

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

**Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Tanaisia valida* Freitas,
1951 (Trematoda: Eucotylidae)**

Tatiele de Aguiar Lopes Soares

Pelotas, 2017

Tatiele de Aguiar Lopes Soares

**Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Tanaisia valida* Freitas,
1951 (Trematoda: Eucotylidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Marcia Raquel Pegoraro de Macedo

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Gertrud Müller Antunes

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S676c Soares, Tatiele de Aguiar Lopes

Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Tanaisia valida* Freitas, 1951 (Trematoda: Eucotylidae) / Tatiele de Aguiar Lopes Soares ; Marcia Raquel Pegoraro de Macedo, orientadora ; Gertrud Müller Antunes, coorientadora. — Pelotas, 2017.

48 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Trematódeo. 2. Eucotylidae. 3. Marcador molecular. 4. DNA ribossômico. I. Macedo, Marcia Raquel Pegoraro de, orient. II. Antunes, Gertrud Müller, coorient. III. Título.

CDD : 614.553

Tatiele de Aguiar Lopes Soares

**Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Tanaisia valida* Freitas,
1951 (Trematoda: Eucotylidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 13 de fevereiro de 2017.

Banca examinadora:

Dr^a Marcia Raquel Pegoraro de Macedo (Orientador)
Doutora em Ciências Biológicas - Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Me. Fabiana Fedatto Bernardon
Mestre em Ciências Biológicas - Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Me. Thainá Dutra Vieira
Mestre em Ciências Biológicas - Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

A Deus, por ter me concedido saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar, apoiaram minhas escolhas e mesmo longe estão sempre intercedendo por mim.

Ao meu esposo Emerson, que esteve presente em cada etapa dessa trajetória, por todo apoio, incentivo e paciência. Obrigada por me mostrar que é possível correr atrás dos nossos sonhos e conquistar nossos objetivos.

À professora Gertrud, que me recebeu de braços abertos no laboratório e sempre me incentivou, sendo de grande influência na minha formação.

À Marcia, que aceitou o desafio de me orientar, teve paciência para todas as minhas dúvidas e questionamentos e me ajudou a superar as dificuldades que apareceram no caminho.

À Fabiana e à Thainá, que me incentivaram a realizar este trabalho e me ajudaram sempre que precisei. Obrigada pelos conselhos e pela amizade que surgiu nessa caminhada.

À Priscila que desde o início da graduação foi minha companheira, sendo meu ombro amigo nos momentos difíceis, mas também compartilhando muitas alegrias e conquistas. Obrigada por essa amizade que vou levar pra vida inteira!

À Carolina, que divide comigo o amor pelos parasitos e que está sempre pronta pra me acompanhar no próximo desafio. Obrigada por todo apoio e companheirismo.

Aos amigos que fiz durante a graduação, agradeço a cada um pela amizade e companhia durante esses cinco anos.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, pelo convívio e troca de aprendizado.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Instituto de Biologia pela oportunidade de uma formação de qualidade.

Agradeço, por fim, aos demais colegas, amigos e todos que de alguma forma apoiaram e ajudaram na minha formação acadêmica durante esses cinco anos de graduação.

Muito obrigada a todos!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor
se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcutá)

Resumo

SOARES, Tatiele de Aguiar Lopes. **Caracterização molecular e relações filogenéticas de *Tanaisia valida* Freitas, 1951 (Trematoda: Eucotylidae)**. 2017. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O parasitismo é considerado um dos modos de vida mais bem sucedidos exibidos pelos organismos vivos. Entretanto, alguns parasitos são mais difíceis de estudar devido ao seu tamanho, ciclos de vida complexos e impedimentos taxonômicos generalizados. Para contornar as limitações associadas com os métodos convencionais de identificação, baseados em caracteres morfológicos e morfometria, técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidas para identificação específica e análise da variação genética de parasitos de diferentes grupos taxonômicos – Trematoda, Cestoda, Nematoda e Acanthocephala. Essa pesquisa realizou a caracterização molecular de trematódeos coletados do passeriforme *Chrysomus ruficapillus*, identificados morfológicamente como *Tanaisia valida*. O objetivo do trabalho foi verificar se todos os exemplares coletados pertenciam à mesma espécie e ampliar o conhecimento da diversidade genética deste trematódeo. Para isso foi realizada extração de DNA dos parasitos e amplificação por PCR utilizando os primers para regiões ITS-2 e 28S do DNA ribossômico. Após o sequenciamento, os dados obtidos foram comparados aos do GenBank para estabelecer a similaridade entre os espécimes de *T. valida*, bem como para diferenciá-la de outras espécies. Além disso, foi analisada a relação entre Eucotylidae e outras famílias de Microphalloidea. As sequências estudadas mostraram identidade com *Tanaisia fedtschenkoi*, *Paratanaisia bragai* e *Tamerlania zarundinyi*, todas pertencentes à Eucotylidae. Foi confirmada a identidade de *T. valida* e sua relação filogenética dentro da família, baseada em análises de Evolução Mínima, Agrupamento de Vizinhos e Máxima Verossimilhança. Nas análises entre as famílias, Eucotylidae apareceu relacionada com Rencolidae, corroborando outros estudos.

Palavras-chave: trematódeo; Eucotylidae; marcador molecular; DNA ribossômico.

Abstract

SOARES, Tatiele de Aguiar Lopes. **Molecular characterization and phylogenetic relationships of *Tanaisia valida* Freitas, 1951 (Trematoda: Eucotylidae)**. 2017. 48f. Monograph. Degree in Biological Sciences, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Parasitism is considered one of the most successful lifestyles exhibited by living organisms. However, some parasites are more difficult to study because of its size, complex life cycles and generalized taxonomic impediment. In order to circumvent the limitations associated with conventional identification methods supported by morphological and morphometric characters molecular biology techniques have been developed for specific identification and analysis of genetic variation of parasites from different taxonomic groups - trematode, cestodes, nematode and acanthocephala. This survey comprises molecular characterization of trematodes collected from *Chrysomus ruficapillus* and morphologically identified as *Tanaisia valida*. The study's aim is to verify whether all collected individuals belong to the same species and to increase the understanding of genetic diversity of this trematode. For this purpose was performed DNA extraction from parasites and amplification by PCR using the primers for the ITS-2 regions and the 28S ribosomal DNA. After sequencing, the data were compared to those in GenBank to establish similarity between the specimens of *T. valida* and to differentiate it from other species. In addition, it was analyzed the relationship between Eucotylidae and other families from Microphalloidea. The sequences studied showed identity with *Tanaisia fedtschenkoi*, *Paratanaisia bragai* and *Tamerlania zarundinyi*, all belonging to Eucotylidae. The identity of *T. valida* and its phylogenetic relationship within the family was confirmed, supported by Minimum Evolution, Neighbor-Joining and Maximum Likelihood analyses. In analyzes among the families, Eucotylidae was related to Rencolidae, corroborating other studies.

Key words: trematode; Eucotylidae; molecular marker; ribosomal DNA.

Lista de Figuras

Figura 1	Subfamílias de Eucotylidae: (A) Eucotylinae, setas indicam o colar muscular delimitando a região anterior do resto do corpo; (B) Tanaisiinae. Fonte: FREITAS, 1951.....	14
Figura 2	A- <i>Tanaisia valida</i> e B- <i>Tanaisia fedtschenkoi</i> . Fonte: FREITAS, 1951.....	15
Figura 3	Esquema das regiões codificadoras do DNA ribossômico (18S, 5.8S e 28S), intercaladas pelos espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2).....	18
Figura 4	Visualização em gel de agarose de fragmentos amplificados por PCR da região 28S do DNAr. 100pb: marcador de peso molecular; 1-5: diferentes amostras de <i>Tanaisia valida</i>	22
Figura 5	Relação filogenética de <i>Tanaisia valida</i> e outras espécies de Eucotylidae e Rencolidae. Árvore inferida com base na região 28S do DNAr utilizando o método de Evolução Mínima, Kimura 2-parâmetros, utilizando 1000 réplicas de bootstrap.....	23
Figura 6	Relação filogenética de <i>Tanaisia valida</i> e outras espécies de Eucotylidae e Rencolidae. Árvore inferida com base na região 28S do DNAr utilizando o método de Agrupamento de Vizinhos, Kimura 2-parâmetros, utilizando 1000 réplicas de bootstrap.....	24
Figura 7	Relação filogenética de <i>Tanaisia valida</i> e outras espécies de Eucotylidae e Rencolidae. Árvore inferida com base na região 28S do DNAr utilizando o método de Máxima Verossimilhança, Kimura 2-parâmetros, utilizando 1000 réplicas de bootstrap.....	24
Figura 8	Visualização em gel de agarose de fragmentos amplificados por PCR da região ITS-2 do DNAr. 100pb: marcador de peso molecular; 1-7: diferentes amostras de <i>Tanaisia valida</i>	25
Figura 9	Alinhamento das nove sequências da região ITS-2 do DNAr de <i>Tanaisia valida</i>	27
Figura 10	Relação filogenética de <i>Tanaisia valida</i> e outras espécies de Microphalloidea. Árvore inferida com base na região ITS-2 do DNAr utilizando o método de Evolução Mínima, Tajima-Nei, com distribuição Gamma (10.1), utilizando 1000 réplicas de bootstrap.....	28

