

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO
DA NATUREZA

Nathan José Melo de Lima

Atributos dos hospedeiros intermediários na filogenia de seus parasitos
Spiruromorpha

Juiz de Fora

2023

Nathan José Melo de Lima

**Atributos dos hospedeiros intermediários na filogenia de seus parasitos
Spiruromorpha**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza pela 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: Prof. 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)

Melo de Lima, Nathan José .

Atributos dos hospedeiros intermediários na filogenia de seus parasitos Spiruromorpha / Nathan José Melo de Lima. -- 2023.
32 f. : il.

Orientador: Ralph Maturano Pinheiro

Coorientador: 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. Hospedeiro Intermediário. 2. Sinal Filogenético. 3. Spiruromorpha. I. Pinheiro, Ralph Maturano, orient. II. Lima, Sueli de Souza, coorient. III. Título.

Nathan José Melo de Lima

Atributos dos hospedeiros intermediários na filogenia de seus parasitos Spiruromorpha

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



Documento assinado eletronicamente por **Ralph Maturano Pinheiro, Professor(a)**, em 28/02/2023, às 14:12, 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 15:26, 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 15:27, 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 10:29, 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 **1165633** e o código CRC **39BF8FE8**.

Dedico este trabalho a meus pais pelo constante apoio e incentivo e também a todos que contribuíram para minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ter permitido experienciar esta etapa importante da minha vida.

Agradeço a professora Sueli de Souza Lima, por ser parte fundamental de minha formação acadêmica, além de sua amizade e inspiração. Ao professor Ralph Maturano pelo direcionamento técnico, teórico, orientação e companheirismo durante todo o processo de elaboração e desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a professora Mariana Fonseca Rossi por ter me guiado pelo campo da taxonomia molecular, abrindo um novo horizonte de possibilidades de estudos.

Agradeço a meus amigos próximos, em especial Gabriel Faria Sell pela amizade e parceria ao longo de toda a jornada do curso, compartilhando aprendizagens. Agradeço também aos colegas do LABTECH Odile Bain pela amizade e companheirismo.

Agradeço a UFJF por ser uma excelente instituição de ensino público e a CAPES pelo apoio financeiro indispensável para a realização da pesquisa.

RESUMO

Os hospedeiros intermediários são muitas vezes negligenciados em estudos que visam a compreensão e reconstrução da filogenia dos organismos parasitos, contudo é notável que estes são componentes fundamentais nas estratégias de transmissão e infectividade que garantiram o alcance e sucesso evolutivo destes organismos nos mais diversos ambientes sobretudo em Nematoda. Uma amostragem de quarenta e cinco sequências do marcador 18S RNAr referentes a táxons de nematoides pertencentes a infraordem Spiruromorpha foram estudadas com a finalidade de se compreender as relações filogenéticas entre os parasitos, seus hospedeiros intermediários e definitivos. Para esta finalidade a influência dos grupos dos hospedeiros intermediários, bem como a composição de sua dieta foram estudados em conjunto com os grupos de hospedeiros vertebrados por meio de análises de teste de sinal filogenético, que nos indicaram que as categorias de grupos de hospedeiros intermediários e dieta dos hospedeiros intermediários exercem influência evolutiva no grupo, o que em conjunto com a disposição da árvore filogenética obtida nos permite fazer inferências sobre a evolução de grupos contidos na infraordem.

Palavras-chave: Hospedeiro Intermediário, Sinal Filogenético, Spiruromorpha.

ABSTRACT

Intermediate hosts are often neglected in studies aimed at understanding and reconstructing the phylogeny of parasitic organisms, however it is notable that they are fundamental components in the transmission and infectivity strategies that ensured the reach and evolutionary success of these organisms in the most diverse environments, especially in Nematoda. A sampling of forty-five 18S rRNA marker sequences referring to nematode taxa belonging to the Spiruromorpha infraorder were studied with the aim of understanding the phylogenetic relationships between the parasites, their intermediate and definitive hosts. For this purpose, the influence of the intermediate host groups, as well as the composition of their diet were studied together with the vertebrate host groups through phylogenetic signal test analyses, which indicated that the categories of intermediate host groups and diet of intermediate hosts exert evolutionary influence on the group, which together with the layout of the phylogenetic tree obtained allows us to make inferences about the evolution of groups contained in the infraorder.

Keywords: Intermediate Host, Phylogenetic Signal, Spiruromorpha.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Desenvolvimento e transmissão de <i>Oxyspirura mansoni</i> em galinhas.	15
Figura 2	- Cladograma Spiruromorpha.....	20
Figura 3	- Clado 1.....	22
Figura 4	- Clado 2.....	23
Figura 5	- Clado 3.....	25
Figura 6	- Physalopteroidea.....	26
Figura 7	- Agrupamento:Camallanoidea.....	27
Figura 8	- Acuarioidea.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IB Inferência Bayesiana

H.I. Hospedeiro Intermediário

H.D. Hospedeiro Definitivo

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

RNAr RNA ribossomal

RNA Ácido ribonucleico

pb Par(es) de base(s)

s Valor de suporte

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	DESENVOLVIMENTO	17
2.2	RESULTADOS	19
3	DISCUSSÃO	21
4	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A ordem Spirurida (Chitwood, 1933) reúne nematoides parasitos que apresentam como sinapomorfias a extremidade anterior bilateralmente simétrica, esôfago dividido em duas porções, sendo a porção anterior muscular e mais curta e a porção posterior glandular, muitas vezes indiferenciável uma da outra, papilas cefálicas ventro-laterais ausentes e papilas cloacais presentes ventral ou ventro-lateralmente (ANDERSON *et al.*, 1974; CHABAUD, 1975). Morfologicamente possuem grande variação em características como: tamanho corporal, presença e conformação das estruturas cefálicas, de fixação e sensoriais (BUSH *et al.*, 2002; WIJOWÁ *et al.*, 2006). Além disso, no caso de machos, as estruturas relacionadas à cópula apresentam grande diversidade entre os táxons do grupo (CHITWOOD & WEHR, 1934; ANDERSON & BAIN, 1976). Estudos sobre o sítio de infecção nos hospedeiros definitivos, bem como suas relações fisiológicas também indicam que seu micro-habitat difere grandemente dentro da ordem, podendo estar localizado em órgãos relacionados à porção superior do sistema digestório como esôfago, estômago e duodeno, além da cavidade corporal e tecidos de vertebrados (ANDERSON, 2000). Ademais, suas modificações morfológicas podem indicar a adaptação que estes organismos sofreram ao modo de vida parasitário, tais como o alongamento e estreitamento corporal, redução de peças bucais e, no caso dos machos, dos órgãos acessórios a cópula (CHABAUD & BAIN, 1994).

