKOVÁ *et al.*, 2011) por conta da falta de dados para grupos específicos e da ausência de registros fósseis de nematoides.

No final da década de 1990, as primeiras análises filogenéticas moleculares extensas dos nematoides parasitos foram publicadas por BLAXTER *et al.* (1998). Como resultados destas análises, os nematoides Spirurida (atual Rhabditida) foram caracterizados e organizados em um clado separado, denominado 'clado III' pelos autores (BLAXTER *et al.*, 1998, NADLER *et al.*, 2007), que foi posteriormente revisado no novo sistema de classificação proposto por DE LEY & BLAXTER (2002; 2004).

Na revisão do sistema de classificação publicada por DE LEY & BLAXTER, 2002, suportada por filogenias inferidas com base em sequências de SSU (18S) DNAr, foi proposto que as ordens desse clado fossem realocadas com infraordens da subordem Spirurina, que por sua vez foi alocada na ordem Rhabditida e renomeadas como Ascaridomorpha, Spiruromorpha, Rhigonematomorpha e Oxyuridomorpha.

A Infraordem Spiruromorpha consiste em um conjunto heterogêneo de nematoides que possuem modo de vida parasitário (HONISCH & KRONE, 2008). Além de se caracterizarem pelos ciclos heteroxenos com eventuais participações de hospedeiros paratênicos (Figura 1), seus representantes apresentam simetria bilateral na extremidade anterior e têm como sítio de infecção uma grande variedade de órgãos e sistemas (ANDERSON *et al.*, 1974). Existem ao todo 10 superfamílias incluídas em Spiruromorpha (HODDA, 2007), sendo elas: Camallanoidea Travassos, 1920; Filarioidea Chabaud & Anderson, 1959; Thelazioidea Skrjabin, 1915; Habronematoidea Ivaschkin, 1961; Diplostriaenoidea Anderson, 1958; Physalopteroidea Railliet, 1893; Spiruroidea Oerley, 1885; Acuárioidea Henry & Sisoff, 1912; Rictularioidea Railliet, 1916; Aproctoidea Skrjabin & Shikhobalova, 1945. Segundo a caracterização realizada por ANDERSON (1974) algumas superfamílias de nematoides alocadas em Spiruromorpha apresentam algum tipo de ornamentação cefálica, que auxilia na sua classificação taxonômica, como por exemplo em Acuárioidea (Henry & Sisoff, 1912), Diplostriaenoidea (Anderson, 1958) e Habronematoidea (Ivaschkin, 1961).

Figura 1 – Ciclo de vida heteroxeno com inclusão de hospedeiro(s) paratênico(s).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Dentre as estruturas anteriores responsáveis pelas identidades dos táxons incluídos nesta infraordem, podemos encontrar lábios, pseudolábios e papilas, além de ornamentações complexas originadas de projeções cuticulares da região anterior como escudos, espinhos e lâminas, e também as de origens e funções ainda discutidas, como os cordões cefálicos e colaretes (CHITWOOD & WEHR, 1934).

Estudos sobre o ciclo biológico indicam que os artrópodes são presumidamente hospedeiros intermediários em potencial. Muitas espécies de vertebrados se alimentam de

pequenos artrópodes, e devido a isso ficam expostas à infecções por diversos parasitos que incluem em seu ciclo animais invertebrados, dentre estes os Spiruromorpha. A infecção do hospedeiro definitivo ou vertebrado por estes nematóides ocorre pela ingestão direta ou indireta dos hospedeiros invertebrados ou pela ingestão de peixes, anfíbios, pequenas aves ou mamíferos que atuam como hospedeiros paratênicos (ANDERSON, 2000).

Com relação às questões evolutivas em Nematoda, é proposto que a transição para o modo de vida parasitário surgiu pelo menos quinze vezes ao longo da história evolutiva do grupo (BLAXTER & KOUTSOVOLOS, 2015). Isso se relaciona fortemente com as observações feitas na publicação de CHABAUD & BAIN (1994), que afirmam que a explosão evolutiva de um grupo de vertebrados traz a possibilidade de exploração de muitos novos nichos.

Incluindo parasitos de grande importância médica e médico veterinária, a infraordem é representada por espécies como *Wuchereria bancrofti*, causadora da filaríase linfática, que embora tenha sido uma doença negligenciada tropical, assim como outras doenças causadas por filarídeos, recebeu maior atenção nas últimas décadas com o aprimoramento das ferramentas de diagnóstico (MEDEIROS *et. al.*, 1999).

Outro exemplo são os nematoides acuarídeos, que mesmo sendo encontrados em baixas cargas parasitárias em animais de produção, acarretam alterações promovidas pelas lesões e processos inflamatórios nas moelas de aves, determinando assim a rejeição comercial das vísceras e causando um considerável impacto econômico aos produtores, uma vez que a permanência dos helmintos nos tecidos causa severas lesões e pode levar ao óbito dos hospedeiros, por meio da perfuração da parede de órgãos, causando problemas como peritonite e comprometimento das funções dos tecidos (MENEZES *et. al.*, 2003).

Existem alguns grupos ainda sub-representados molecularmente na área da helmintologia, especialmente representantes da infraordem Spiruromorpha que inclui um grupo de nematoides zooparasitos (HONISCH & KRONE, 2008). Como resultado, ainda existem muitos pontos a serem discutidos em abordagens diferentes dentro da filogenia de Spiruromorpha.

Segundo VIEIRA *et al.* (2017) sequências associadas ao gene 18S do RNAr têm se mostrado bastante conservadas, sendo frequentemente utilizadas em estudos filogenéticos que exploram as relações evolutivas entre táxons superiores. Ainda que estejam em ascensão na área da biodiversidade helmintológica, alguns estudos, como o de HONISCH & KRONE (2008), destacam a importância, eficácia e aplicabilidade da utilização desse marcador na realização de inferências.

Embora o conjunto de dados relacionados à sequências de 18S RNAr de nematoides parasitos compreendam mais de 300 táxons (BLAXTER *et al.*, 2003), estes permanecem concentrados em grupos com grande importância médico-veterinária (WIJOVÁ *et al.*, 2006), o que reflete em sua pequena representatividade filogenética (HONISCH & KRONE, 2008).

Além disso, pode-se citar outro fator agravante que foi ressaltado no estudo realizado por AILÁN-CHOKE & PEREIRA (2021), que apontam a ausência de estudos que integram dados morfológicos, sobre história de vida e características genéticas, ou discutem formalmente sobre a importância desse tipo de metodologia aplicada aos nematóides da família Camallanidae (Railliet & Henry, 1915). De maneira complementar, a análise filogenética de Spirurina, realizada por WIJOVÁ *et al.* (2006), ressalta a necessidade da incorporação das novas filogenias no sistema de classificação de nematoides com base na biologia, morfologia e biologia molecular, entretanto tais informações ainda são escassas e dificultam o esclarecimento das relações evolutivas do grupo.

Nesse contexto, o presente estudo propõe a realização de inferências acerca da infraordem Spiruromorpha com base nos dados moleculares do gene 18S RNAr sob a perspectiva de características das espécies representadas, como o tipo das estruturas cefálicas, o sítio de infecção e o tipo de termorregulação do hospedeiro vertebrado (ectotérmico ou endotérmico), assim como contribuir com informações e comparações sobre aspectos da evolução, diferenciação de caracteres e filogenia de nematoides Spiruromorpha.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para investigar o sinal filogenético, a relação entre os tipos de estruturas cefálicas, o tipo de termorregulação do hospedeiro vertebrado e o sítio de infecção, um conjunto de dados de sequências de 18S RNAr de nematoides Spiruromorpha foi reunido a partir do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cinquenta e seis sequências disponíveis com no mínimo 1000 pares de bases foram selecionadas para a análise, dentre as quais representantes de oito superfamílias de Spiruromorpha foram selecionados. As espécies *Echinorynchus gadi* (Acanthocephala: Palaeacanthocephala) e *Dibothriocephalus latum* (Platyhelminthes: Cestoda) foram escolhidas por seu distanciamento filogenético dos grupos de interesse e utilizadas como grupo externo no presente estudo.