- Figura 11 Relação filogenética de *Tanaisia valida* e outras espécies de Microphalloidea. Árvore inferida com base na região ITS-2 do DNAr utilizando o método de Agrupamento de Vizinhos, modelo Jukes-Cantor, utilizando 1000 réplicas de bootstrap..... 28
- Figura 12 Relação filogenética de *Tanaisia valida* e outras espécies de Microphalloidea. Árvore inferida com base na região ITS-2 do DNAr utilizando o método de Máxima Verossimilhança, Kimura 2-parâmetros com distribuição Gamma e sítios invariáveis (G+I) , utilizando 1000 réplicas de bootstrap..... 29

Lista de Tabelas

Tabela 1	Composição nucleotídica do gene ITS-2 do DNAr da sequência consenso dos espécimes de <i>Tanaisia valida</i>	26
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA Ribossômico
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ITS-2	Espaçador Transcrito Interno 2
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

Sumário

1. Introdução.....	12
1.1 Objetivos.....	13
1.1.1 Objetivo Geral.....	13
1.1.2 Objetivos Específicos.....	13
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1 <i>Tanaisia valida</i>	14
2.2 Marcadores moleculares de DNA ribossômico.....	16
2.2.1 Região 28S do DNAr.....	16
2.2.2 Região ITS-2 do DNAr.....	17
3. Material e Métodos.....	19
3.1 Extração de DNA.....	19
3.2 PCR e sequenciamento de DNA.....	20
3.3 Análises das sequências.....	21
4. Resultados e Discussão.....	22
4.1 Região 28S do DNAr.....	22
4.2 Região ITS-2 do DNAr.....	25
5. Conclusões.....	31
Referências.....	32
Apêndices.....	39
Anexos.....	44

1. Introdução

Os parasitos representam uma grande proporção da biodiversidade no mundo (PRICE, 1980), possuindo importante papel em sistemas e fenômenos biológicos desde o nível molecular ao nível do organismo, em todo o *continuum* de microparasitos a macroparasitos e de seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (BROOKS; HOBERG, 2000). Entretanto, o estudo desses organismos pode ser complicado devido a diversos fatores, como o tamanho, estruturas morfológicas difíceis de visualizar e ciclos biológicos complexos (GÓMEZ; NICHOLS, 2013).

As aves são parasitadas por uma grande diversidade de helmintos, os quais pertencem a três grupos: Platyhelminthes, Acanthocephala e Nematoda. Estes organismos, normalmente, não são vistos e por isso são muitas vezes desconsiderados em estudos de biodiversidade (AMATO; AMATO, 2010).

Os platelmintos são um grupo diverso de organismos terrestres e aquáticos, com espécies de vida livre e parasitos (CAMPOS et al., 1998). Entre eles encontra-se a subclasse Digenea a qual, para alguns autores, representa o maior grupo de metazoários parasitos internos (CRIBB et al., 2001). Porém, devido ao tamanho pequeno e a escassez de informações sobre características taxonômicas, a identificação ao nível de espécie de alguns platelmintos torna-se uma tarefa difícil (LUTON et al., 1992).

Em geral, as abordagens para a identificação e diferenciação de parasitos são baseadas em características morfológicas que, por vezes, são insuficientes para distinguir espécies intimamente relacionadas. Os estudos biológicos são normalmente trabalhosos e podem ser afetados pelo “status” do hospedeiro, metodologia e outros fatores (ANDERSON et al., 1998). Usualmente, a discriminação entre as espécies é baseada em medições médias de uma população

de indivíduos, um trabalho complicado se as populações consistem de espécies estreitamente relacionadas (POWERS, 2004).

Com os avanços da biologia molecular, uma série de técnicas baseadas em DNA foi desenvolvida para identificação específica e análise da variação genética de parasitos (HUANG et al., 2012). Técnicas moleculares em parasitologia estão entre as mais utilizadas para identificação de espécies de trematódeos (MCMANUS; BOWLES, 1996; SRIPALWIT et al., 2015).

O uso de marcadores moleculares permite a identificação de novas espécies, a discriminação entre espécies crípticas, e auxilia na elucidação de seus ciclos de vida (AL-KANDARI et al., 2011; CRIBB et al., 1998; SRIPALWIT et al., 2015). O sequenciamento de DNA proporcionou a criação de bancos de dados que reúnem e disponibilizam informações genéticas de táxons do mundo todo, contribuindo para a realização de pesquisas em taxonomia, filogenia, biologia da conservação e ecologia (BUENO-SILVA, 2012).

Considerando que o uso associado de dados genéticos e morfológicos contribui significativamente para a identificação de parasitos (WILL et al., 2005), exemplares de *Tanaisia valida* Freitas, 1951 (Trematoda: Digenea) foram analisados utilizando marcadores moleculares de DNA ribossômico para auxiliar na identificação específica. Desta forma, este estudo teve o interesse de elucidar a taxonomia de *T. valida* e ampliar o conhecimento da diversidade genética deste trematódeo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- Comprovar a identificação específica de *Tanaisia valida*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar a similaridade intraespecífica de *T. valida*;
- Demonstrar a relação de *T. valida* com outras espécies de Eucotylidae;
- Estabelecer as relações filogenéticas de Eucotylidae na superfamília Microphalloidea.

2. Revisão de Literatura

2.1 *Tanaisia valida*

Eucotylidae Cohn, 1904, compreende trematódeos parasitos de rins e ureteres de várias espécies de aves domésticas e silvestres, e inclui duas subfamílias: Eucotylinae Skrjabin, 1924 (Figura 1A) e Tanaisiinae Freitas, 1951 (Figura 1B). A principal característica diagnóstica de Eucotylinae é a presença de um colar muscular em forma cônica ou triangular, delimitando a região anterior do resto do corpo, enquanto Tanaisiinae não apresenta este colar muscular anterior. Em Tanaisiinae estão alocados os gêneros *Tanaisia* Skrjabin, 1924, *Paratanaisia* (Santos, 1934) e *Tamerlania* Skrjabin, 1924 (FREITAS, 1951; KANEV et al., 2002).

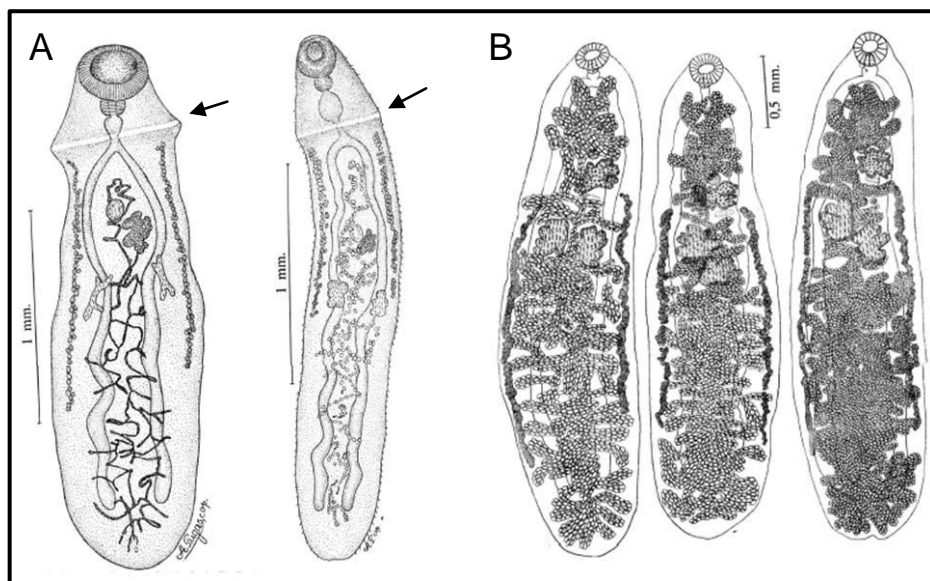


Figura 1 - Subfamílias de Eucotylidae: (A) Eucotylinae, setas indicam o colar muscular delimitando a região anterior do resto do corpo; (B) Tanaisiinae. Fonte: FREITAS, 1951.

Segundo Freitas (1951), as escamas e os espinhos presentes no tegumento dos eucotilídeos são considerados como caráter distintivo de grande importância para a sistemática da família. Entretanto, Odening (1963) afirmou ser necessária uma análise minuciosa de escamas e espinhos das espécies de Eucotylidae, pois, até então, não havia uma descrição detalhada, e muitas vezes sequer uma distinção exata entre estas estruturas. Em função das informações disponíveis serem algumas vezes incompletas e/ou conflitantes, a morfologia do grupo é considerada complexa.