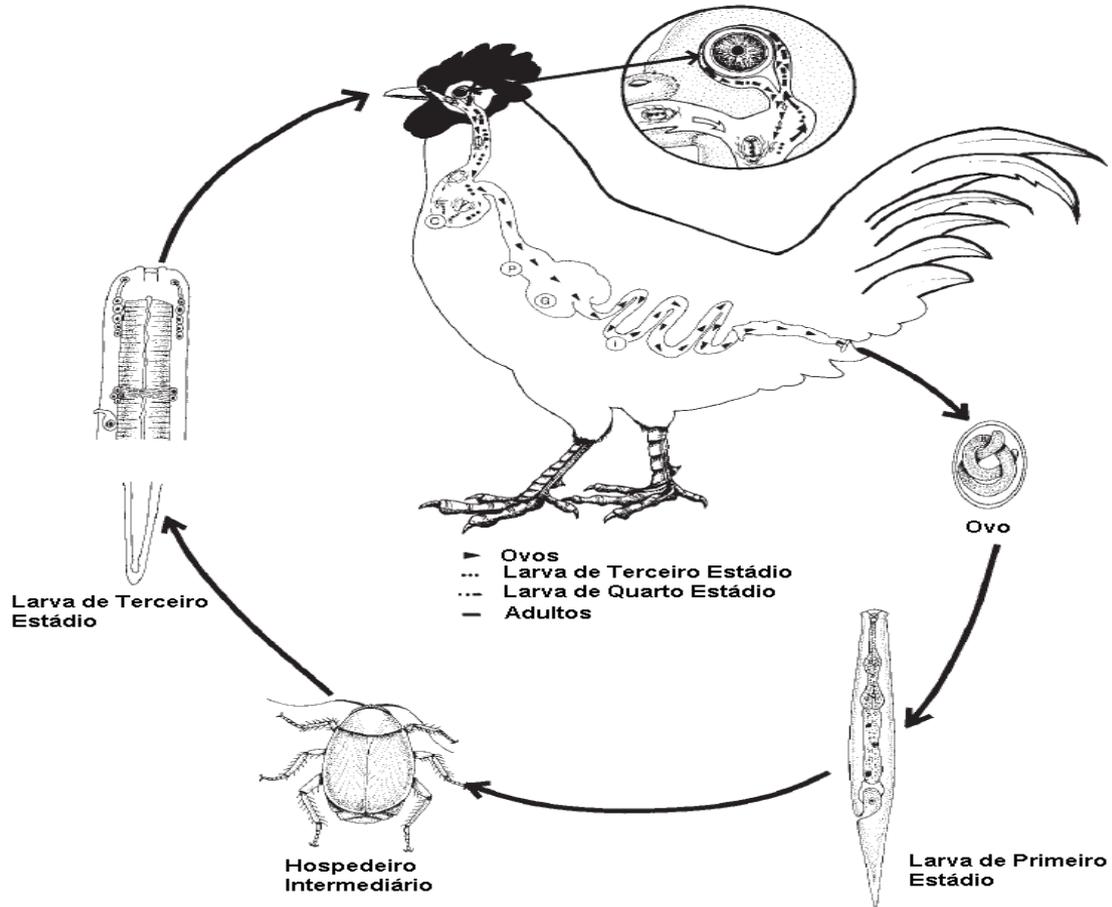
Estudos com base no sequenciamento da pequena subunidade do ácido ribonucleico ribossômico (SSU RNAr) propuseram uma alteração na classificação de diversos táxons em Nematoda; nestes, Spirurida deixa de ser uma ordem e os táxons antes incluídos no grupo foram transferidos para a ordem Rhabditida, subordem Spirurina. Em Spirurina estão definidas cinco infraordens, sendo estas: Ascaridomorpha, Gnathostomatomorpha, Oxyuridomorpha, Rhigonematomorpha e Spiruromorpha (BLAXTER *et al.*, 1998; BLAXTER *et al.*, 2000; DELEY & BLAXTER, 2002). Na infraordem Spiruromorpha a baixa disponibilidade de sequências no momento de realização dos trabalhos fez com que as superfamílias já descritas com base morfológica e biológica fossem mantidas dentro do clado, exceto Dracunculoidea que se mantém como um grupo à parte (incerta sedis) dentro de Spirurina, e Gnathostomatoidea que está definido como um grupo externo e basal à Ascaridomorpha, Spiruromorpha, Oxyuridomorpha e Rhigonematormorpha, como proposto por Blaxter *et al.* (1998). De acordo com esta classificação, a infraordem Spiruromorpha conta com dez superfamílias (HODDA, 2007), sendo estas: Acuarioidea (Henry & Sisoff, 1912); Aproctoidea (Skrjabin & Shikhobalova, 1945);

Camallanoidea (Travassos, 1920); Diplotrienoidea (Anderson, 1958); Filarioidea (Chabaud & Anderson, 1959); Habronematoidea (Ivaschkin, 1961); Physalopteroidea (Railliet, 1893); Rictularoidea (Railliet, 1916); Spiruroidea (Oerley, 1885) e Thelazioidea (Skrjabin, 1915). Contudo a infraordem Spiruromorpha se encontra sub-representada, pois embora rica em espécies, não possui grande quantidade de dados moleculares de qualidade (HORNISH & KRONE, 2008), estando estes disponíveis sem seguir padrão de marcador molecular, além da ausência de identificação taxonômica adequada para determinadas sequências.

Se tratando do ciclo de vida (Figura 1), a maior parte do grupo é capaz de produzir ovos com larvas de primeiro estágio desenvolvidas, além disso, todas as espécies utilizam artrópodes como hospedeiros intermediários e vertebrados como hospedeiros definitivos. Dentro de um único gênero, as espécies podem utilizar diferentes artrópodes como hospedeiros intermediários, estando estes presentes na dieta do vertebrado ou atuando como vetores em casos de artrópodes hematófagos, que facilitam a ampliação do espectro de hospedeiros definitivos, uma vez que estes não precisam estar relacionados com o hospedeiro intermediário por meio do hábito alimentar (CHITWOOD & CHITWOOD, 1974; ANDERSON, 1988; ANDERSON, 2000; BUSH *et al.*, 2002).

Figura 1: Desenvolvimento e transmissão de *Oxyspirura mansoni* em galinhas.

C = papo; G = moela; I = intestino; P = proventrículo.



Fonte: ANDERSON, 2000.

A classificação de nematoides parasitos é feita de forma clássica, utilizando a especificidade de hospedeiros, ciclo de vida e caracteres morfológicos de estruturas como peças bucais, órgãos sensoriais, tamanho e conformação de órgãos reprodutores, por exemplo (ANDERSON *et al.*, 1974; ANDERSON & BAIN, 1976). Muitas dessas características são de difícil observação em determinados gêneros, o que, em conjunto com possíveis homoplasias, podem acarretar em reconstruções errôneas da filogenia dos grupos. Estudos sobre a sistemática molecular e filogenética, com base na morfologia, biologia e análise molecular ainda são muito preliminares para grupos de nematoides, principalmente pela falta de dados morfo-moleculares de representantes do táxon (NADLER *et al.*, 2007). Com os avanços tecnológicos crescentes, surgiram ferramentas que nos aproximam cada vez mais da classificação natural dos seres vivos. Portanto, os estudos moleculares agregam resultados que são utilizados para ponderar, em conjunto com a taxonomia morfológica, formas mais assertivas sobre a classificação de um determinado grupo taxonômico, sendo indispensável a integração de ferramentas em estudos

taxonômicos atuais. Trabalhos recentes combinam bases morfológicas e dados moleculares para nematoides parasitos, destacando a necessidade de uma análise combinada para que se tenha precisão maior na definição de relações evolutivas e de taxonomia destes organismos (NADLER *et al.*, 2006; MALTA *et al.*, 2018).