As sequências foram organizadas no editor *Notepad++* e alinhadas usando o software MAFFT (KATO & STANDLEY, 2013) com as configurações padrões. Subsequentemente foram visualizadas com o uso do software SeaView (GOUY *et al.*, 2010) para a retirada de sequências incompatíveis com o alinhamento. Após a visualização, o banco de dados foi reformulado para conter apenas sequências entre 1000 e 2000 pb. Também foi utilizado o software Gblocks (CASTRESANA, 2000) para remover os locais mal alinhados. Com isso foram retiradas sequências de nove espécies que não condiziam com os requisitos do novo banco de dados, que passou a conter quarenta e sete espécies representantes de oito superfamílias (exceto Aproctoidea e Rictularioidea). A determinação do modelo ótimo (GTR +G) foi executada na extensão JModelTest (POSADA, 2008) implementado na plataforma MEGAX (KUMAR *et al.*, 2018).

A Inferência Bayesiana (IB) foi empregada utilizando a plataforma online *Cipres* (MILLER *et al.*, 2010), por meio da ferramenta *MrBayes* na versão 3.2.6, com 1500000 gerações. O software Tracer (RAMBAUT *et al.*, 2018) foi utilizado para a visualização gráfica da estabilização das cadeias de Markov e compatibilidade dos dados ao longo da análise de IB.

A árvore gerada foi visualizada no programa *figTree* (RAMBAUT, 2010) e trabalhada na forma de cladograma com o auxílio do Software *Treegraph* (STÖVER *et al.*, 2010) e editada em programa de edição de imagens.

A classificação dos caracteres (estados de caráter) considerados para a análise do sinal filogenético foi dividida em três grandes categorias. A primeira foi definida por tipo de estrutura cefálica, subdivida em: cordões cefálicos, colarete, hastas esclerotizadas, cápsula bucal esclerotizada, anel peribucal e outros. O critério utilizado para a escolha dessa subdivisão se baseou primariamente em caracteres utilizados na chave de identificação de nematoides parasitos de Anderson *et al.* (1974). Vale ressaltar que caracteres associados a ultraestruturas ou à grande maioria das espécies, como lábios, pseudolábios e papilas ficaram reunidas na categoria “outros”, já que são estruturas que exigem um maior nível de detalhamento para a diferenciação e classificação, portanto elevam bastante a complexidade da classificação. A segunda classificação teve relação com o tipo de termorregulação do hospedeiro vertebrado, subdividida em: endotermia e ectotermia. Já a terceira foi delimitada pelo sítio de infecção no hospedeiro vertebrado, subdividida em: estômago; intestino; sistema digestório superior (órgãos prévios ao estômago); sistema circulatório; sistema linfático; cavidade corporal; tecido subcutâneo; sacos aéreos e bexiga natatória. Os estados de caracteres considerados foram escolhidos de acordo com a disponibilidade de informações e potencial comparativo com dados literários.

O cálculo dos valores referentes à análise do sinal filogenético foram executados no software R (R CORE TEAM, 2021) por meio dos pacotes ape (PARADIS & SCHLIEP, 2019) e phytools (REVELL, 2012). A robustez dos resultados foi alcançada repetindo a análise com 999 bootstraps.

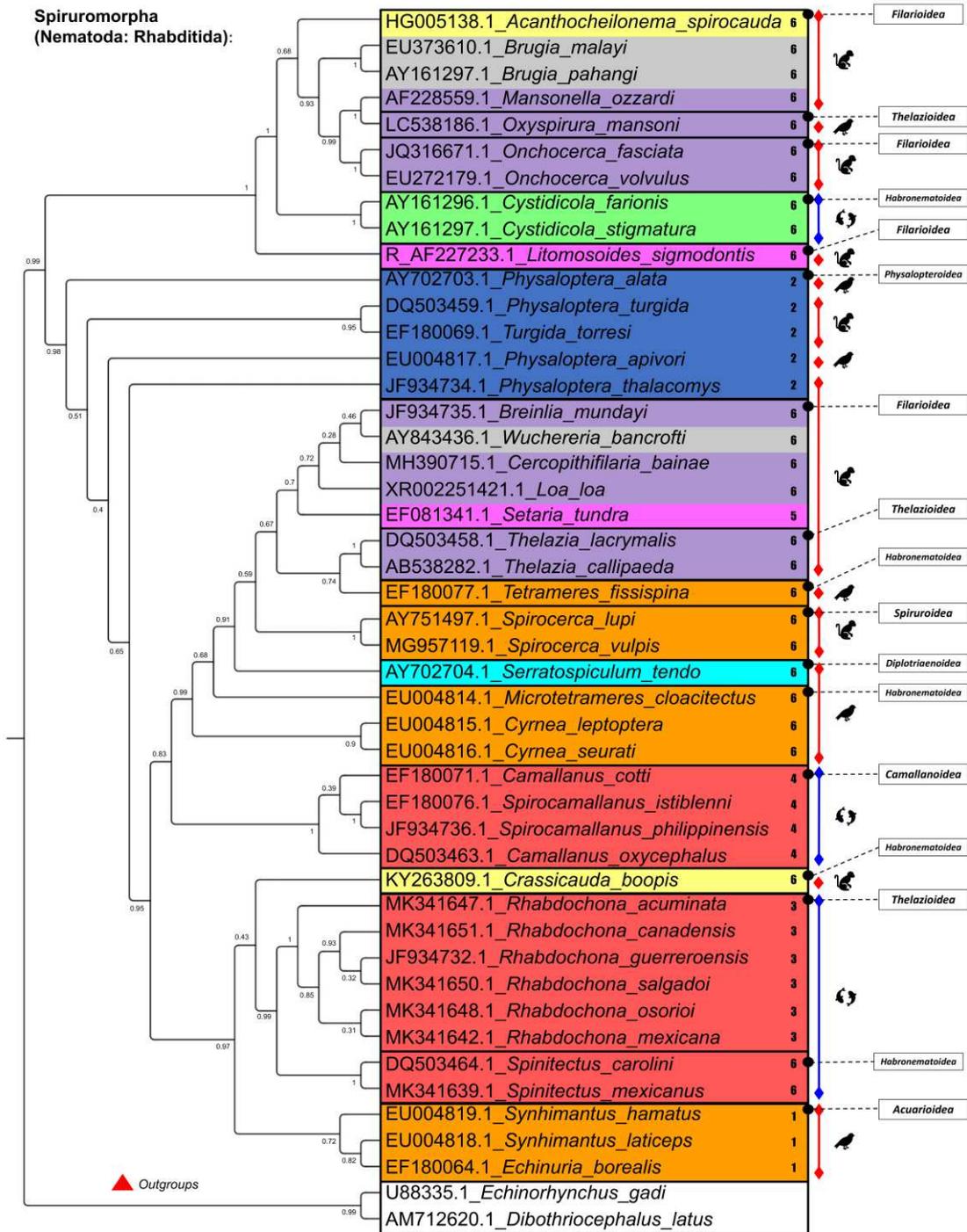
Dentre os diferentes índices disponíveis para o sinal filogenético, que foram compilados e comparados por MÜNKEMÜLLER *et al.*, 2012, o índice de Pagel λ foi utilizado no presente estudo por ter sido considerado um dos mais robustos. Este índice considera um modelo filogenético que avalia os caracteres de forma uniforme e permite o uso de dados ausentes, variando dos valores 0 (nenhum sinal) a 1 (há um sinal).

O índice Pagel λ avalia entre as hipóteses alternativa (presença de sinal) e nula (ausência de sinal) a variação no comprimento do ramo ao longo da filogenia, definindo qual hipótese tem a maior probabilidade de acontecer (PAGEL, 1999).

2.2 RESULTADOS

O cladograma (Figura 2) gerado pela reconstrução filogenética parcial do gene 18S permitiu a visualização de proximidade filogenética das espécies selecionadas e viabilizou a inferência de fatores associados aos clados por meio dos valores de suporte.