Tanaisia Skrjabin, 1924 compreende 24 espécies conhecidas (FREITAS, 1951), de difícil identificação morfológica, pois as características que as diferem geralmente são sutis e de difícil visualização ao microscópio óptico. Lunaschi et al. (2015), ao redescreverem *Tanaisia dubia* Freitas, 1951, criaram uma chave das espécies neotropicais de *Tanaisia* e uma chave para os gêneros de Tanaisiinae. As autoras salientam a extensão das vitelárias como importante característica morfológica para distinguir os três gêneros de Tanaisiinae. Nas espécies de *Tanaisia* as vitelárias estendem-se a partir da região ovariana ou testicular.

Freitas (1951) considerou *T. valida* (Figura 2A) muito próxima de *Tanaisia fedtschenkoi* Skrjabin, 1924 (Figura 2B), diferenciando-se desta apenas pelo tamanho dos ovos e por sua distribuição geográfica, visto que *T. fedtschenkoi* ocorre na Europa e na Ásia.

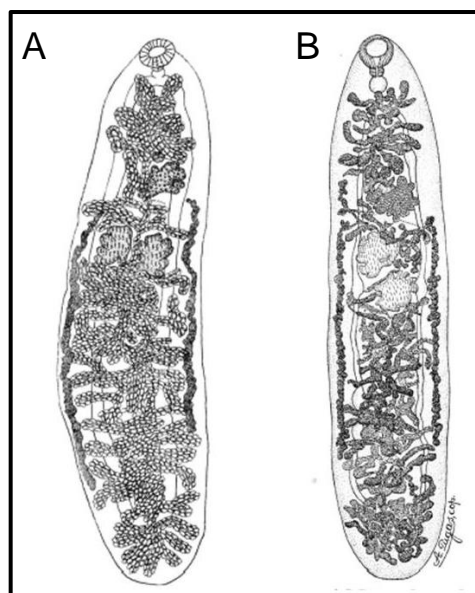


Figura 2 - (A) *Tanaisia valida* e (B) *Tanaisia fedtschenkoi*. Fonte: FREITAS, 1951.

No Brasil, *Tanaisia valida* Freitas, 1951, foi registrada parasitando *Himantopus melanurus* Vieillot, 1817 (Charadriiformes: Recurvirostridae) no estado do Rio de Janeiro (TRAVASSOS et al., 1969), *Paroaria coronata* (Miller, 1776) (Passeriformes: Thraupidae) (MASCARENHAS et al., 2009) e *Molothrus bonariensis* (Gmelin 1789) (Passeriformes: Icteridae) (BERNARDON et al., 2016) no estado do Rio Grande do Sul.

2.2 Marcadores moleculares de DNA ribossômico

O crescente conhecimento sobre a variabilidade de informações genéticas tem estimulado o uso de marcadores moleculares de DNA que, em conjunto com dados morfológicos, fornecem subsídios consistentes na identificação de uma dada espécie (BUENO-SILVA, 2012). Os marcadores moleculares de DNA ribossômico têm sido rotineiramente utilizados para analisar as variações genéticas entre as diferentes espécies de parasitos (AL-KANDARI et al., 2015).

Genes ribossômicos, os quais codificam para componentes estruturais dos ribossomos, são alvos úteis para estudos taxonômicos, pois estão presentes em múltiplas cópias no genoma. Além disso, possuem regiões altamente conservadas (18S, 5.8S e 28S), alternadas com regiões variáveis (regiões espaçadoras), o que possibilita tanto estudos de divergência evolucionária como de diferenciação de espécies (HILLIS; DIXON, 1991; NOLAN; CRIBB, 2005; POWERS, 2004), sendo usados como base para revelar inter-relações dentro e entre as famílias de platelmintos (AL-KANDARI et al., 2011).

2.2.1 Região 28S do DNAr

Os genes que transcrevem para a subunidade maior do DNAr, contém diversas regiões variáveis e conservadas e podem ser utilizadas para inferir relações filogenéticas em diferentes níveis, inclusive entre organismos estreitamente relacionados (HILLIS; DIXON, 1991; TKACH et al., 2000a). A região 28S do DNAr tem sido extensamente utilizada na estimativa das relações existentes dentro e entre famílias de platelmintos (AL-KANDARI et al., 2011; LEE et al., 2007; OLSON et al., 2003).

Tkach et al. (2000b) propuseram a filogenia molecular da subordem Plagiorchiata, baseada em sequências parciais da região 28S do DNAr, esclarecendo a sistemática de 28 espécies de 13 famílias.

Com base em sequências parciais da região 28S do DNAr, Tkach et al. (2001) confirmaram a posição de *Tamerlania zarudnyi* Skrjabin 1924 (Trematoda: Eucotylidae) dentro da família. Além disso, as análises demonstraram uma estreita relação filogenética entre Eucotylidae e Rencolidae, ambos parasitos de rins de aves.

Através de análises das regiões 18S e 28S do DNAr, Olson et al. (2003) propuseram a filogenia e classificação de Digenea, com base em sequências já descritas anteriormente e em outras obtidas para o estudo, incluindo a sequência parcial de *T. fedtschenkoi*. A posição da espécie foi confirmada dentro de Tanaisiinae, no entanto os autores sugerem que mais análises sejam feitas com outros representantes da família, para maior esclarecimento das relações filogenéticas de Eucotylidae.

Análises moleculares utilizando as porções 18S e 28S do DNAr confirmaram a identidade de espécimes de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) e sua posição dentro de Eucotylidae, agrupada com espécies de *Tanaisia* e *Tamerlania* (UNWIN et al., 2013).

2.2.2 Região ITS-2 do DNAr

A região ITS-2 está localizada entre as regiões 5.8S e 28S, que são codificadoras de DNAr (Figura 3), e tem sido usada para diagnóstico ao nível de espécie, pois é conhecida por apresentar variações entre espécies relacionadas e variações intraespecíficas em menor frequência (LUTON et al., 1992; PRASAD et al., 2008).

Em estudos anteriores com platelmintos a região ITS-2 demonstrou bons resultados, sendo útil na diferenciação entre *Fasciola hepática* Linnaeus, 1758 e *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 (Trematoda: Fasciolidae) (ADLARD et al., 1993; AGATSUMA et al., 2000), entre *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 e *Schistosoma haematobium* Bilhartz, 1852 (Trematoda: Schistosomatidae) (BARBER et al., 2000) e entre *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) de *Paragonimus heterotremus* Chen

e Hsia (1964) (Trematoda: Paragonimidae), utilizando o DNA de metacercárias nas análises (TANDON et al., 2007).

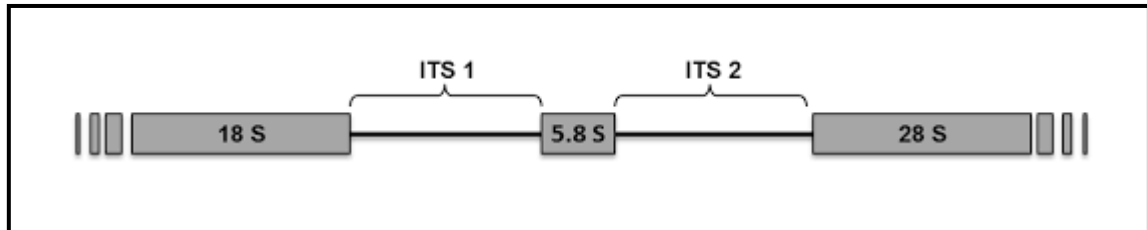


Figura 3 - Esquema das regiões codificadoras do DNA ribossômico (18S, 5.8S e 28S), intercaladas pelos espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2). Fonte: Modificado da internet.

Utilizando sequências da região ITS-2 e outras sequências de DNAr de *Haematoloechus* Looss, 1899 (Trematoda: Plagiorchiformes), foi possível compreender as relações entre as espécies do gênero (LEÓN-RÈGAGNON et al., 1999), demonstrando que a utilização de um conjunto de marcadores moleculares pode enriquecer os resultados das análises.

Três espécies de *Plagiorchis* Lühe, 1899 (Trematoda: Plagiorchiidae) com descrição confusa devido à alta semelhança morfológica, foram claramente distinguidas usando sequências completas de ITS (ITS-1+5.8S+ITS-2) (TKACH et al., 2000a).

Sequências ITS de ovos e adultos de *Fasciolopsis buski* (Lankaster, 1857) (Digenea:Fasciolidae) foram consideradas idênticas em tamanho e composição. Além disso, foi possível estabelecer as relações com outros membros da família. Os resultados demonstraram que as sequências ITS são conservadas durante as diferentes fases do desenvolvimento da espécie, sendo que ITS-1 parece ser menos conservada do que a região ITS-2 (PRASAD et al., 2007).

3. Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPASIL), localizado no Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Foram analisados 25 exemplares de *T. valida*, provenientes do passeriforme *Chrysomus ruficapillus* (Vieillot, 1819) (n=14), coletados na Granja 4 Irmãos S.A. Agropecuária, Indústria e Comércio, produtora de arroz irrigado localizada no município do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (32° 24.36" S - 52° 49.38" W) de dezembro de 2013 a julho de 2014 (ICMBio n°41095-3; CEEA/UFPel n°1477) (Anexo A e B).

Os espécimes destinados ao estudo molecular foram identificados morfológicamente de acordo com Freitas (1951) e Lunaschi et al. (2015) e armazenados em etanol 70% a -20°C. Antes da extração, os parasitos foram montados entre lâmina e lamínula, fotografados para testemunho morfológico e posteriormente, lavados em solução fisiológica.

3.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA, os trematódeos foram macerados em uma solução de 70µL de SDS 10% e 6µL proteinase K 33% e incubados a 55°C por 36-48 horas. Após a incubação, a extração de DNA seguiu o protocolo do fenol-clorofórmio estabelecido por Sambrook et al. (1989). O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

3.2 PCR e sequenciamento de DNA

Os primers utilizados para a avaliação e amplificação por PCR da região ITS-2 do DNAr foram 3S (5'-CGGTGGATCACTCGGCTCGT-3') e 28A (5'-CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3') (BOWLES et al., 1995); e para a região 28S do DNAr foram utilizados LSU5 (5'-ACCCGCTGAAYTTAAGCA-3') e LSU3 (5'-TCCTGAGGGAACTTCGG-3') (LITTLEWOOD et al., 1995).

Para o preparo de cada reação foram utilizados: 1-5 μ L (50-100ng) do DNA extraído, 0,5 μ M de cada primer, 12,5 μ L de mix de PCR 2X (GoTaq® Green Master Mix – Promega) e adicionado água ultra pura esterilizada para completar o volume final de 25 μ L.

Para amplificação do material genético foi utilizado termociclador Amplitherm. As condições de amplificação para 3S-28A foram: desnaturação inicial a 95°C por 5min, 35 ciclos a 95°C por 1min, 55,7°C por 1min, 72°C por 1min30s, e uma extensão final a 72°C por 8min, seguido por resfriamento a 4°C. As condições para LSU5-LSU3 foram: desnaturação inicial a 95°C por 5min, 35 ciclos a 95°C por 1min, 55,7°C por 40s, 72°C por 1min30s, e uma extensão final a 72°C por 8min, seguido por resfriamento a 4°C. Controles negativos (mix e água) foram utilizados em cada PCR realizado.

Os amplicons foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,2% corado com Blue Green Loading Dye I (LGC) em solução de TBE 0,5X (Tris-base 0,4M; ácido bórico 0,2M, solução de EDTA 0,5M, pH 8,0). O marcador padrão utilizado foi 100pb DNA Ladder (Promega). Os géis foram observados e fotografados em sistema de fotodocumentação (L-Pix EXSystem Loccus Biotecnologia).

Por fim, os amplicons foram submetidos à purificação através do uso do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e ao processo de sequenciamento automático, pela empresa Macrogen Advancing Through Genomics (Coréia do Sul) (<http://www.macrogen.com>). Para garantir a máxima precisão, cada produto de PCR foi sequenciado três vezes separadamente.

3.3 Análises das sequências

Os dados obtidos a partir do sequenciamento foram comparados por meio de BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool-BLAST) (ZHANG et al., 2000) aos do GenBank. As sequências que apresentaram maior identidade com as sequências consenso de cada região do DNAr foram selecionadas para as análises filogenéticas, e estão descritas nos Apêndices A e B.

As sequências da região ITS-2 foram submetidas ao alinhamento através do software Clustal W (THOMPSON et al., 1994) e editadas manualmente. A composição nucleotídica desta região foi calculada com o software Mega 7.0 (KUMAR et al., 2016).

Foram construídas árvores filogenéticas para as regiões 28S e ITS-2 utilizando o software Mega 7.0 e os métodos de Evolução Mínima (CAVALLI-SFORZA; EDWARD, 1967), Agrupamento de Vizinhos (SAITOU; NEI, 1987) e Máxima Verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981), no software Mega 7, todas com bootstrap de 1000 replicações (FELSENSTEIN, 1985).

Nas análises com 28S, as três árvores foram construídas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980), com uso do padrão de distribuição Gamma. Nas análises com ITS-2, para o método de Agrupamento de Vizinhos, foi utilizado o modelo de substituição Jukes-Cantor (JUKES; CANTOR, 1969) com padrão de distribuição de taxas uniformes. O modelo de distância Tajima-Nei (TAJIMA; NEI, 1984) foi utilizado para a reconstrução filogenética de Evolução Mínima com padrão de distribuição Gamma. Para o método da Máxima verossimilhança foi utilizado o modelo Kimura 2-parâmetros com uso do padrão de distribuição Gamma e sítios invariáveis (G+I).

4. Resultados e Discussão

4.1 Região 28S do DNAr

Nove sequências parciais da região 28S do DNAr foram obtidas. No entanto apenas três (Tv4, Tv6, Tv12) apresentaram qualidade ideal para as análises. As demais sequências apresentaram qualidade baixa nos cromatogramas ou eram muito pequenas (259pb), portanto não foram incluídas nas análises. As sequências produzidas foram depositadas no GenBank (Apêndice C).

O comprimento das sequências estudadas variou entre 1500 e 1600pb (Figura 4). No entanto, para otimizar as análises moleculares, a matriz de dados foi editada em tamanho padrão com 1272pb.

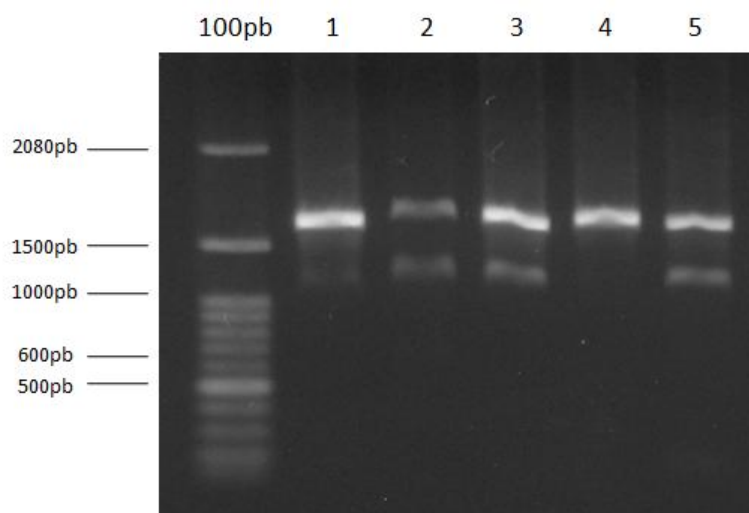


Figura 4 - Visualização em gel de agarose de fragmentos amplificados por PCR da região 28S do DNAr. 100pb: marcador de peso molecular; 1-5: diferentes amostras de *Tanaisia valida*.

A sequência consenso foi submetida a um BLAST no GenBank. Não houve homologia de 100%, o que confirma que a espécie estudada não possui sequência

depositada no banco de dados. A maior identidade ocorreu com *Tanaisia fedtschenkoi* (97%), seguida de *Paratanaisia bragai* (90%) e *Tamerlania zarudnyi* (88%). As três espécies pertencem à Tanaisiinae, corroborando a relação da espécie analisada com a subfamília. A alta identidade com *T. fedtschenkoi* condiz com a semelhança morfológica descrita por Freitas (1951).

Para as análises filogenéticas, além das espécies de Eucotylidae, foram utilizados representantes de Renicolidae, a fim de confirmar a relação entre as famílias. A espécie *Brachycoelium salamandrae* foi escolhida como grupo externo, assim como na análise filogenética de Microphalloidea proposta por Tkach (2003). Foram geradas duas árvores baseadas nos métodos de distância Evolução Mínima e Agrupamento de Vizinhos (Figuras 5 e 6), e uma árvore no método Máxima Verossimilhança, que é baseado em caráter (Figura 7).

As árvores de Evolução Mínima e Agrupamento de Vizinhos apresentaram topologia semelhante, onde as sequências de *T. valida* formaram um grupo separado das demais espécies de Eucotylidae, que por sua vez, agruparam com Renicolidae. A relação entre essas duas famílias pode ser confirmada por esses resultados, no entanto, a distância das sequências de *T. valida* estudadas não era esperada. Além disso, a sequência Tv4 se mostrou mais distante de Tv6 e Tv12.