Algumas espécies da infraordem apresentam como hospedeiros intermediários grupos de importância ambiental considerável, tais quais os membros da família Rhabdochoniidae (Thelazioidea), que utilizam insetos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera e Plecoptera), sendo estes referência em estudos de poluição urbana, atuando como bioindicadores de qualidade da água, onde a distribuição destes organismos pode ser utilizada como um índice viável aplicado à conservação (GRANDJEAN *et al.*, 2003; AGBOOLA *et al.*, 2019). Além disso, representantes de Filarioidea são responsáveis por doenças, que afligem diversos grupos animais, inclusive os seres humanos, as chamadas doenças tropicais negligenciadas que acometem regiões de expansão urbana desordenada ou sem serviço de saneamento adequado, favorecendo a proliferação dos vetores (ALBUQUERQUE, 1993; CHANDY *et al.*, 2011).

Pouco se conhece sobre as relações evolutivas entre os parasitos e seus hospedeiros intermediários, tendo em vista que estes últimos são pouco evidenciados mesmo em trabalhos que abordam a biologia dos parasitos e seus ciclos de vida, sendo o enfoque, na maior parte dos trabalhos, dado ao hospedeiro definitivo. Para explicar o vasto alcance que os nematoides parasitos possuem, é fundamental o estudo dos hospedeiros intermediários, uma vez que o grande sucesso evolutivo do grupo em ambientes terrestres e aquáticos se dá por conta de uma série de fatores, incluindo a aquisição de hospedeiros intermediários e paratênicos (ANDERSON 1984; 1988; BLAXTER 2003). Neste sentido busca-se com este trabalho elucidar as relações filogenéticas existentes entre os parasitos da infraordem Spiruromorpha, relacionando-as com seus hospedeiros vertebrados e intermediários, levando em conta a dieta dos intermediários, tendo como base o marcador 18S rRNA e da ferramenta filogenética moderna de sinal filogenético para melhor classificação destes seres vivos.

2 DESENVOLVIMENTO

Com a finalidade de investigar o impacto dos hospedeiros intermediários na evolução da infraordem Spiruromorpha, foi realizada a montagem de uma base de dados utilizando sequências disponíveis no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), onde sequências de 18S RNAr referentes a infraordem Spiruromorpha foram triadas seguindo um critério mínimo de possuir pelo menos 1000 pares de base. Esta configuração apresentou uma amostragem de cinquenta e seis sequências contemplando oito das dez superfamílias presentes na infraordem, sendo estas: Acuarioidea (Henry & Sisoff, 1912); Camallanoidea (Travassos, 1920); Diplotrienoidea (Anderson, 1958); Filarioidea (Chabaud & Anderson, 1959); Habronematoidea (Ivaschkin, 1961); Physalopteroidea (Railliet, 1893); Spiruroidea (Oerley, 1885) e Thelazioidea (Skrjabin, 1915). Seguindo este mesmo critério foram selecionadas duas sequências de grupos externos para o estudo *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala: Palaeacanthocephala) e *Dibothriocephalus latus* (Platyhelminthes: Cestoda).

As sequências foram organizadas no editor de texto Notepad++, e base de dados resultante foi carregada na versão online do software MAFFT (KATO E STANDLEY, 2013) em suas configurações padrão, de onde foram obtidas as sequências alinhadas, que foram então visualizadas e editadas com auxílio do software SeaView (GOUY *et al.*, 2010), posteriormente as lacunas de alinhamento foram removidas com o uso do software Gblocks (CASTREESANA, 2000). A base de dados precisou ser reformulada após a visualização e o novo critério adotado foi a seleção de apenas sequências entre 1000 e 2000 pares de base, sendo assim onze espécies foram removidas da base inicial resultando em uma base de dados de quarenta e sete sequências incluindo os grupos externos, que se mantiveram os mesmos. Os procedimentos anteriores foram realizados na nova base de dados até a remoção das lacunas de alinhamento para dar prosseguimento às análises.

A nova base de dados já alinhada foi carregada na plataforma MEGAX (KUMAR *et al.*, 2018), e com o uso da extensão JModelTest (POSADA, 2008) o modelo ideal foi determinado como (GTR + G), sendo este utilizado no método de Inferência Bayesiana (IB), que foi empregado utilizando a plataforma CIPRES, onde o procedimento de análise foi executado em seus servidores por meio da ferramenta MrBayes (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001). As convergências das cadeias de Markov obtidas foram analisadas no programa Tracer (RAMBAUT *et al.*, 2018), sendo feitos ajustes para novos processamentos da inferência bayesiana, chegando

ao número resultante de 1500000 gerações. A árvore filogenética obtida foi estudada no programa figTree (RAMBAUT, A. 2010) e trabalhada com o uso do software Inkscape (INKSCAPE PROJECT, 2020).

Para a verificação das relações filogenéticas entre a evolução de Spiruromorpha e seus hospedeiros vertebrados e intermediários, foram criadas três categorias levando em conta os grupos de hospedeiros intermediários e vertebrados que possuem registro no ciclo de vida das respectivas espécies de parasitos, visando englobar aspectos de captura de hospedeiros e coevolução. A influência de cada categoria na evolução do grupo foi verificada com base em um teste de sinal filogenético. As categorias consideradas foram, primeiro a composição da dieta do hospedeiro intermediário, subdividida em ectoparasítico; detritívoro; predador; filtrador; hematófago; herbívoro; onívoro/necrófago e secreções, segundo os grupos de hospedeiros intermediários, subdivididos em Arachnida (Ixodida) e Chelicerata (Mesostigmata); Crustacea (Amphipoda); Crustacea (Cladocera); Crustacea (Copepoda); Crustacea (Isopoda), Insecta (Orthoptera, Coleoptera) e Myriapoda (Diplopoda); Crustacea (Mysida); Insecta (Blattodea); Insecta (Blattodea, Coleoptera, Orthoptera, Dermaptera); Insecta (Coleoptera); Insecta (Diptera – Ceratopogonidae); Insecta (Diptera – Ceratopogonidae, Simuliidae); Insecta (Diptera – Culicidae); Insecta (Diptera – Drosophilidae); Insecta (Diptera – Muscidae); Insecta (Diptera – Tabanidae); Insecta (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera (Larva)); Insecta (Orthoptera); Insecta (Orthoptera; Blattodea); Insecta (Phthiraptera); Insecta (Coleoptera; Orthoptera); Insecta (Diptera – Simuliidae), e por fim os grupos de hospedeiros definitivos, subdivididos em Mamíferos; Peixes e Aves.

As análises foram conduzidas no programa RStudio (RSTUDIO TEAM, 2020) fazendo uso dos pacotes de ferramentas R ape (PARADIS & SCHLIEP, 2019) e Phytools (REVELL, 2012) levando em conta cada estado de caráter contido nas categorias formuladas (Grupos de Hospedeiros Intermediários, Grupos de Hospedeiros Vertebrados e Composição da Dieta dos Hospedeiros Intermediários). O índice adotado foi o de Pagel λ , sendo apontado como um dos mais robustos dentre os disponíveis para a análise comparativamente (MÜNKEMÜLLER *et al.*, 2012). O índice de Pagel λ permite a inclusão de dados ausentes, avalia a variação do comprimento de ramo ao longo da filogenia e define por meio de teste de verossimilhança entre a hipótese nula 0 (quando não há sinal filogenético) e hipótese alternativa 1 (quando há sinal filogenético) qual destes tem maior probabilidade de ocorrer (PAGEL, 1999).