Figura 2 – Cladograma associado aos estados de caracteres considerados, grupo de hospedeiros vertebrados e superfamílias das espécies de Spiruromorpha.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A análise do sinal filogenético revelou por meio dos cálculos do índice Pagel λ se os estados de caracteres considerados possuem um grau de significância positivo (há sinal filogenético) ou não. Isso informa se a característica em questão remete a uma relação de compatibilidade e proximidade filogenética entre as espécies.

Tabela 1 – Características associadas ao valor do sinal filogenético

Característica	Valor de p
Estrutura cefálica	p < 0.001
Tipo de Termorregulação	p < 0.001
Sítio de Infecção	p < 0.001

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Todas as características que foram categorizadas revelaram sinais filogenéticos positivos, o que significa que são influenciadoras no processo evolutivo das espécies que foram relacionadas.

2.3 DISCUSSÃO

CHABAUD & BAIN (1994) destacaram alguns aspectos de importância fundamental para a caracterização de traços relacionados à evolução das superfamílias de Spirurida. Dentre estes caracteres, pode-se citar o grupo de hospedeiro vertebrado e as características de estruturas e ornamentações cefálicas (nos estágios larvais e adulto) das dez superfamílias que foram incluídas posteriormente por DE LEY & BLAXTER (2002) em Rhabditida. Como exemplo, pode-se citar Acuarioidea, que é uma superfamília homogênea composta por parasitos de aves (exceto espécies do gênero *Stammerinema*, que parasitam mamíferos como resultado do processo evolutivo de captura de hospedeiros), e que têm sua sistemática morfológica fundamentada nos padrões dos cordões cefálicos (CHABAUD & BAIN, 1994).

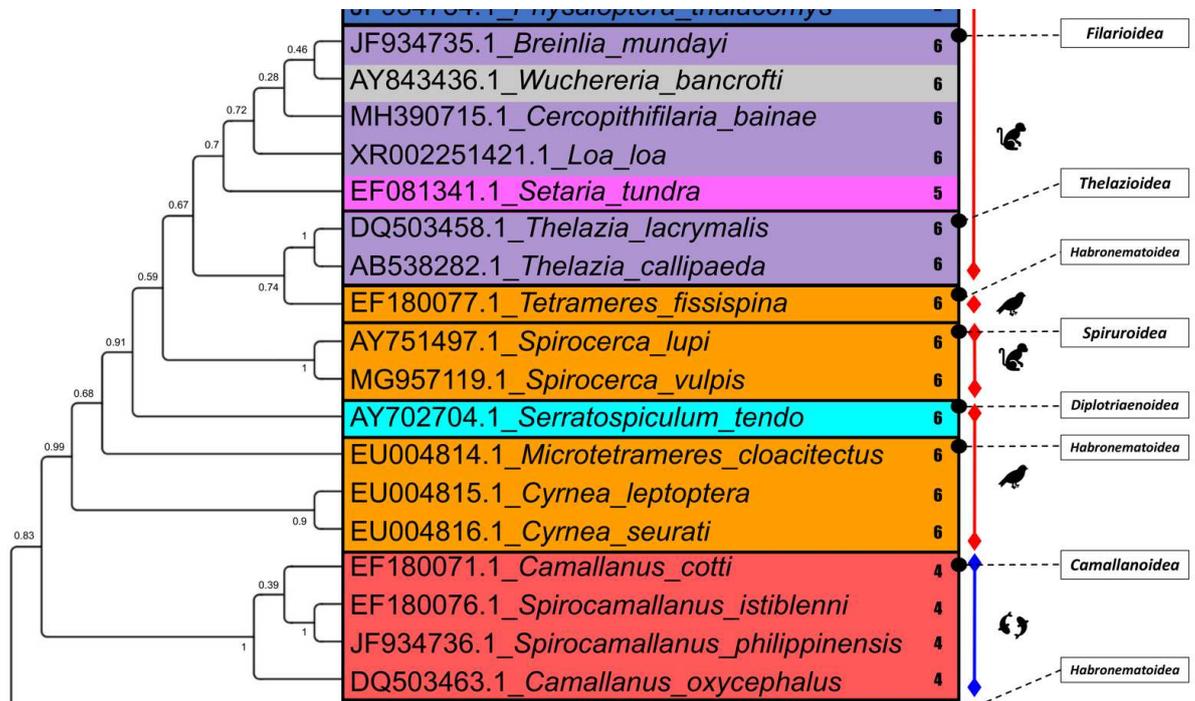
Similarmente, as famílias de parasitos de anfíbios, répteis e peixes: Hedruridae (Railliet, 1916), e Cystidicolidae (Skrjabin, 1946) (Habronematoidea), possuem estruturas cefálicas que representam, segundo CHABAUD & BAIN (1994), caracteres basais resultantes de processo de invaginação e atrofia dos lábios submedianos e posteriormente dos pseudolábios - um processo similar ao de nematoides Habronematinae parasitos de aves e mamíferos.

A árvore filogenética com base molecular, produzida no presente estudo, para a infraordem Spiruromorpha, quando associada às informações sobre sua fisiologia de

termorregulação, o sítio de infecção e aos distintos tipos estruturas cefálicas, revelou uma série de informações que tornam discutíveis aspectos de interesse entre os grupos envolvidos.

Camallanoidea Travassos, 1920, é representada na árvore por um agrupamento conciso que traz características biológicas bem homogêneas: parasitos com sítio de infecção no intestino principalmente de peixes, mas podendo ser encontrados em répteis e anfíbios (ANDERSON *et al.*, 1974). O grupo representado pelas espécies *Camallanus cotti*, *Camallanus oxycephalus*, *Spirocamallanus istiblenni* e *Spirocamallanus philippinensis* é monofilético e é apresentado como grupo irmão ($s= 0,83$) de um grande clado de parasitos de animais endotérmicos representados por espécies das superfamílias Filarioidea, Habronematoidea, Thelazioidea e Diplostriaenoidea (Figura 3). Os parasitos Camallanoidea possuem uma cápsula bucal característica (ANDERSON *et al.*, 1974), com um arranjo esclerotizado que é encontrado em todas as espécies listadas no cladograma, ao passo que o amplo clado que se configurou como grupo irmão de Camallanoidea, apesar de ser representado com um valor de suporte baixo, possuem outros tipos de estruturas mais comuns aos nematóides como pseudolábios e papilas (com exceção de *Setaria tundra*, que possui um anel peribucal aparente).