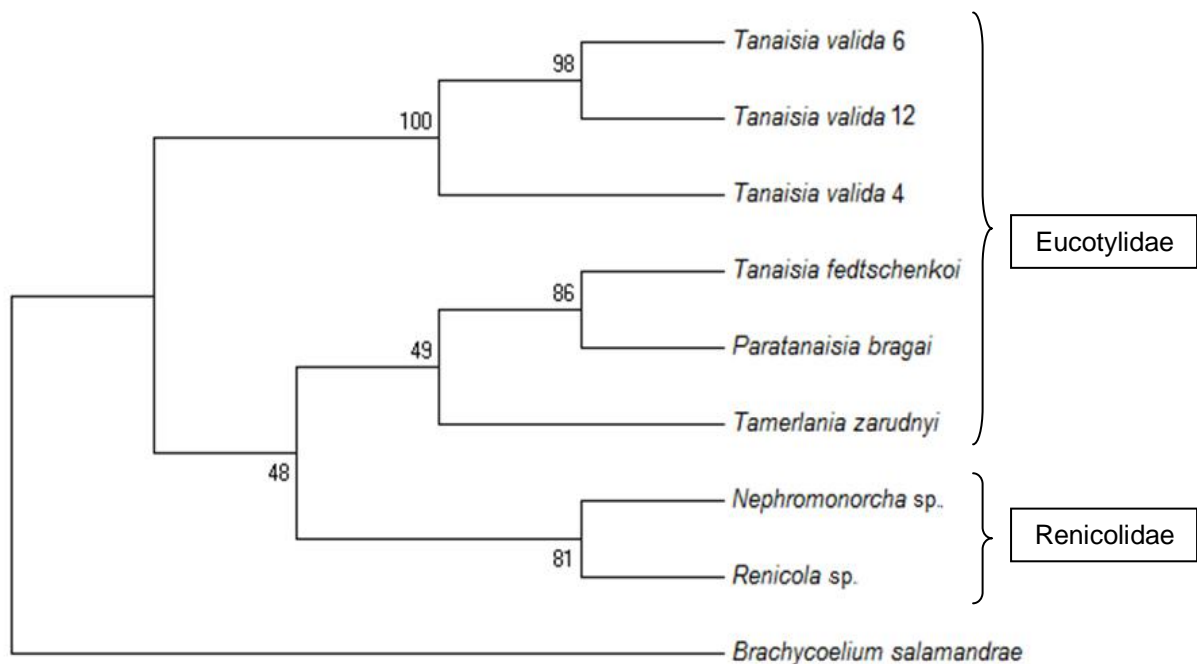


Figura 5 - Relação filogenética de *Tanaisia valida* e outras espécies de Eucotylidae e Renicolidae. Árvore inferida com base na região 28S do DNAr utilizando o método de Evolução Mínima, Kimura 2-parâmetros, utilizando 1000 réplicas de bootstrap.

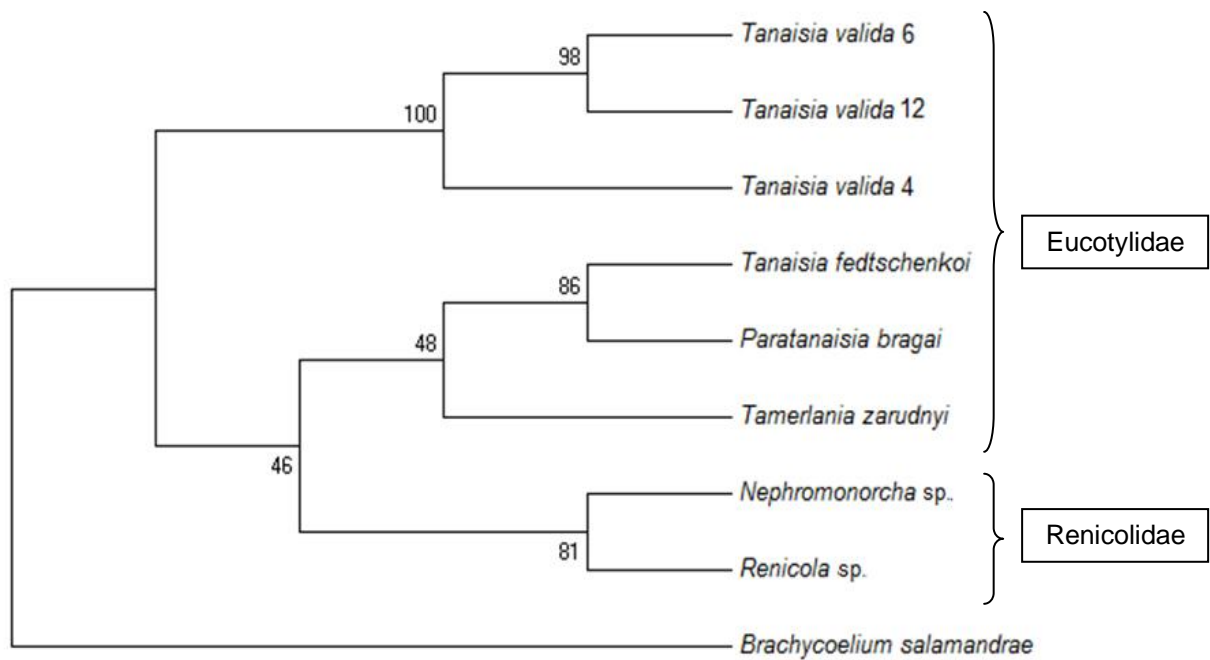


Figura 6 - Relação filogenética de *Tanaisia valida* e outras espécies de Eucotylidae e Renicolidae. Árvore inferida com base na região 28S do DNAr utilizando o método de Agrupamento de Vizinhos, Kimura 2-parâmetros, utilizando 1000 réplicas de bootstrap.

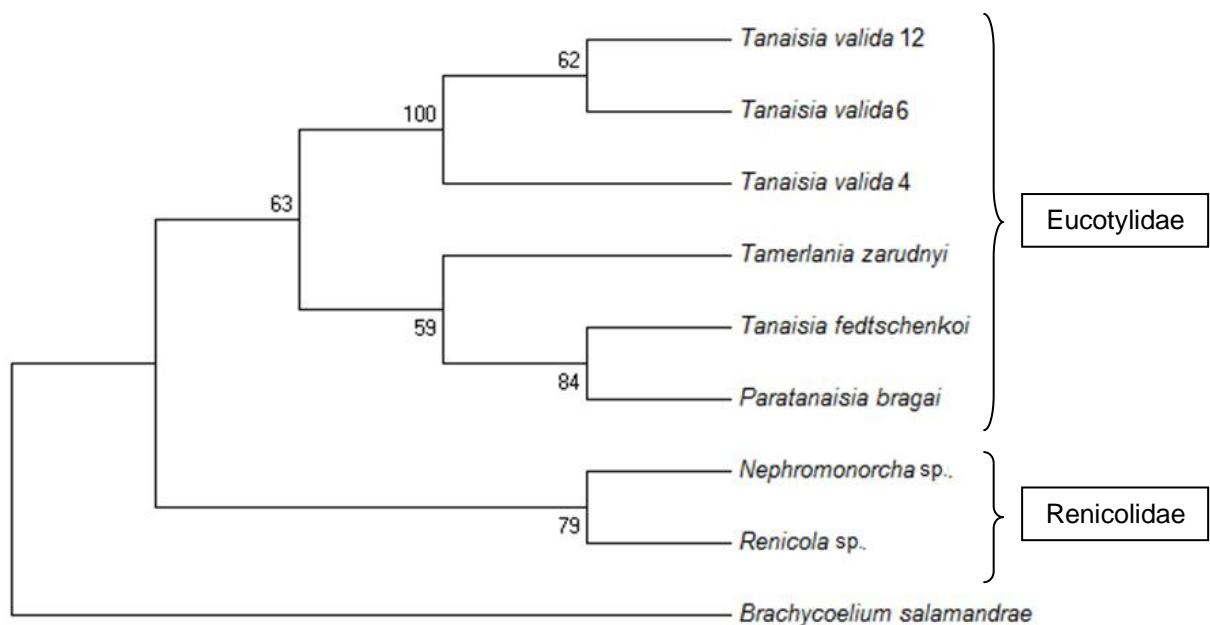


Figura 7 - Relação filogenética de *Tanaisia valida* e outras espécies de Eucotylidae e Renicolidae. Árvore inferida com base na região 28S do DNAr utilizando o método de Máxima Verossimilhança, Kimura 2-parâmetros. Foram realizadas 1000 réplicas de bootstrap.

A árvore de Máxima Verossimilhança apresentou conformação diferente das demais. Eucotylidae e Renicolidae aparecem como grupos irmãos. No entanto, dentro do ramo de Eucotylidae houve ramificações entre as sequências de *T. valida*

e as demais espécies. Apesar disso, este resultado é o que mais se aproxima dos estudos feitos por Olson (2003) e Tkach (2001).