2.2 RESULTADOS

Tabela 1 – Significância do sinal filogenético por categoria

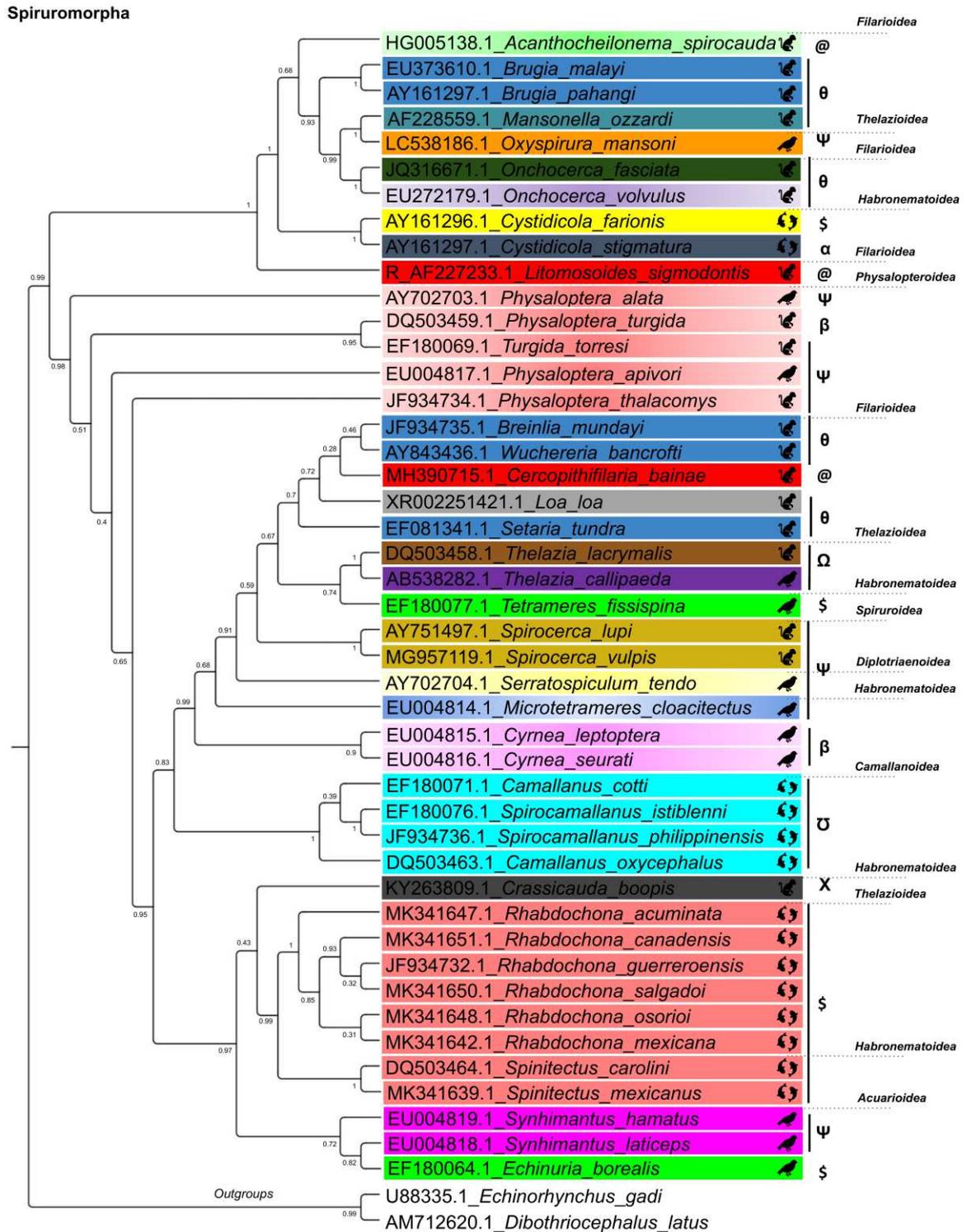
Categorias	Valor de p
Grupo de Hospedeiro Definitivo	1
Composição da Dieta do H.I	0.000291676
Grupo de Hospedeiro Intermediário	0.0414816

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

A análise do sinal filogenético demonstra que os grupos de hospedeiros intermediários e a composição da dieta dos hospedeiros intermediários têm valores significativos $p < 0,05$, nos indicando que estas categorias exercem influência direta na evolução de Spiruromorpha.

O cladograma (Figura 2) gerado por meio da Inferência Bayesiana, com base em sequências de 18S RNAr de representantes de infraordem Spiruromorpha, evidencia as relações filogenéticas e seus valores de suporte, bem como destaca a separação dos grupos formados entre as categorias de sinal filogenético analisadas. Neste está apresentada uma divisão em dois grandes agrupamentos principais, onde o primeiro conta com representantes de Filarioidea (Chabaud & Anderson, 1959), Habronematoidea (Ivaschkin, 1961) e Thelazioidea (Skrjabin, 1915) como um grupo bem suportado e irmão ($s=99$) de um segundo agrupamento menos homogêneo que exhibe representantes das superfamílias Filarioidea, Thelazioidea, Habronematoidea, Physalopteroidea (Railliet, 1893), Diplotriaenoidea (Anderson, 1958), Camallanoidea (Travassos, 1920), Acuarioidea (Henry & Sisoff, 1912) e Spiruroidea (Oerley, 1885), sendo assim a árvore filogenética contempla representantes de oito das dez superfamílias contidas na infraordem Spiruromorpha.

Figura 2 – Cladograma Spiuruomorpha



Dieta do H. I.

- X Dado Ausente
- § Detritívoro
- @ Ectoparasítico
- α Filtrador
- θ Hematófago
- β Herbívoro
- ψ Onívoro/Necrófago
- ⊕ Predador
- Ω Secreções
- Arachnida (Ixodida) (Acari); Chelicerata (Mesostigmata)
- Crustacea (Amphipoda)
- Crustacea (Cladocera)
- Crustacea (Copepoda)
- Crustacea (Isopoda); Insecta (Orthoptera, Coleoptera); Myriapoda (Diplopoda)
- Crustacea (Mysida)
- Insecta (Blattodea)
- Insecta (Blattodea, Coleoptera, Orthoptera, Dermaptera)
- Insecta (Coleoptera)
- Insecta (Diptera – Ceratopogonidae)
- Insecta (Diptera – Ceratopogonidae, Simuliidae)

Grupo do H.I.

- Insecta (Diptera – Culicidae)
- Insecta (Diptera – Drosophilidae)
- Insecta (Diptera – Muscidae)
- Insecta (Diptera – Tabanidae)
- Insecta (Ephemeroptera, Trichoptera, Plecoptera)
- Insecta (Orthoptera)
- Insecta (Orthoptera; Blattodea)
- Insecta (Phthiraptera)
- Insecta (Coleoptera; Orthoptera)
- Insecta (Diptera – Simuliidae)
- Dado Ausente

Grupo do H.D.