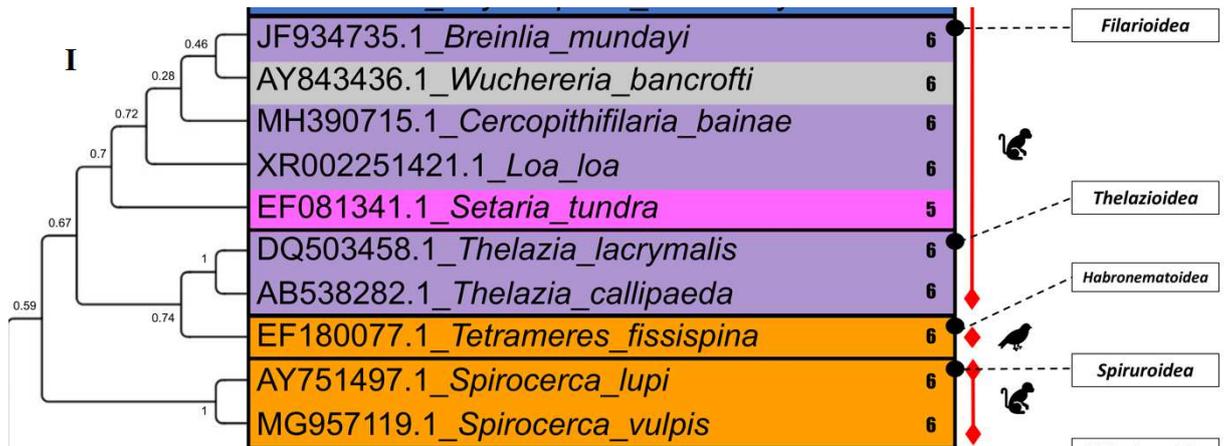
Figura 3 – Clado formado por representantes das superfamílias Camallanoidea, Filarioidea, Habronematoidea, Thelazioidea, Spiruroidea e Diplotriaenoidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Filarioidea Chabaud & Anderson, 1959, é representada por várias espécies que parasitam vertebrados endotérmicos e se distribuem amplamente em dois grandes grupos: um clado (I) associado a duas espécies do gênero *Thelazia* e a uma espécie (*Tetrameres fissispina*) de Habronematoidea ($s= 0,67$) (Figura 4), e outro clado (II) associado a uma espécie (*Oxyspirura mansoni*) de Thelazioidea ($s= 0,68$) (Figura 5), configurado como grupo irmão de dois representantes de Habronematoidea (*Cystidicola farionis* e *Cystidicola stigmatura*) ($s= 1$). Além disso, a espécie *Litomosoides sigmodontis* está alocada separadamente. Devido a isso, a superfamília Filarioidea forma um grupo não monofilético. Os resultados alcançados por CHOUDHURY *et al.* (2018) apresentaram distribuição heterogênea dos filarídeos, assim como o presente estudo, e isso se relaciona com o fato de que estes parasitos, ao longo de sua história evolutiva, conquistaram, em tempos distintos, diferentes tipos de hospedeiros vertebrados em diferentes ambientes, exibindo possivelmente origens múltiplas de parasitismo, como apresentado por NADLER *et al.*, 2007. Nos critérios adotados, praticamente todos os filarídeos (com exceção de *Setaria tundra*) apresentam os mesmos padrões de estruturas cefálicas, o que pode ter (ou não) uma relação com sua localização no hospedeiro, uma vez que estes nematoides são encontrados em sítios de infecção como cavidade corporal, tecido subcutâneo, sistema linfático e sistema circulatório.

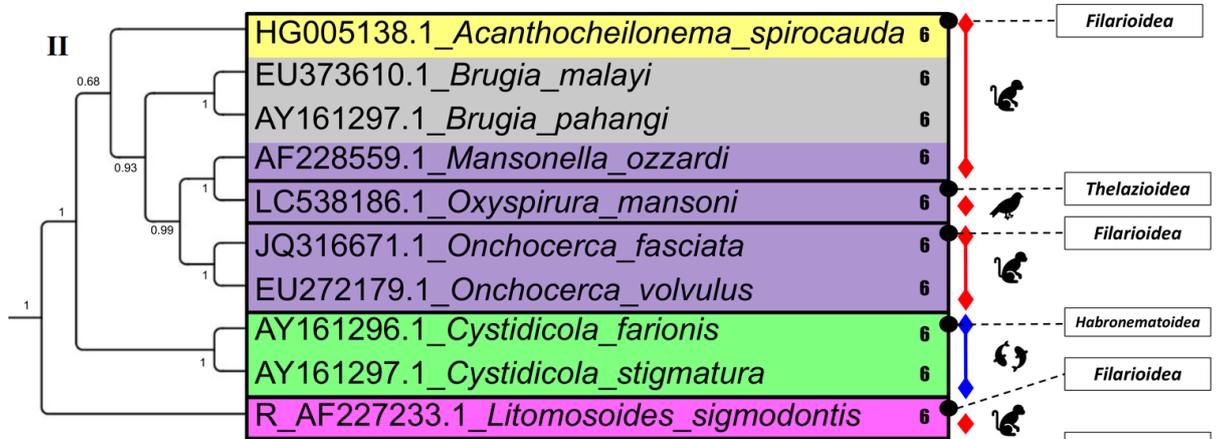
Figura 4 – Clado I correspondente a Filarioidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

As espécies *Cystidicola farionis* e *Cystidicola stigmatura* (Habronematoidea) que formam o grupo irmão do clado II por sua vez também não exibem estruturas cefálicas incomuns e são parasitos de bexigas natatória de peixes.

Figura 5 – Clado II correspondente a Filarioidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A superfamília Thelazioidea Skrjabin, 1915, é representada por meio de três grupos de espécies desagregadas. O primeiro (I) consiste em um agrupamento de seis espécies (*Rhabdochona acuminata*, *Rhabdochona canadensis*, *Rhabdochona guerreroensis*, *Rhabdochona salgadoi*, *Rhabdochona osorioi* e *Rhabdochona mexicana*) com valor de suporte consistente ($s = 1$) (Figura 6). Todas essas espécies são parasitos com sítio de infecção no intestino de peixes, além de compartilharem semelhanças na morfologia da região anterior (hastes esclerotizadas).

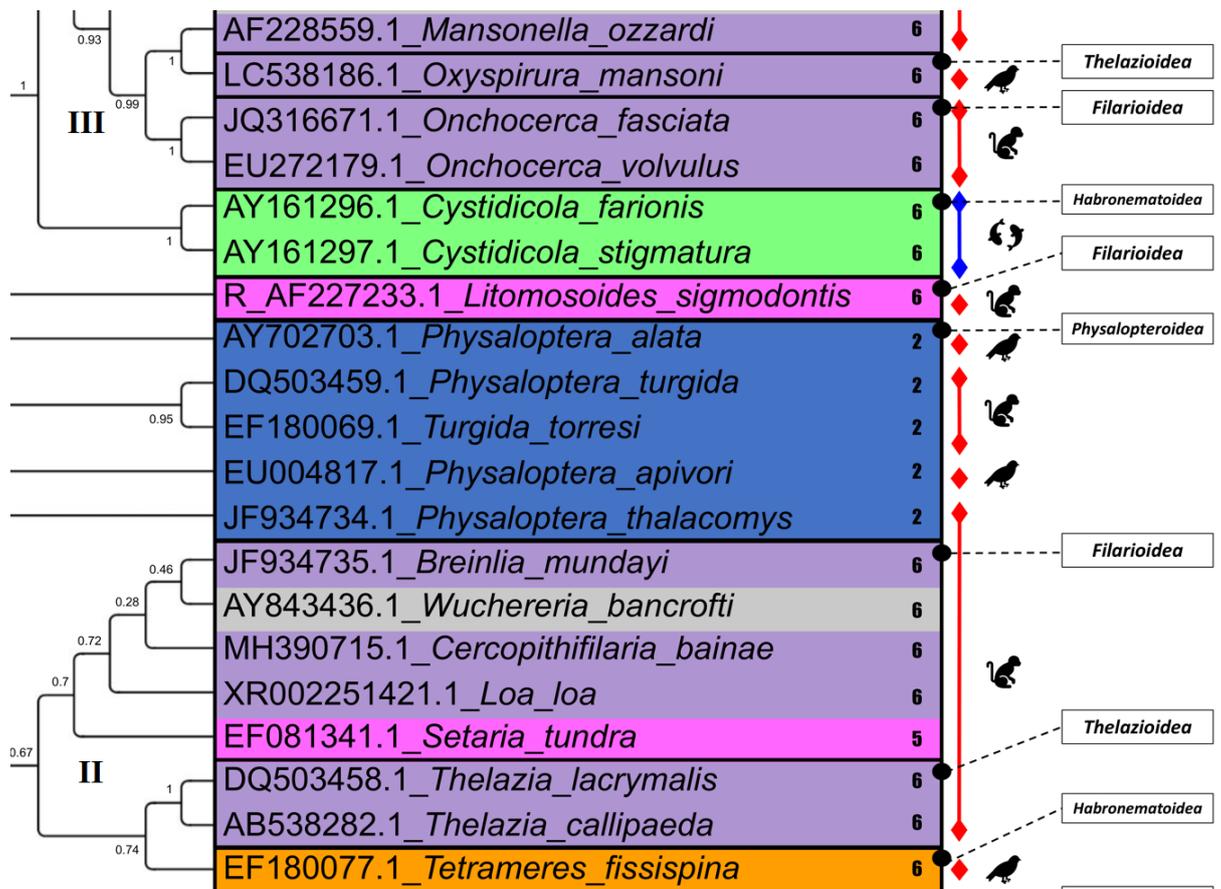
Figura 6 – Clado I correspondente a Thelazioidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Já o segundo (II) grupo se diferencia do primeiro pelo sítio de infecção. As espécies *Thelazia lacrymalis* e *Thelazia callipaeda* estão posicionadas como grupos irmãos com valor de suporte robusto ($s= 1$), sendo parasitos que se alojam no tecido subcutâneo de seus hospedeiros vertebrados, mamíferos. O terceiro (III) grupo é formado por apenas uma espécie (*Oxyspirura mansoni*) que parasita tecido subcutâneo de aves e está posicionada como grupo irmão ($s= 1$) de *Mansonella ozzardi* (Filarioidea) que também compartilha este sítio de infecção, mesmo sendo em outro tipo de hospedeiro, porém a endotermia é mantida nessa avaliação. As espécies de filarídeos *Onchocerca fasciata* e *Onchocerca volvulus* estão situadas como grupo irmão do clado formado por *Oxyspirura mansoni* e *Mansonella ozzardi* com um alto valor de suporte ($s= 0,99$).