Mesmo demonstrando certa distância genética das demais espécies da família, o marcador da região 28S do DNAr foi conclusivo para a identificação específica dos espécimes analisados neste estudo, bem como para a diferenciação entre *T. valida* e *T. fedtschenkoi*, e a confirmação da espécie dentro de Eucotyliidae. Estudos filogenéticos com outros marcadores moleculares deverão confirmar as relações evolutivas entre as espécies desta família. Há evidências crescentes de que o uso associado de sequências de genes 28S e 18S do DNAr é útil para esclarecer filogenias complexas (ANDRES et al., 2014; WAESCHENBACH et al., 2007; ZHENG et al., 2014), como é o caso deste estudo.

4.2 Região ITS-2

Foram obtidas dezesseis sequências parciais da região ITS-2 do DNAr, das quais nove (Tv1, Tv6, Tv7, Tv8, Tv9, Tv11, Tv12, Tv17 e Tv25) apresentaram boa qualidade para as análises e foram depositadas no GenBank (Apêndice D). As demais sequências não foram incluídas devido à baixa qualidade verificada nos cromatogramas.

O comprimento das sequências variou entre 500 e 600pb (Figura 8), no entanto, a matriz de dados foi editada em tamanho padrão com 390pb. A otimização das sequências foi feita para possibilitar a inclusão dos demais trematódeos pertencentes às famílias de Microphalloidea no estudo, pois os fragmentos encontrados no GenBank eram pequenos (~400pb).

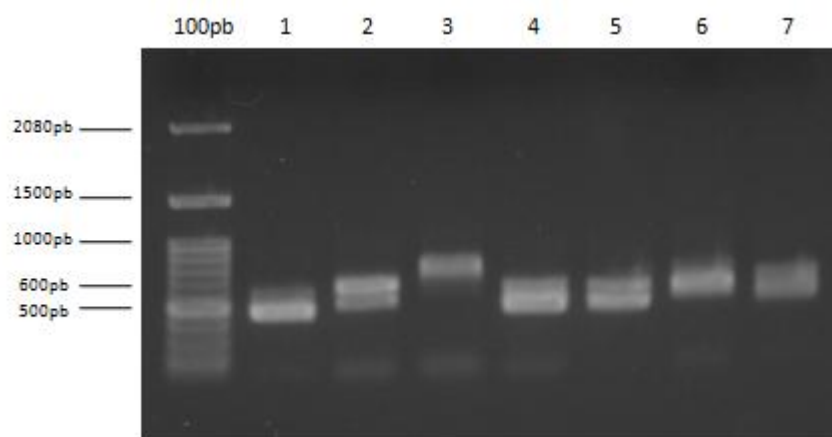


Figura 8 - Visualização em gel de agarose de fragmentos amplificados por PCR da região ITS-2 do DNAr. 100pb: marcador de peso molecular; 1-7: diferentes amostras de *Tanaisia valida*.

A composição nucleotídica das sequências de *T. valida* não revelou diferenças significativas, com A+T apresentando valores ligeiramente maiores que C+G (Tabela 1). Essa similaridade entre as bases na região ITS-2 do DNAr é típica da maioria dos organismos eucariotos, e já foi relatada para outros trematódeos, como *Fasciola*, *Schistosoma* e *Dolichosaccus* (LUTON et al., 1992; MICHOT et al., 1993; SEMYENOVA et al., 2005). No entanto, em alguns organismos eucariotos a região ITS-2 pode apresentar diferenças significativas. É o caso de plantas pertencentes à Poaceae, nas quais foram observados 77% de C+G (TAKAIWA et al., 1985); *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae) com 80% de A+T (TAUTZ et al., 1988); e em humanos 83% de C+G (GONZALEZ et al., 1990).

Tabela 1 - Composição nucleotídica do gene ITS-2 do DNAr das nove sequências de *Tanaisia valida*.

Sequência	A %	T %	C %	G %	AT %	CG %	Comprimento (pb)
Tv1	26.2	24.1	22.3	27.4	50.3	49.7	390
Tv6	26.2	24.1	22.3	27.4	50.3	49.7	390
Tv7	26.2	24.2	22.1	27.5	50.4	49.6	389
Tv8	26.9	23.6	22.3	27.2	50.5	49.5	390
Tv9	26.2	24.2	22.1	27.5	50.4	49.6	389
Tv11	26.2	24.1	22.3	27.4	50.3	49.7	390
Tv12	26.2	24.1	22.3	27.4	50.3	49.7	390
Tv17	26.2	24.1	22.3	27.4	50.3	49.7	390
Tv25	26.2	24.1	22.3	27.4	50.3	49.7	390

A – Adenina, T – Timina, C – Citosina, G – Guanina

O alinhamento mostrou que a sequência TV7 apresentou deleção do nucleotídeo A no sítio 17, enquanto a sequência TV9 apresentou deleção do mesmo nucleotídeo no sítio 34. Substituições ocorreram apenas na sequência TV8: G>T (transversão) no sítio 53 e C>T (transição) nos sítios 54 e 55 (Figura 9). As outras seis sequências não apresentaram substituições e/ou deleções.

A região ITS-2 do DNAr, costuma apresentar variação intraespecífica baixa e muitas vezes aparentemente ausente (NOLAN; CRIBB, 2005; RINALDI, 2005), sendo mais conservada do que a região ITS-1 (AL-KANDARI et al., 2015; PRASAD et al., 2007). Essas regiões com poucas diferenças acentuadas são consideradas melhores para estudos taxonômicos e filogenéticos, não apenas em nível de espécie e gênero, mas também para as famílias e grupos superiores (COLEMAN; VACQUIER, 2002; LUTON et al., 1992)

```

Tv1  TTAATGCGGACTGTTAACTGTTGGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGG [60]
Tv6  .....
Tv7  .....
Tv8  .....
Tv9  .....
Tv11 .....
Tv12 .....
Tv17 .....
Tv25 .....

Tv1  TTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTACAAACTATCACGACGCCCAACAAG [120]
Tv6  .....
Tv7  .....
Tv8  .....
Tv9  .....
Tv11 .....
Tv12 .....
Tv17 .....
Tv25 .....

Tv1  TCGTGGCTTGAGTCTTGCCAGCCTGCGTGATTTCTCCCGTATTGGACTTATGGTCCTTGG [180]
Tv6  .....
Tv7  .....
Tv8  .....
Tv9  .....
Tv11 .....
Tv12 .....
Tv17 .....
Tv25 .....

Tv1  GAGTGCAGGAACTGTGGCTTCTCTCAAATATGTCCGGACGACCACTCTTATTGGTGGCGG [240]
Tv6  .....
Tv7  .....
Tv8  .....
Tv9  .....
Tv11 .....
Tv12 .....
Tv17 .....
Tv25 .....

Tv1  AGTCGTGGCTCAGTAATACGAAAGTGCGCGCTTCGCTGAGTGACATGATGGCGTCCGTGA [300]
Tv6  .....
Tv7  .....
Tv8  .....
Tv9  .....
Tv11 .....
Tv12 .....
Tv17 .....
Tv25 .....

Tv1  TGTATGTGTA CT CAGTGACATGTAATTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGTACCCGCTG [360]
Tv6  .....
Tv7  .....
Tv8  .....
Tv9  .....
Tv11 .....
Tv12 .....
Tv17 .....
Tv25 .....

Tv1  AACTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAA [390]
Tv6  .....
Tv7  .....
Tv8  .....
Tv9  .....
Tv11 .....
Tv12 .....
Tv17 .....
Tv25 .....

```

Figura 9 – Alinhamento das nove sequências da região ITS-2 do DNAr de *Tanaisia valida*. Os quadrados mostram as deleções e os nucleotídeos em cinza as substituições.

Quanto às análises filogenéticas, foram geradas árvores baseadas nos métodos de Evolução Mínima, Agrupamento de Vizinhos e Máxima Verossimilhança (Figuras 10, 11 e 12). Não foram encontradas sequências depositadas no GenBank para a região ITS-2 do DNAr de outras espécies pertencentes à Eucotylidae. Dessa forma, as análises dessa região foram feitas utilizando representantes de famílias relacionadas, todas pertencentes a Microphalloidea. Para grupo externo foi utilizada a sequência de uma metacercária não identificada.