- Aves
- Mamíferos
- Peixes

3 DISCUSSÃO

As relações entre parasito e hospedeiro são estudadas levando em conta muitos fatores, a colonização de novos hospedeiros, bem como a coevolução e coespeciação são marcadamente reportados em estudos de evolução como uma saída para o entendimento da filogenia dos parasitos (HAFNER & PAGE, 1995; BLAXTER, 2003). A diversificação em Spiruromorpha para os grupos avaliados no estudo pode ter sido moldada ecologicamente, além de outros fatores envolvendo a mudança de hospedeiros (CHABAUD & BAIN, 1994), neste sentido há duas formas de colonização de novos hospedeiros definitivos: mudar entre recursos ecologicamente equivalentes, neste caso considera-se o hospedeiro vertebrado como recurso, ou resultado do desenvolvimento de novos atributos e adaptações que permitam ao parasito utilizar uma nova gama de potenciais hospedeiros definitivos, geralmente atreladas às capacidades de transmissão e infectividade (HOBERG & BROOKS, 2008). Dessa forma, ao infectar um novo hospedeiro intermediário, teoricamente levaria a uma maior chance deste parasito alcançar seu hospedeiro definitivo, infectando-o (CHOISY *et al.*, 2003). Neste sentido, há um favorecimento nos grupos estudados para a adoção de ciclos de vida complexos, e nestes o estudo dos hospedeiros intermediários auxilia na melhor compreensão de suas relações filogenéticas.

É correto assumir que a composição da dieta dos hospedeiros definitivos possui influência direta na capacidade de transmissão dos parasitos de ciclo indireto, e, portanto os recursos explorados por eles estão atrelados a possibilidade de mudança de hospedeiros e diversificação dos grupos de parasitos, onde a mudança de hospedeiros ocorre com mais frequência entre hospedeiros que pertencem a uma mesma guilda (MARCOGLIESE, 2002; HOBERG & BROOKS, 2008). No presente estudo este conceito foi aplicado ao se considerar, além dos próprios grupos dos hospedeiros definitivos e intermediários, a composição da dieta dos hospedeiros intermediários como uma categoria para a análise do sinal filogenético, o que se traduziu em uma resposta positiva em nossos resultados, indicando que este fator exerce influência evolutiva.

Filarioidea, que aparece como um grupo artificial, apresenta representantes da família Onchocercidae que se concentram em dois grupos maiores. No clado 1 (Figura 3) *Litomosoides sigmodontis* é irmão ($s=1$) de um grupo que contém os outros representantes da família, sendo notáveis os isolamentos dos bem suportados ($s=1$) gêneros *Brugia* e *Onchocerca*, onde o clado formado por *Brugia* é

irmão (s=93) do agrupamento onde *Onchocerca* está inserido. *Mansonella ozzardi* se associa como grupo irmão (s=1) de *Oxyspirura mansoni* (Thelazioidea), entretanto são separados por todas as categorias de sinal filogenético testadas, reforçando a separação das superfamílias neste ponto, e ao se analisar a evolução com base na morfologia do gênero, existe a indicação de que a diversificação do gênero *Mansonella* pode ter ocorrido de forma independente (CHABAUD & BAIN, 1994), corroborando com a configuração exibida. O gênero *Brugia* se mostrou coeso com relação às categorias testadas de sinal, possuindo mamíferos como seus hospedeiros definitivos, sendo culicídeos de dieta hematófaga para ambas as espécies, *B. malayi* e *B. pahangi*, reforçando a associação do gênero levando em conta os resultados positivos de sinal para as categorias.

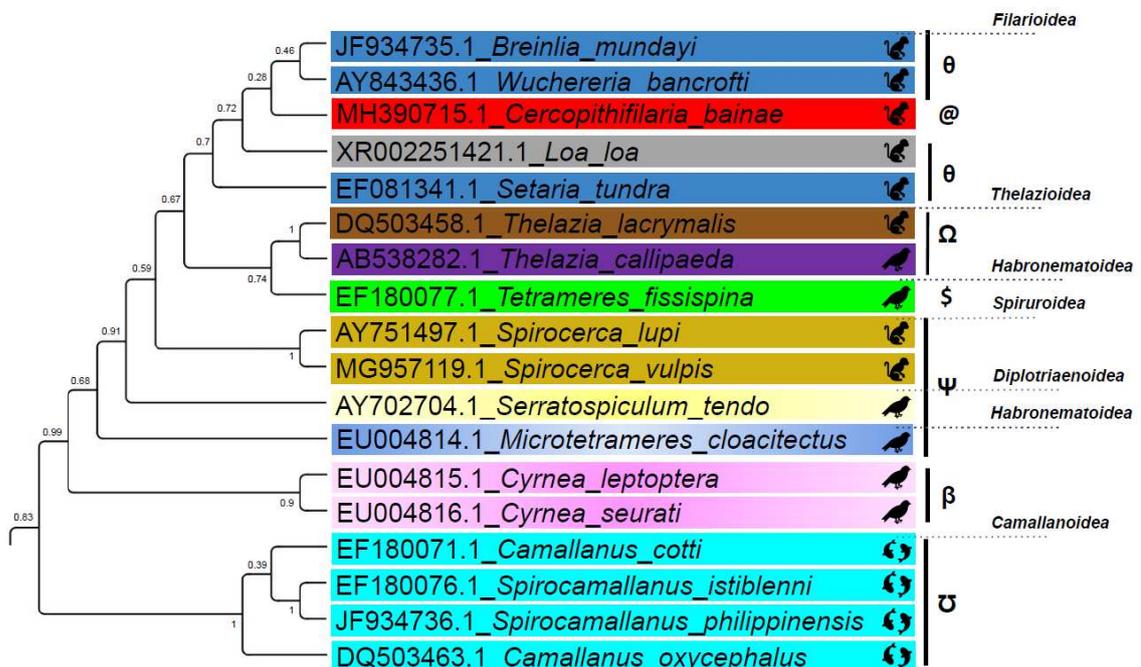
No caso do gênero *Onchocerca*, representado pelas espécies *O. volvulus* e *O. fasciata*, apesar de compartilharem mamíferos como hospedeiros definitivos e hematofagia como a dieta dos hospedeiros intermediários, eles apresentam diferentes famílias de dípteros como vetores, o que poderia implicar que um alcance maior de táxons de vetores provavelmente pode ter conferido sucesso evolutivo ao gênero, o que é corroborado ao se analisar inferências que levam em conta fatores morfológicos do gênero, onde a distribuição geográfica de seus hospedeiros parece possuir maior influência na evolução do que sua relação com seus hospedeiros definitivos (CHABAUD & BAIN, 1994), o que se repete em nossos resultados levando em conta seus hospedeiros intermediários, porém, estes são conectados pelo tipo de dieta, indicando que este fator pode ser útil para agrupar os integrantes do gênero em reconstruções cladísticas.