Figura 7 – Clados II e III correspondentes a Thelazioidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Habronematoidea Ivaschkin, 1961, é representada no cladograma por espécies alocadas de maneira pouco uniforme quando consideradas as relações de proximidade filogenética. Existem seis clados nos quais as características abordadas variam demasiadamente: o primeiro formado pelas espécies *Spinitectus carolini* e *Spinitectus mexicanus* ($s=1$) que são parasitos de intestino de peixes e formam um grupo irmão com espécies do gênero *Rhabdochona* ($s=0,99$), que também se localizam neste sítio de infecção; o segundo representado por apenas uma espécie (*Crassicauda boopis*) que parasita o sistema circulatório de mamíferos e como o primeiro clado forma um grupo irmão com os componentes do gênero *Rhabdochona* (Thelazioidea) ($s=0,43$); o terceiro clado é formado por *Cyrnea leptoptera* e *Cyrnea seurati* que parasitam o sistema digestório superior de aves, formando um grupo irmão com *Microtetrameres cloacitectus* e um clado amplo com representantes de cinco outras superfamílias ($s=0,99$) com diferentes características de sítio; o quarto clado contém apenas *M. cloacitectus* e assim como o terceiro clado forma um grupo irmão com representantes de cinco outras superfamílias ($s=0,68$); O quinto clado, formado por *Tetrameres fissispina* forma

um grupo irmão ($s= 0,74$) com *Thelazia lacrymalis* e *Thelazia callipaeda*, que parasitam tecido subcutâneo; O sexto e último clado tem duas espécies (*Cystidicola farionis* e *Cystidicola stigmatura*) que são parasitos de bexiga natatória de peixes e estão unidas com um bom valor de suporte ($s= 1$) como grupo irmão de espécies da superfamília Filarioidea e *Oxyspirura mansoni* (Thelazioidea). Os 3° e 4° cladros, assim como o 5° contém espécies de parasitos com sítio de infecção no sistema digestório superior de grupos de vertebrados com mecanismo de termorregulação endotérmico (aves e mamíferos, respectivamente). Pode-se afirmar que apenas as características da região anterior se mantêm dentro do mesmo padrão em todos os cladros.

A superfamília Spiruroidea Oerley, 1885, está alocada em um único clado com um bom valor de suporte ($s= 1$), sendo grupo irmão de representantes de Habronematoidea, Thelazioidea e Filarioidea ($s= 0,59$). São espécies (*Spiroceca lupi* e *Spirocercia vulpis*) que parasitam a região anterior do trato digestório de mamíferos.

Com relação a superfamília Diplostriaenoidea (Anderson, 1958), apenas uma espécie (*Serratospiculum tendo*) é representada no cladograma, formando um grupo irmão com um agrupamento maior ($s= 91$) de espécies de diferentes superfamílias.

Já a superfamília Physalopteroidea Railliet, 1893, que conta com características estruturais anteriores bem destacadas (colaretes), não forma um grupo natural e está representada por cinco espécies de parasitos de estômago de mamíferos e aves, sendo quatro cladros que se encontram em uma posição inconsistente quando observamos com mais atenção os valores de suporte e a quantidade de nós. É notável que todas as espécies representadas manifestam estes colaretes (figura 8).

Figura 8 – Clados associados a Physalopteroidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

As espécies da superfamília Acuarioidea Henry & Sisoff, 1912, formam um clado monofilético, embora o valor de suporte ($s= 0,72$) não transmita a estabilidade necessária.

Porém sabe-se que é um grupo de parasitos de aves que comumente utilizam hospedeiros paratênicos como peixes e anfíbios como uma estratégia para tornar o ciclo de vida viável, como apontado no estudo de SCHRAMM *et al.* (2018). Sua homogeneidade conta com características bem marcadas como o sítio de infecção, as projeções cuticulares anteriores que podem formar cordões cefálicos, assim como o tipo de hospedeiro vertebrado (ANDERSON *et al.*, 1974).

As observações realizadas por ČERNOTÍKOVÁ *et al.*, 2011, indicam que o agrupamento correspondente à antiga ordem Spirurida é representada na reconstrução filogenética como um grupo parafilético, com ocorrências de politomias. A parafilia ocorre na maior parte das superfamílias apontadas na árvore com base molecular, porém as politomias observadas em alguns subgrupos também representados no estudo de ČERNOTÍKOVÁ *et al.*, 2011, não ocorreram na árvore gerada no presente estudo.

Um dos resultados da pesquisa realizada por HONISCH & KRONE, 2008, indicou uma grande proximidade entre Physalopteridae e Acuariidae, porém nota-se que essa relação não é tão concisa como se achou, uma vez que no presente estudo existe um grande distanciamento genético entre as espécies representantes de Physalpoteroidea e Acuarioidea.