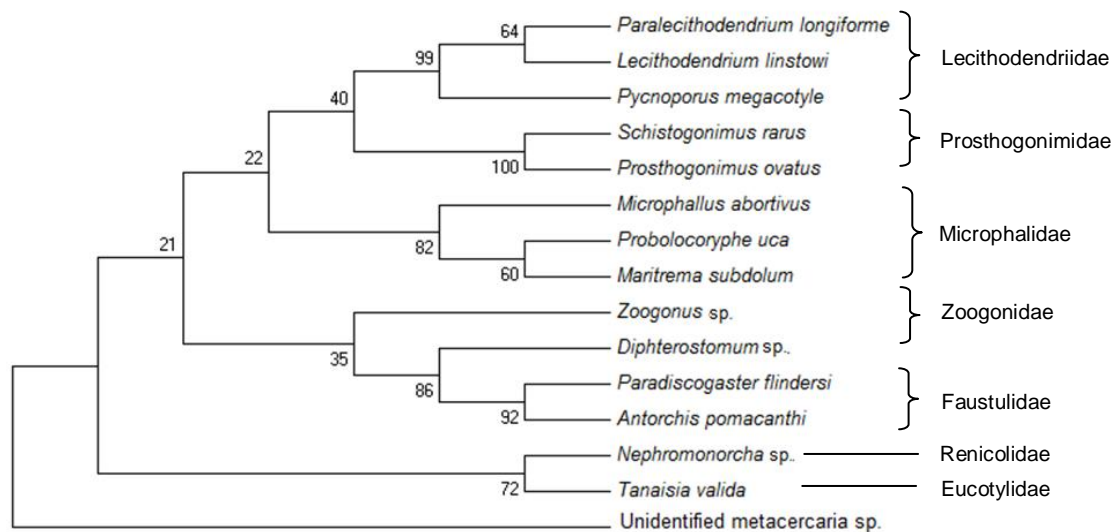


Figura 10 - Relação filogenética de *Tanaisia valida* e outras espécies de Microphalloidea. Árvore inferida com base na região ITS-2 do DNAr utilizando o método de Evolução Mínima, Tajima-Nei, com distribuição Gamma (10.1). Foram realizadas 1000 réplicas de bootstrap.

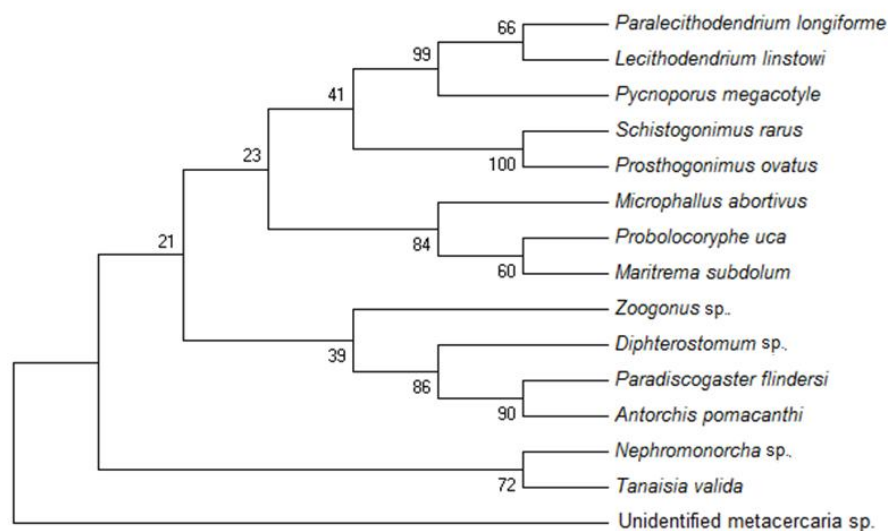


Figura 11 - Relação filogenética de *Tanaisia valida* e outras espécies de Microphalloidea. Árvore inferida com base na região ITS-2 do DNAr utilizando o método de Agrupamento de Vizinhos, modelo Jukes-Cantor. Foram realizadas 1000 réplicas de bootstrap.

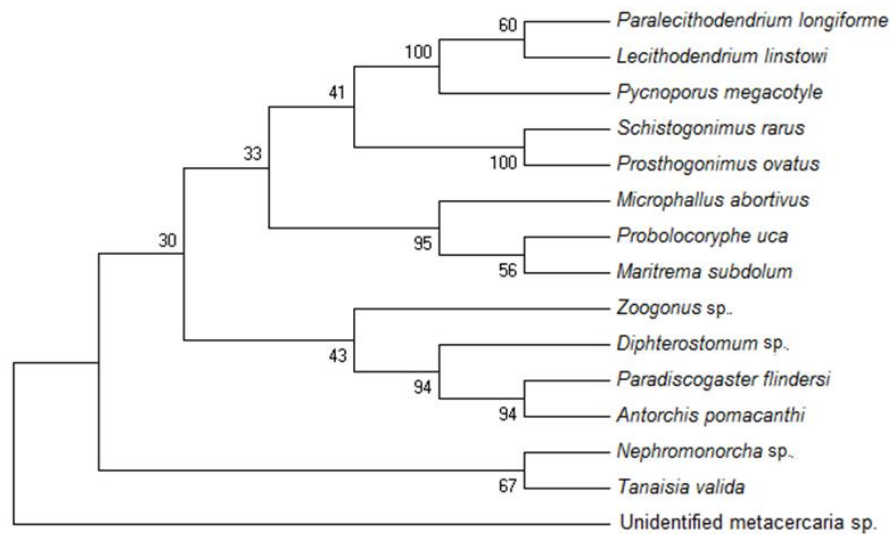


Figura 12 - Relação filogenética de *Tanaisia valida* e outras espécies de Microphalloidea. Árvore inferida com base na região ITS-2 do DNAr utilizando o método de Máxima Verossimilhança, Kimura 2-parâmetros com distribuição Gamma e sítios invariáveis (G+I). Foram realizadas 1000 réplicas de bootstrap.

As árvores apresentaram topologia similar com as espécies representantes de cada família agrupando-se entre si. As famílias Rencolidae e Eucotyliidae, representada neste estudo por *T. valida*, formaram um grupo monofilético. Os valores de bootstrap foram de 72 para os métodos de Evolução Mínima e Agrupamento de Vizinhos e 67 para o método de Máxima Verossimilhança. Alguns ramos gerados não apresentam valores bem suportados, fato que pode estar relacionado à escassez de dados da região ITS-2 de representantes de Microphalloidea. No entanto, a relação entre as duas famílias e sua posição dentro de Microphalloidea corrobora estudos anteriores (OLSON et al., 2003; TKACH et al., 2001). Espécies de Eucotyliidae, assim como de Rencolidae, são parasitos de rins e ureteres de diversas espécies de aves (KANEV et al., 2002;. GIBSON, 2008), e sua relação filogenética, como grupos irmãos, pode sugerir uma origem evolutiva comum (UNWIN et al. 2013).

As análises filogenéticas moleculares existentes para Microphalloidea foram realizadas com base na região 28S ou 28S+18S do DNAr. Por esse motivo as árvores geradas apresentam ramos com algumas conformações diferentes das deste estudo. Nas análises feitas por Olson et al. (2003) e Tkach et al. (2003), Lecithodendriidae aparece em um ramo mais externo do que Microphallidae e Prosthogonimidae. No presente estudo, Lecithodendriidae mostrou maior relação

com Prosthogonimidae, e as duas famílias formaram um agrupamento com Microphalidae, no entanto os valores de bootstrap não são bem suportados.

Prosthogonimus ovatus (Rudolphi, 1803) e *Schistogonimus rarus* (Braun, 1901) foram as espécies que demonstraram valores melhores suportados (100% e 99%). Essa relação já havia sido descrita por Tkach et al. (2003), onde *P. ovatus* apresentou maior identidade com *S. rarus* do que com outras espécies de *Prosthogonimus*.

As relações filogenéticas entre os representantes de Microphalloidea ainda não foram bem estabelecidas. Muitos autores consideram a taxonomia do grupo instável e confusa (TKACH et al., 2000b; TKACH et al., 2003). De acordo com Olson et al. (2003), Microphalloidea possui dois clados: o primeiro inclui Pachypsolidae, Rencolidae e Eucotylidae; o segundo inclui Zoogonidae+Faustulidae como táxon mais basal e Lecithodendriidae, Microphalidae, Pleurogenidae e Prosthogonimidae progressivamente mais derivados. Conforme os autores, Pachypsolidae - parasitos de tartarugas marinhas e jacarés neotropicais - é um grupo confuso e a afinidade com Eucotylidae e Rencolidae necessita de mais estudos para ser explicada.

No presente estudo a análise molecular baseada na região ITS-2 do DNAr permitiu diferenciar grupos taxonômicos entre si, bem como entre os espécimes de *T. valida*. No entanto, para esclarecer melhor as relações entre as famílias de Microphalloidea, espera-se que análises futuras sejam realizadas, incluindo trematódeos que não puderam ser representados neste estudo, por não haver sequências para a região estudada.

5. Conclusões

As sequências analisadas confirmam a identificação morfológica dos espécimes, como *Tanaisia valida*, sendo este, o primeiro estudo a gerar sequências parciais dos genes 28S e ITS-2 do DNA ribossômico da espécie.

A relação de *T. valida* com outras espécies de Eucotylidae foi bem suportada, assim como a posição da família dentro de Microphalloidea e sua relação estreita com Rencolidae.

Os dados obtidos contribuem para a elucidação da taxonomia de *T. valida*, entretanto, estudos futuros, utilizando outros marcadores moleculares, são necessários para análise e esclarecimento das relações filogenéticas da espécie e família.

Referências

ADLARD, R. D.; BARKER, S. C.; BLAIR, D.; CRIBB, T. H. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). **International journal for parasitology**, v. 23, n. 3, p. 423-425, 1993.