Figura 3 – Clado 1



No clado 2 o único representante da família Setariidae (*Setaria tundra*) aparece basal e irmão (s=07) dos representantes de Onchocercidae, as relações dentro da família aqui são mal suportadas indicando mais uma vez que se trata de um agrupamento artificial, dito isso pode-se destacar a relação entre *Breinlia mundayi* e *Wuchereria bancrofti*, que apresentam culicídeos hematófagos como hospedeiros intermediários, sugerindo uma relação mais próxima entre estes gêneros levando em conta a existência de sinal filogenético para estas categorias.

Figura 4 – Clado 2



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

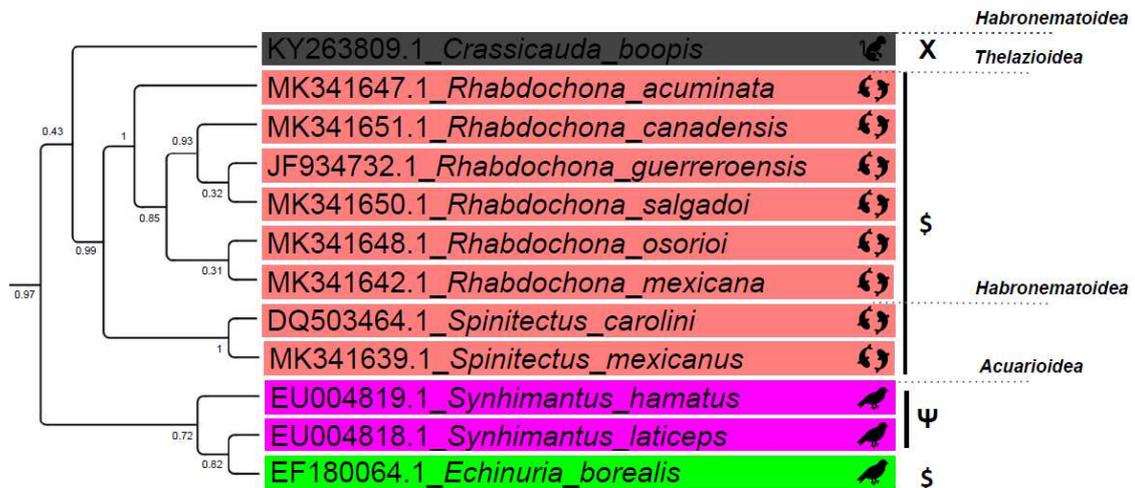
O posicionamento de Filarioidea no presente estudo está em concordância com os resultados encontrados por Choudhury *et al.* (2018), onde a superfamília não aparenta ser um grupo natural. Ao se analisar as categorias de sinal filogenético percebe-se que todos os hospedeiros vertebrados são mamíferos e houve uma predominância de dípteros em ambos os grandes agrupamentos no cladograma. A existência de sinal filogenético indica que os grupos de hospedeiros intermediários e suas dietas possuem influência direta na evolução dos grupos de filarídeos, ainda que sejam difíceis as observações de coevolução, sobretudo parasito-hospedeiro intermediário em Filarioidea (BAIN & BABAYAN, 2003). Sehgal *et al.* (2005) demonstram alta especificidade em formas larvais de filarídeos que possuem como hospedeiro definitivo aves, o que poderia indicar uma abordagem de estudo para o entendimento de seu posicionamento taxonômico em Spiruromorpha uma vez que este seja expandido para hospedeiros mamíferos, sendo possível que devido a alta

especificidade a coespeciação e coevolução seriam linhas para o entendimento dos grupos formados, já que os grupos de hospedeiros intermediários e suas dietas influenciam diretamente na evolução do grupo segundo nossos resultados.

A superfamília Thelazioidea se apresenta no segundo clado (Figura 4) formando um grupo bem suportado ($s=1$) que comporta o gênero *Thelazia* (*T. lacrymalis* e *T. callipaeda*), neste as espécies do gênero apresentam diferentes hospedeiros definitivos e grupos de hospedeiros intermediários distintos apesar de ambos serem dípteros, contudo a dieta dos hospedeiros intermediários conecta este grupo, fomentando a idéia de uma possível captura de hospedeiros ao longo de sua história evolutiva, levando em conta que a diversificação pode ter sido influenciada pela dieta dos hospedeiros intermediários. Este agrupamento forma um grupo irmão ($s= 0,74$) com *Tetrameres fissispina* (Habronematidae), entretanto as distintas categorias de sinal em conjunto com o suporte do agrupamento reforçam a separação entre as superfamílias neste ponto. Ao se relacionar os integrantes da família Thelaziidae levando em conta o gênero *Thelazia* e as espécie *Oxyspirura mansoni*, percebe-se parafilia para a família, reforçada pelas categorias de sinal filogenético avaliadas, onde seus hospedeiros definitivos e intermediários pertencem a grupos distintos, com os últimos ainda apresentando dietas díspares.

Além da relação supracitada envolvendo *Oxyspirura mansoni*, Thelazioidea é representada pela família Rhabdoconidae no terceiro clado (Figura 5), com o gênero *Rhabdochona*, espécies *R. acuminata*, *R. canadensis*, *R. guerreroensis*, *R. guerreroensis*, *R. salgadoi*, *R. osorioi* e *R. mexicana*, que aparecem em agrupamento monofilético ($s=1$) e irmão bem suportado ($s=99$) do gênero *Spinitectus*, representante de Habronematoidea. A congruência das categorias de sinal filogenético entre as espécies de *Rhabdochona* suportam a reconstrução obtida para o grupo, e o associam com *Spinitectus* (Habronematoidea) acompanhando as categorias de sinal, ou seja além de ambos os gêneros possuírem espécies que têm peixes como hospedeiros definitivos, eles compartilham os mesmos grupos de hospedeiros intermediários e de mesma dieta. A coesão da família Rhabdoconidae, bem como a sua relação com *Spinitectus* é também reportada por Černotíková *et al.* (2011), onde em sua reconstrução a família também aparece como um grupo natural.

Figura 5: Clado 3



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

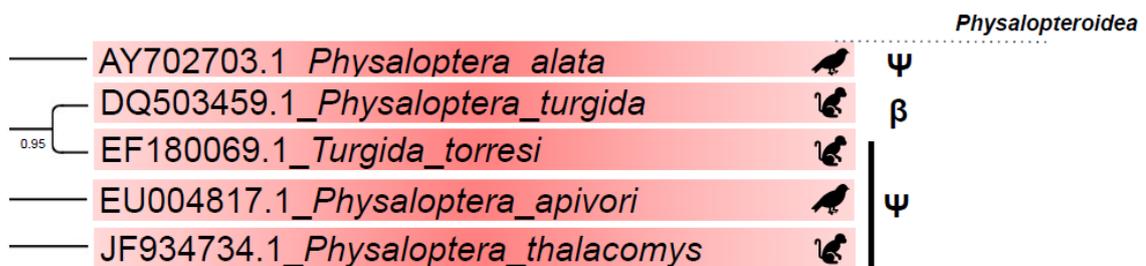
Habronematoidea, no primeiro clado (Figura 3) conta com o gênero *Cystidicola*, espécies *C. farionis* e *C. stigmatura* formando um clado que apesar de bem suportado ($s=1$) apresenta diferentes grupos de crustáceos como hospedeiros intermediários e dietas díspares, onde *C. farionis* conta com Amphipoda como grupo de hospedeiro intermediário de dieta detritívora e em *C. stigmatura* Mysida filtradores, este grupo é irmão ($s=1$) do agrupamento que comporta integrantes de Filarioidea e *Oxyspirura mansonii* (Thelazioidea), contudo o gênero se distancia deste agrupamento em todas as categorias de sinal verificadas, reforçando a separação das superfamílias nesta configuração.