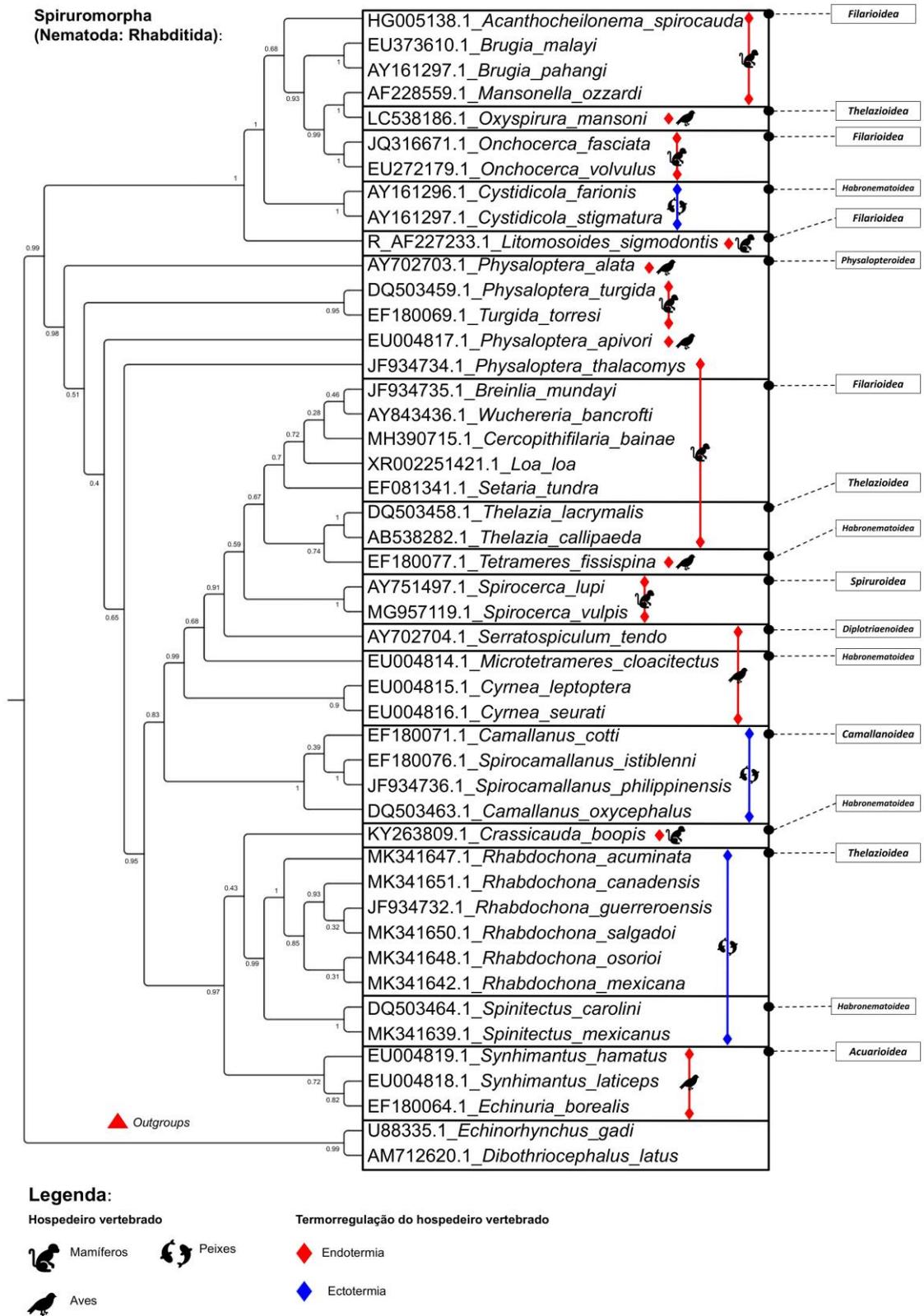
As espécies dos gênero *Rhabdochona* (Thelazioidea) e *Spinitectus* (Habronematoidea), representadas no presente estudo, são parasitos de peixes (ectotérmicos) com sítio de infecção no intestino e estão alocadas como grupo irmão de Acuarioidea ($s = 0,97$), que parasitam o trato digestório superior de aves (endotérmicos). Contudo, sabe-se que pequenos crustáceos atuam como hospedeiros invertebrados dos acuarídeos, sendo comum a participação de vertebrados ectotérmicos, principalmente peixes e anfíbios como hospedeiros paratênicos (ANDERSON, 2000). Com isso podemos ilustrar casos como os de aves Procellariformes (SCHRAMM *et al.*, 2018) que possuem nichos em ambientes aquáticos que se infectam por meio da teia alimentar, ingerindo peixes com as formas dormentes dos parasitos.

Outro ponto que deve ser citado é com relação às espécies *Thelazia lacrymalis*, *Thelazia callipaeda* e *Oxyspirura mansoni* que, em contraste com as outras espécies de Thelazioidea presentes no cladograma, são parasitos de tecido subcutâneo de hospedeiros endotérmicos e não apresentam estruturas cefálicas diferenciadas, como as hastes esclerotizadas encontradas nas espécies do gênero *Rhabdochona*.

O parasitismo em vertebrados ectotérmicos, que é demonstrado no cladograma por representantes das superfamílias Habronematoidea e Thelazioidea se limita principalmente aos peixes como hospedeiros vertebrados e está restrito aos sítios do intestino e bexiga natatória (Figuras 9 e 10).

Já os parasitos de vertebrados endotérmicos estão divididos entre as aves e os mamíferos, podendo ser encontrados em uma ampla variedade de sítios de infecção como tecidos subcutâneos até mesmo em porções do sistema digestório (Figura 9). A grande variação de superfamílias nos mamíferos talvez venha acompanhada de uma justificativa biológica para este fato, que pode estar intimamente relacionada a ampla plasticidade e capacidade de adaptação destes vertebrados em diferentes tipos de ambientes, sua grande variabilidade no tipo de alimentação e forrageio, assim como seus diferentes hábitos comportamentais e fisiológicos.

Figura 9 – Cladograma associado ao tipo de termorregulação do hospedeiro vertebrado.

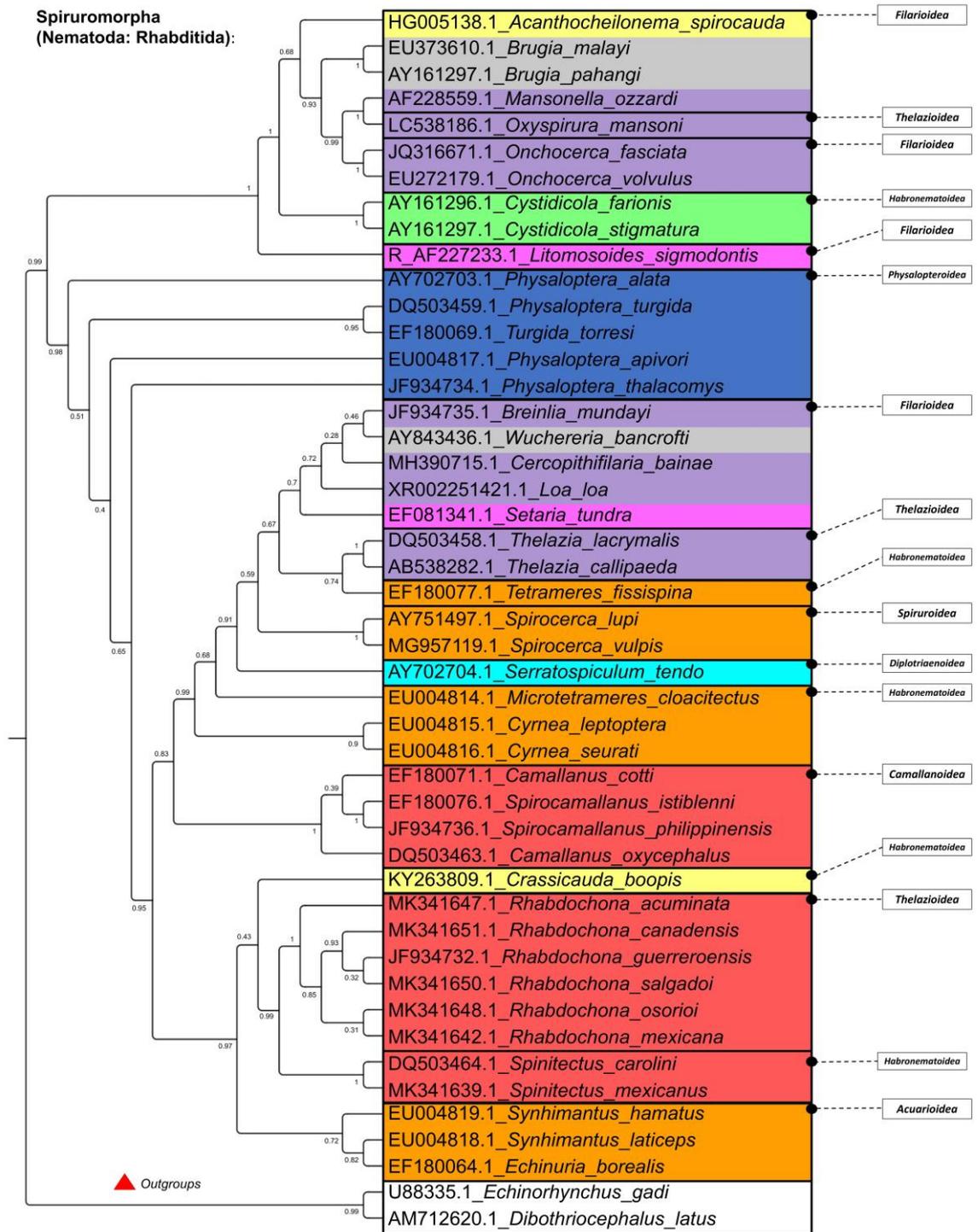


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Segundo Palmer-Young *et al.*(2021), a temperatura do hospedeiro e a química do sistema digestório pode modelar a resistência à infecção de parasitos. Devido a isso a capacidade dos parasitos de sobreviver e garantir a infecção tem relação direta com as condições do ambiente em que está localizado no hospedeiro (Adamson & Caira, 1994). Duas características que definem esse ambiente são a temperatura e o pH. (Kirk *et al.*, 2018).

Em aves pode-se dizer que na maioria das vezes os parasitos (representados pelas superfamílias Thelazioidea, Habronematoidea, Diplostriaenoidea e Physalopteroidea) se abrigam em porções anteriores do sistema digestório (ver Figura 10), basicamente sendo encontrados em órgãos como proventrículo e moela (exceto *Serratospiculum tendo*, encontrada em sacos aéreos).

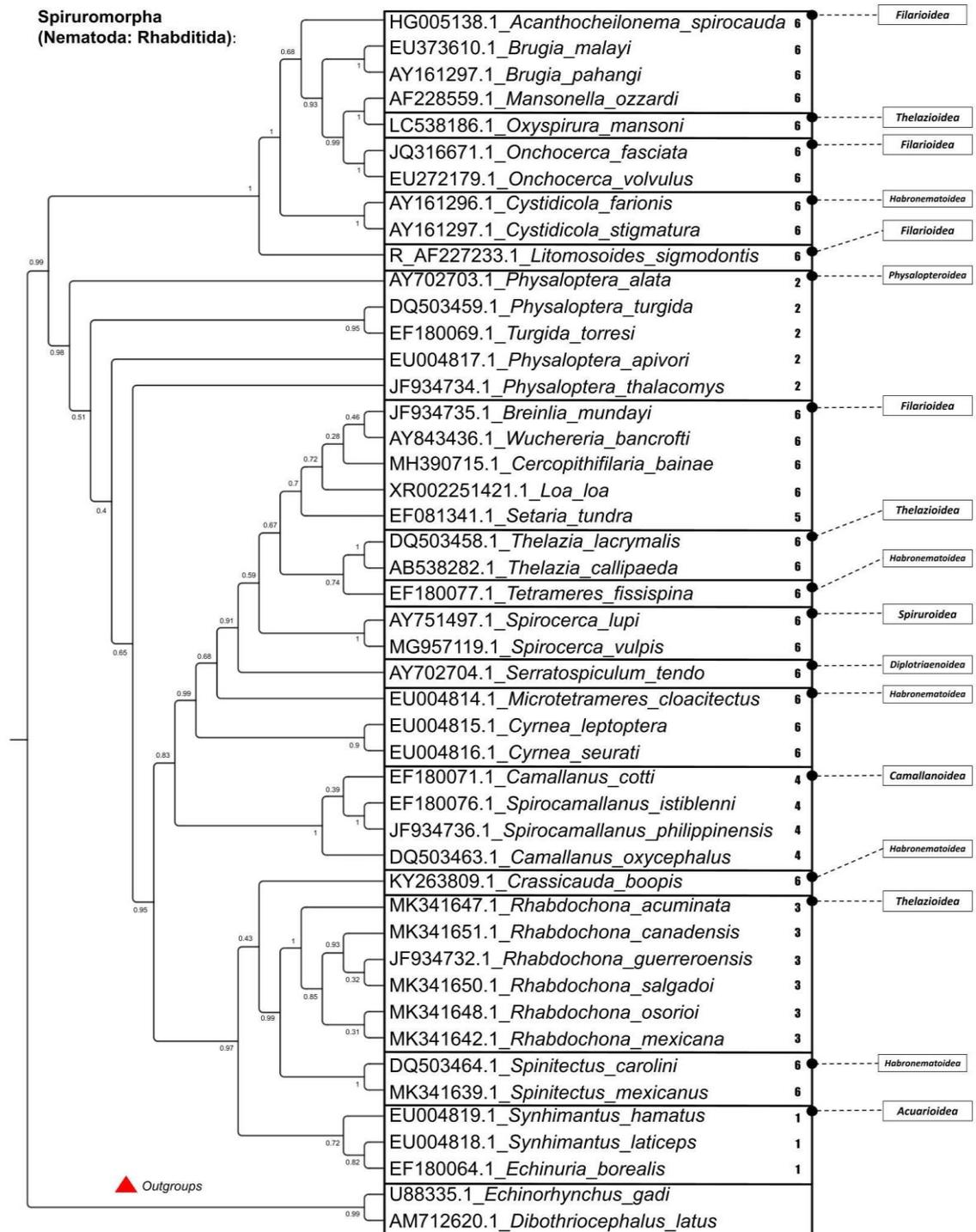
Figura 10 – Cladograma associado ao Sítio de infecção no hospedeiro vertebrado.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Com relação as estruturas cefálicas, é possível correlacionar a frequência da expressão desses caracteres em parasitos com sítio de infecção em órgãos com um alto grau de motilidade (órgãos que manifestam peristaltismo). A explicação deste fenômeno já foi discutida na literatura em estudos de taxonomia e biologia destes organismos e a justificativa que outros autores, como Inglis, 1965, deram para a expressão destes caracteres está relacionada a necessidade de se ter uma melhor fixação nas paredes dos órgãos que abrigam estes parasitos. Como resultado disso existem algumas superfamílias (Acuarioidea, por exemplo) que desenvolveram e mantiveram estruturas diferenciadas, ao ponto que outras, como Filarioidea manifestam uma intensa redução na quantidade de estruturas cefálicas (Figura 11), já que se localizam em porções de tecido mecanicamente mais estáveis. Porém é importante salientar que essa hipótese não se aplica como a única base para o desenvolvimento e diferenciação das estruturas cefálicas.

Figura 11 – Cladograma associado aos tipos de estruturas cefálicas dos parasitos.

**Legenda:****Estruturas cefálicas**

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1 - Cordões cefálicos | 4 - Cápsula bucal esclerotizada |
| 2 - Colarete | 5 - Anel peribuca |
| 3 - Hastes esclerotizadas | 6 - Outras |

É importante destacar que o amplo estudo sobre o filo Nematoda realizado por Blaxter & Koutsovoulos, 2015, infere quatro possíveis origens para as ocorrências do parasitismo em Spiruromorpha, o que pode indicar que as variações observadas na filogenia, em comparação com a morfologia e o ciclo de vida dos organismos podem se suportar nessa hipótese.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados e discutidos no presente trabalho demonstram que esse tipo de análise pode trazer diversas informações não somente acerca das relações genéticas entre as espécies, como também sobre dados que se relacionam com aspectos biológicos, ontogenéticos, ecológicos, dentre outros. Tais informações são valiosas nas pesquisas atuais, uma vez que o número de estudos com enfoque filogenético permanece em alta nas últimas décadas (Figura 9).

Figura 12 – Interesse ao longo do tempo sobre o termo “Phylogeny” de 01/01/2010 a 01/01/2023.



Fonte: Google Trends (Disponível em: www.google.com/trends)

A união de dados genéticos, morfológicos e evolutivos com a utilização de ferramentas diversas de forma integrativa, como realizado no estudo de AILÁN-CHOKE & PEREIRA, 2021, para a realização de inferências mais detalhadas acerca do posicionamento taxonômico e da história evolutiva dos grupos, é uma metodologia que pode trazer respostas para alguns questionamentos que permeiam as relações entre alguns níveis taxonômicos menores de nematoides e podem ser expandidas para Spiruromorpha a fim de promover conhecimento básico e aplicado.

Um exemplo que pode ser citado partiu da pesquisa realizada por WIJOVÁ *et al.*, 2006,

que analisou aspectos evolutivos de estratégias de captura de hospedeiros, heteroxenia, correlações filogeográficas e coevolução em Spirurina.