No clado 2 (Figura 4) a superfamília apresenta o gênero *Cyrnea* com bom valor de suporte ($s=0,9$), contando com as espécies *C. leptoptera* e *C. seurati*, parasitos de aves compartilhando grupo de hospedeiros definitivos (Orthoptera) de dieta herbívora reforçando o agrupamento destacado. No clado 3 (Figura 5) *Crassicauda boopis* se apresenta irmão, mal suportado ($s=0,43$) do grupo formado pela família Rhabdochonidae (Thelazioidea) e do gênero *Spinitectus* formado pelas espécies *S. carolini* e *S. mexicanus*, esta relação é reportada em análises que levam em conta dados morfológicos, de distribuição e alcance de hospedeiros (CHABAUD & BAIN, 1994), e também em reconstruções filogenéticas levando em conta 18S DNAr (CHOUDHURY *et al.*, 2018), sendo que estes compartilham as categorias avaliadas de sinal filogenético, onde em ambas os hospedeiros definitivos são peixes e seus hospedeiros intermediários são insetos aquáticos. Um aspecto interessante de se observar com relação ao isolamento de *Microtetrameres* é que este, apesar de possuir o mesmo hospedeiro definitivo, ele se isola de *Cyrnea* no

cladograma também pelas categorias de sinal que foram positivas, o que pode indicar que teoricamente a diversificação na família Tetrameridae a qual os gêneros pertencem acompanhou a aquisição de hospedeiros intermediários ao longo da evolução. Černotíková *et al.* (2011) apontam parafilia da família Cystidicolidae, convergindo com os resultados obtidos levando em conta os gêneros membros da família (*Cystidicola* e *Spinitectus*), sendo separados também pelo grupo de hospedeiros intermediários e suas dietas.

Physalopteroidea forma uma configuração mal suportada (Figura 6), nesta a família Physalopteridae, que é representada pelos gêneros *Physaloptera* e *Turgida* em nossos resultados, estando externa ao grupo que constitui o clado 2 e 3 (Figura 2), organizado por fracos valores de suporte, sendo separado ainda por diferentes grupos de hospedeiros definitivos (Aves e Mamíferos), contudo eles compartilham grupo de hospedeiros intermediários, sendo (Blattodea, Coleoptera, Orthoptera, Dermaptera). A relação com melhor suporte ($s=0,95$) neste agrupamento é formada por *P. turgida* e *T. torresi*, onde a primeira não acompanha a dieta do hospedeiro alimentar que é apontada para todos os outros membros da família (Onívoro/Necrófago).

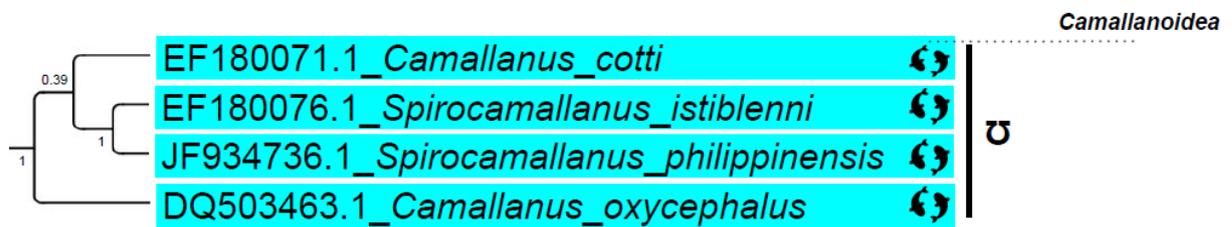
Figura 6 – Physalopteroidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Camallanoidea (Figura 7) conta com membros da família Camallanidae, representada pelos gêneros *Camallanus* e *Spirocamallanus*, sendo as espécies *C. oxycephalus*, *C. cotti*, *C. istiblenni* e *S. philippinensis* formando um grupo bem suportado ($s=1$), em congruência com o que é demonstrado levando em conta análises moleculares integradas a morfologia na família Camallanidae (AILÁN-CHOKE & PEREIRA, 2021). Possuindo peixes como hospedeiros definitivos e isolados das outras superfamílias por suas características relacionadas aos hospedeiros intermediários, onde o grupo de H.I Crustácea (Copepoda) e dieta (Predador) se apresentam somente neste agrupamento, reforçando a monofilia de Camallanidae.

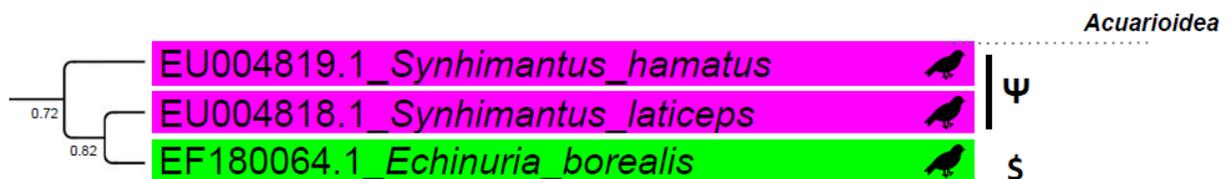
Figura 7 – Camallanoidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

As espécies de Acuarioidea, que possuem como hospedeiros definitivos aves, se agrupam em um clado monofilético ($s=0,72$), convergindo com os resultados obtidos por Černotíková *et al.*, (2011). Constituído por gêneros membros da família Acuariidae (*Synhimantus* e *Echinuria*) As espécies do gênero *Synhimantus* se apresentaram unidas com relação aos grupos de hospedeiros intermediários e suas dietas, fortalecendo a configuração apresentada.

Figura 8 – Acuarioidea



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Diplotriaenoidea conta com uma única espécie no cladograma (Figura 4) *Serratospiculum tendo*, que aparece como grupo irmão ($s=0,91$) de um grupo formado por integrantes de Filarioidea, Thelazioidea, Habronematoidea e Spiruroidea. Possuindo aves como hospedeiros definitivos, e hospedeiros intermediários no grupo constituído por Coleoptera e Orthoptera, de dieta Onívora/Necrófaga compartilhados com representantes de Spiruroidea. Esta configuração não pode ser verificada como monofilética já que o grupo é constituído por uma única espécie, necessitando de mais dados em análises futuras.

Spiruroidea representado no cladograma pelo gênero *Spirocerca* e as duas espécies *S. lupi* e *S. vulpis*, apresenta um robusto suporte para seu agrupamento ($s=1$), corroborando a monofilia destacada por NADLER (2007) para a superfamília. Nesta configuração ela também isola do restante das superfamílias inseridas em seu grupo tanto pelo fraco suporte ($s=0,59$) quanto por sua coesão nas categorias examinadas no teste de sinal filogenético.