Outro ponto importante que envolve o conceito do estudo é a necessidade de aumentar a coleta de dados genéticos com este e outros tipos de marcadores para cobrir a falta de informações moleculares, principalmente acerca das espécies que parasitam animais que não possuem importância médica ou veterinária, mas de importância na conservação da biodiversidade - com o objetivo conciliar os dados filogenéticos para enriquecer o entendimento sobre as dinâmicas evolutivas dos nematóides parasitos e de vida livre por meio das ferramentas moleculares, já que o registo fóssil não favorece a preservação do material.

3 CONCLUSÃO

O estudo da filogenia de grandes grupos, como Spiruromorpha, embora traga informações pertinentes para a discussão dos mecanismos evolutivos e das relações interespecíficas também levanta muitas questões que entram em conflito com dados da taxonomia clássica e ecologia. Portanto, ainda que os dados acerca do sítio de infecção, do mecanismo de termorregulação do hospedeiro vertebrado e dos padrões de ornamentação cefálica sejam estatisticamente válidos, indicando influência direta no processo evolutivo e possibilitando inferências, muitas lacunas persistem no que diz respeito à interação entre estes organismos e à biologia complexa que sustenta a sobrevivência dessas espécies.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON M. L.; CAIRA J. N. Evolutionary factors influencing the nature of parasite specificity. **Parasitology**. v. 109. p. 85–S95.1994.
- AILÁN-CHOKE, L. G.; PEREIRA, F. B. Deep in the systematics of Camallanidae (Nematoda): using integrative taxonomy to better understand the phylogeny and consistency of diagnostic traits. **Parasitology**. p. 1-13. 2021.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission**, 2 ed. U.K. (Oxon): CAB International, 2000.
- ANDERSON, R. C.; CHABAUD, A. G.; WILLMOTT, S. Keys to the genera of the order Spirurida. *In: CIH keys to the nematode parasites of vertebrates*, 3 ed. (Farnham Royal) U.K. Commonwealth Agricultural Bureaux, 1974.
- BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREYS, J. R.; LIU, L. X.; SCHEIDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, R. J.; MACKAY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSE, L. M.; VIDA, J. T.; THOMAS, W. K.. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**. v. 392. p. 71–75. 1998.
- BLAXTER, M.; KOUTSOVOLOS, G. The evolution of parasitism in Nematoda. **Parasitology**. v. 142, n. 1, p. 26-39. 2015.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution** v. 17. p. 540-552. 2000.
- ČERNOTÍKOVÁ, E.; HORÁK, A.; MORAVEC, F. Phylogenetic relationships of some spirurine nematodes (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida: Spirurina) parasitic in fishes inferred from SSU rRNA gene sequences. **Folia Parasitologica**. V. 58. p. 135-148. 2011.
- CHABAUD, A. G.; BAIN, O. The evolutionary expansion of the Spirurida. **International Journal for Parasitology**. v. 24. p. 1179–1201. 1994.
- CHILTON, N. B.; GASSER, R. B.; BEVERIDGE, I. Phylogenetic relationships of Australian stronglyloid nematodes inferred from ribosomal DNA sequence data. **International Journal for Parasitology**. v. 27. p. 1481–1494. 1997.
- CHITWOOD, B. G.; WEHR, E. E. The value of cephalic structures as characters in Nematode classification, with special reference to the superfamily Spiruroidea. **Parasitology Research**. v. 7. p. 273-335. 1934.
- CHOUDHURY, A.; NADLER, S. A. Phylogenetic relationships of Spiruromorph Nematodes (SPIRURINA: SPIRUROMORPHA) in North American freshwater fishes. **The Journal of Parasitology**. p. 104. p. 496-504. 2018.
- DE LEY, P.; BLAXTER, M. *In The Biology of Nematodes* (ed. Lee, D. L.). 1 ed. CRC press. 2002.

- DURETTE-DESSET, M. C.; BEVERIDGE, I.; SPRATT, D. M. The origin and evolutionary expansion of the Strongylida (Nematoda). **International Journal for Parasitology**. v. 24. p. 1139–1165. 1994.
- GOUY, M, GUINDON, S, GASCUEL, O. Seaview Version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**. v. 27. p. 221-224. 2010.
- HODDA, M. Phylum Nematoda. **Zootaxa 1668**. p. 265-293. 2007.
- HONISCH, M.; KRONE, O. Phylogenetic relationships of Spiruromorpha from birds of prey based on 18S rDNA. **Journal of Helminthology**. v. 82. p. 129-133. 2008.
- INGLIS, W. G. The Nematodes parasitic in the gizzard of birds: A study in morphological convergence. **Journal of Helminthology**. v. 39. p. 207-224. 1965.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30. p. 772-80. 2013.
- KIRK, D.; JONES, N.; PEACOCK, S.; PHILLIPS, J.; MOLNÁR, PK.; KRKOSEK, M.; LUIJCKX, P. Empirical evidence that metabolic theory describes the temperature dependency of within-host parasite dynamics. **PLoS Biol**. v. 16. 2018
- KUMAR, S.; STECHER, G.; Li, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**. v. 35. p. 1547-1549. 2018.
- MEDEIROS, Z.; GOMES, J.; BÉLIZ, F.; COUTINHO, A.; DREYER, P.; DREYER, G. Screening of army soldiers for *Wuchereria bancrofti* infection in the metropolitan Recife region, Brazil: implications for epidemiological surveillance. **Tropical Medicine & International Health**. v. 4. p. 499-505. 1999.
- MENEZES, R. C.; TORTELLY, R.; GOMES, D. C.; PINTO, R. M. Pathology and frequency of *Cheilospirura hamulosa* (Nematoda, Acuarioidea) in Galliformes hosts from backyard flocks. **Avian Pathology**. v. 32. p. 151–156. 2003.
- MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. New Orleans, LA p. 1 - 8. 2010.
- MÜNKEMÜLLER, T, LAVERGNE, S, BZEZNIK, B, DRAY, S, JOMBART, T, SCHIFFERS, K, THUILLER, W. How to measure and test phylogenetic signal. **Methods in Ecology and Evolution**. v. 3. p. 743-756. 2012.
- NADLER, S.; CARRENO, R.; MEJÍA-MADRID, H.; ULLBERG, J.; PAGAN, C.; HOUSTON, R.; HUGOT, J. Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. **Parasitology**. v. 134. p. 1421-1442. 2007.

- PAGEL, M. Inferring the historical patterns of biological evolution. **Nature**. v. 401. p. 877-884. 1999.
- PALMER-YOUNG, E. C.; RAFFEL, T. R.; EVANS, J. D. Hot and sour: parasite adaptations to honeybee body temperature and pH. **Proceedings of Royal Society B**. v. 288. 2021.
- PARADIS, E.; SCHLIEP, K. Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. **Bioinformatics**. v. 35. p. 526-528. 2019.
- POSADA, D. jModel test: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** v. 25. p. 1253-6. 2008.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Austria (Vienna). 2021.
- RAMBAUT, A. *FigTree v1.3.1*. Institute of Evolutionary Biology, **University of Edinburgh**, Edinburgh. 2010.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior summarization in bayesian phylogenetics using tracer 1.7. **Systematic Biology**. v. 67. p. 901-904. 2018.
- REVELL, L. J. Phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). **Methods in Ecology and Evolution**. v. 3. p. 217-223. 2012.
- SCHRAMM, C. C. *et al.* Acuariidae (Nematoda) in Procellariiformes (Aves) on the southern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 27. 2018.
- STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. Treegraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics**. v. 11. 2010.
- VIEIRA, T. D.; MACEDO, M. R. P.; BERNARDON, F. F.; MÜLLER, G. Morphological, molecular and phylogenetic analyses of *Diplotriaeana bargunisica* Skrjabin, 1917 (Nematoda: Diplotriaeidae). **Parasitology International**. v. 66. p. 555-559. 2017.
- WIJOVÁ, M.; MORAVEC, F.; HORÁK, A.; LUKES, J. Evolutionary relationships of *Spirurina* (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida) with special emphasis on dracunuloid nematodes inferred from SSU rRNA gene sequences. **International Journal for Parasitology**. v. 36. p. 1067-1075. 2006.