4 CONCLUSÕES:

Spiruomorpha não forma um grupo natural, tal configuração é reforçada pelos baixos valores de suporte em combinação com a existência de sinal filogenético para as características que envolvem os hospedeiros intermediários, onde as categorias segregam as superfamílias em alguns agrupamentos formados, contudo fortalecem relações que já são bem estabelecidas por outros parâmetros.

O registro adequado de hospedeiros intermediários naturais no ciclo de vida de Spiruomorpha, bem como o entendimento detalhado acerca da dieta destes invertebrados se faz fundamental para análises futuras envolvendo estes parâmetros, uma vez que outros fatores podem ser essenciais para a compreensão das relações parasito-hospedeiro e sua evolução, como descrito por Otranto (2006), onde somente machos de *Phortica variegata* (Drosophilidae) agem como vetores de *Thelazia callipaeda* por conta de seu padrão de alimentação, que favorece o encontro com o parasito.

A evolução morfológica em alguns grupos de Spiruomorpha é de difícil verificação (CHABAUD & BAIN 1994), enaltecendo bases que levam em conta outros fatores distintivos para verificação da diversificação do grupo, o que demonstra a importância da integração de análises para se solucionar os problemas taxonômicos da infraordem.

De forma geral, a medida que mais sequências se tornarem disponíveis, as incongruências poderão ser minimizadas para a infraordem, a exemplo de Physalopteroidea, onde a inclusão do gênero *Heliconema* em estudos futuros provavelmente poderia elucidar suas relações, uma vez que o gênero foi excluído das análises por não possuir sequências disponíveis com a qualidade determinada em nossa metodologia.

Uma adição ao que foi apresentado no presente estudo seriam trabalhos que abrangem questões de compartilhamento de habitat e nicho ecológico dos hospedeiros intermediários a fim de concluir sobre as indicações de captura de hospedeiros e coevolução, bem como o acréscimo de novos dados moleculares sobre os integrantes da infraordem.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. DE F. P. M. Urbanização, favelas e endemias: a produção da filariose no Recife, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 9, n. 4, p. 487–497, 1993.
- AGBOOLA, O. A.; DOWNS, C. T.; O'BRIEN, G. Macroinvertebrates as indicators of ecological conditions in the rivers of KwaZulu-Natal, South Africa. **Ecological Indicators**, v. 106, n.105465, 2019.
- 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. The origins of zooparasitic nematodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 62 n. 3, p. 317–328, 1984.
- ANDERSON, R. C.; Nematode transmission patterns. **Journal of Parasitology**, v. 74, p. 30-45, 1988.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission**, 2 ed. U.K. (Oxon): CAB International, 2000.
- ANDERSON, R. C.; BAIN, O. Keys to genera of the order Spirurida: Diplostriaenoidea, Aoproctoidea and Filarioidea. In: ANDERSON, R. C.; CHABAUD, A. G.; WILLMOTT, S. **CIH Keys to the Nematodes Parasites of Vertebrates**, 3 ed. UK Commonwealth Agricultural Bureaux, 1976, v. 3, p. 9-116.
- 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. U.K (Farnham Royal): Commonwealth Agricultural Bureaux, 1974.
- BAIN, O.; BABAYAN, S. Behaviour of filariae: morphological and anatomical signatures of their life style within the arthropod and vertebrate hosts. **Filaria Journal**, v. 2, n.16, 2003.
- BLAXTER, M.; LEY, P. D.; DORRIS, M. Patterns and processes in the evolution of animal parasitic nematodes. **Nematology**, v. 2 n.1, p. 43–55, 2000.
- 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. Nematoda: Genes, Genomes and the Evolution of Parasitism. **Advances in Parasitology**, p.101–195, 2003.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of parasitology**, v. 83, p. 575-83. 1997.
- 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.

CHABAUD, A. G. Keys to genera of the order Spirurida. Part 1. Camallanoidea, Dracunculoidea, Gnasthotomatoidea, Physalopteroidea, Rictularioidea and Thelazioidea. In: ANDERSON, R. C., CHABAUD, A. G.; WILLMOTT, S. **CIH Keys to the Nematodes Parasites of Vertebrates**. 3 ed. UK: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1975. p. 1-27.

CHANDY, A.; THAKUR, A. S.; SINGH, M. P.; MANIGAUHA, A. A review of neglected tropical diseases: filariasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 7, p. 581–586, 2011.

CHITWOOD, B. G.; CHITWOOD, M. B. H. Introduction to Nematology, **University Park Press**, 1974.

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.

CHOISY, M.; BROWN, S. P.; LAFFERTY, K. D.; THOMAS, F. Evolution of Trophic Transmission in Parasites: Why Add Intermediate Hosts? **The American Naturalist**, v. 162, n. 2, p. 172–181, 2003.

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.

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.

GRANDJEAN, F.; MOMON, J.; BRAMARD, M. BIOLOGICAL Water Quality Assessment of the Whiteclawed Crayfish Habitat Based on Macroinvertebrate Communities: Usefulness for its Conservation. **Bulletin Français de La Pêche et de La Pisciculture**, v. 370, n. 371, p. 115–125, 2003.

HAFNER, M. S. & PAGE, R. D. M. Molecular Phylogenies and Host-Parasite Cospeciation: Gophers and Lice as a Model System. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 349, n.1327, p.77–83, 1995.

HOBERG, E. P.; BROOKS, D. R. A macroevolutionary mosaic: episodic host-switching, geographical colonization and diversification in complex host-parasite systems. **Journal of Biogeography**, v. 35 n. 9, p. 1533–1550, 2008.

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.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics Applications Notes**, vol. 17 p. 754-755, 2001.

INKSCAPE PROJECT Inkscape, Available at: <https://inkscape.org>. 2020

- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT. multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30 n. 4, p. 772-80, 2013.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K.; BATTISTUZZI, F. U. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p.1547-1549, 2018.
- MALTA, L. S.; PAIVA, F.; ELISEI, C.; TAVARES, L. E. R.; PEREIRA, F. B. A new species of *Raphidascaris* (Nematoda: Raphidascarididae) infecting the fish *Gymnogeophagus balzanii* (Cichlidae) from the Pantanal wetlands, Brazil and a taxonomic update of the subgenera of *Raphidascaris* based on molecular phylogeny and morphology. **Journal of Helminthology**, p. 1–10, 2018.
- MARCOGLIESE, D. J. Food webs and the transmission of parasites to marine fish. **Parasitology**, v. 124, n. 07, 2002.
- 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. A.; BOLOTIN, E.; STOCK, P. Phylogenetic relationships of *Steinernema Travassos, 1927* (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. **Systematic Parasitology**, v. 63, p.161–181, 2006.
- 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.
- OTRANTO, D.; CANTACESSI, C.; TESTINI, G.; LIA, R. P. *Phortica variegata* as an intermediate host of *Thelazia callipaeda* under natural conditions: Evidence for pathogen transmission by a male arthropod vector. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n.10-11, p. 1167–1173, 2006.
- PAGEL, M. Inferring the historical patterns of biological evolution. **Nature**, v. 401, p. 877-884, 1999.
- 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.

SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. Molecular evidence for host specificity of parasitic nematode microfilariae in some African rainforest birds. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 3977–3988, 2005.

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.