AGATSUMA, T.; ARAKAWA, Y.; IWAGAMI, M.; HONZAKO, Y.; CAHYANINGSIH, U.; KANG, S. Y.; HONG, S. J. Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. **Parasitology International**, v. 49, n. 3, p. 231-238, 2000.

AL-KANDARI, W. Y.; AL-BUSTAN, S. A.; ALNAQEEB, M. A. Ribosomal DNA sequence characterization of *Maritrema cf. eroliae* Yamaguti, 1939 (Digenea: Microphallidae) and its life cycle. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 6, p. 1067-1074, 2011.

AL-KANDARI, W. Y.; ALNAQEEB, M. A.; ISAAC, A. M.; AL-BUSTAN, S. A. Molecular characterization of *Stictodora tridactyla* (Trematoda: Heterophyidae) from Kuwait Bay using rDNA ITS and mtCO1. **Parasitology Research**, v. 114, n. 11, p. 4259-4266, 2015.

AMATO, J. F. R.; AMATO, S. B. Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: **Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 1-25.

ANDERSON, T. J.; BLOUIN, M. S.; BEECH, R. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. **Advances in Parasitology**, v. 41, p. 220-285, 1998.

ANDRES, M.; RAY, C.; PULIS, E.; CURRAN, S.; OVERSTREET, R. Molecular characterization of two opecoelid trematodes from fishes in the Gulf of Mexico, with a description of a new species of *Helicometra*. **Acta Parasitologica**, v. 59, n. 3, p. 405-412, 2014.

BARBER, K. E.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* from Kenya. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 62, n. 4, p. 434-440, 2000.

BERNARDON, F. F.; SOARES, T. A. L.; VIEIRA, T. D.; MÜLLER, G. Helminths of *Molothrus bonariensis* (Gmelin, 1789) (Passeriformes: Icteridae) from southernmost Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 3, 2016.

BOWLES, J.; BLAIR, D.; MCMANUS, D. P. A molecular phylogeny of the human schistosomes. **Molecular phylogenetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 103-109, 1995.

BROOKS, D. R.; HOBERG, E. P. Triage for the biosphere: The need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. **Comparative Parasitology**, v. 67, n. 1, p. 1-25, 2000.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia** v. 34, n. 83, p. 157-163, 2012.

CAMPOS, A.; CUMMINGS, M. P.; REYES, J. L.; LACLETTE, J. P. Phylogenetic relationships of Platyhelminthes based on 18S ribosomal gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 1998.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. **American journal of human genetics**, v. 19, n. 3 Pt 1, p. 233, 1967.

COLEMAN, A. W.; VACQUIER, V. D. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (*Haliotis*). **Journal of molecular evolution**, v. 54, n. 2, p. 246-257, 2002.

CRIBB, T. H.; ADLARD, R. D.; BRAY, R. A. A DNA-based demonstration of a three-host life-cycle for the Bivesiculidae (Platyhelminthes: Digenea). **International Journal for Parasitology**, v. 28 n. 1, p. 1791-1795, 1998.

CRIBB, T.H.; BRAY, R.A.; LITTLEWOOD, D.T.J.; PICHELIN, S.P., HERNIOU, E.A. The Digenea. In: LITTLEWOOD, D.T.J., BRAY, R.A. (Eds.), **Interrelationships of the Platyhelminthes**, Taylor and Francis, London, p. 168–185, 2001.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v.17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, p. 783-791, 1985

FREITAS, J. F. T. Revisão da família Eucotylidae Skrjabin, 1924 (Trematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 49, p. 33-123, 1951.

GIBSON, D.I. Family Rencolidae Dollfus, 1939. In: Bray, R.A., Gibson, D.I., Jones, A. (Eds.), **Keys to the Trematoda**, vol. 3. CABI, Wallingford: CAB International, p. 591–594, 2008.

GOMÉZ, A.; NICHOLS E. Neglected wild life: Parasitic biodiversity as a conservation target. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 222-227, 2013.

GONZALEZ, I. L.; CHAMBERS, C.; GORSKI, J. L.; STAMBOLIAN, D.; SCHMICKEL, R. D.; SYLVESTER, J. E. Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers. **Journal of molecular biology**, v. 212, n. 1, p. 27-35, 1990.

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

HUANG, S. Y.; ZHAO, G. H.; FU, B. Q.; XU, M. J.; WANG, C. R.; WU, S. M.; ZHU, X. Q. Genomics and molecular genetics of *Clonorchis sinensis*: current status and perspectives. **Parasitology International**, v.61, p. 71–7, 2012.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. Mammalian protein metabolism. New York: **Academic Press**, v. 3, n. 21, p. 21-132, 1969.

KANEV, I.; RADEV, V.; FRIED, B. Family Eucotylidae Cohn, 1904. In: GIBSON, D. J., BRAY, R. A.; JONES, A. (Eds). **Keys to the Trematoda**. Wallingford: CAB International, p. 147-152, 2002.

KIMURA, M. Simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions through comparative studies nucleotide sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, 2016.

LEE, S. U.; CHUN, H. C.; HUH, S. Molecular phylogeny of parasitic Platyhelminthes based on sequences of partial 28S rDNA D1 and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. **The Korean journal of parasitology**, v. 45, n. 3, p. 181-189, 2007

LEÓN-RÉGAGNON, V.; BROOKS, D. R.; DE LEON, G. P. Differentiation of Mexican species of *Haematoloechus* Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchiformes): molecular and morphological evidence. **The Journal of parasitology**, p. 935-946, 1999.

LITTLEWOOD, D. T. J.; JOHNSTON, D. A. Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Cambridge**, v. 111, p. 167-176, 1995.

LUNASCHI, L.I.; DRAGO, F.B.; DRAGHI, R. Redescription of *Tanaisia dubia* (Digenea) from the northeast region of Argentina with a key to Neotropical species of the genus, and a key to genera of Tanaisiinae. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 86, n. 4, p. 888-895, 2015.

LUTON, K.; WALKER, D.; BLAIR, D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 323-327, 1992.

MASCARENHAS, C.S.; KRÜGER, C.; MÜLLER, G. The helminth fauna of the red-crested cardinal (*Paroaria coronata*) Passeriformes: Emberizidae in Brazil. **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1359-1363, 2009.

MCMANUS, D. P.; J. BOWLES. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. **International Journal for Parasitology** v. 26, n. 7, p. 687-704, 1996.

MICHOT, B.; DESPRES, L.; BONHOMME, F.; BACHELLERIE, J. P. Conserved secondary structures in the ITS2 of trematode pre-rRNA. **FEBS letters**, v. 316, n. 3, p. 247-252, 1993.

NOLAN, M. J.; CRIBB, T. H. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. **Advances in parasitology**, v. 60, p. 101-163, 2005.

ODENING, K. Zwei neue nierentrematoden der unterordnung Eucotylata (Digenea, Sporocystoinei) aus singvögeln Brasiliens und Vietnams. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 23, p. 491-503, 1963.

OLSON, P. D.; CRIBB, T. H.; TKACH, V. V.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **International Journal for Parasitology** v. 33, n. 7, p. 733-755, 2003.

POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p. 367–383, 2004.

PRASAD, P. K.; TANDON, V.; CHATTERJEE, A.; BANDYOPADHYAY, S. PCR-based determination of internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA of giant intestinal fluke, *Fasciolopsis buski* (Lankester, 1857) Looss, 1899. **Parasitology research**, v. 101, n. 6, p. 1581-1587, 2007.

PRASAD, P. K.; TANDON, V.; BISWAL, D. K.; GOSWAMI, L. M.; CHATTERJEE, A. Molecular identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. **Parasitology research**, v. 103, n. 6, p. 1247-1255, 2008.

PRICE, P. W. **Evolutionary biology of parasites**. Vol. 15. Princeton University Press, 1980. 237p.

RINALDI, L.; PERUGINI, A. G.; CAPUANO, F.; FENIZIA, D.; MUSELLA, V.; VENEZIANO, V.; CRINGOLI, G. Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. **Veterinary parasitology**, v. 131, n. 3, p. 247-253, 2005.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 2.ed. Nova York: Cold Spring Harbor Press. 1989.

SEMYENOVA, S. K.; MOROZOVA, E. V.; VASILYEV, V. A.; GOROKHOV, V. V.; MOSKVIN, A. S.; MOVSESSYAN, S. O.; RYSKOV, A. P. Polymorphism of internal transcribed spacer 2 (ITS-2) sequences and genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. **Acta Parasitol**, v. 50, n. 3, p. 240-3, 2005.

SRIPALWIT, P.; WONGSAWAD, C.; CHONTANANARTH, T.; ANUNTALABHOCHAI, S.; WONGSAWAD, P.; CHAI, J. Y. Developmental and Phylogenetic Characteristics of *Stellantchasmus falcatus* (Trematoda: Heterophyidae) from Thailand. **The Korean journal of parasitology**, v. 53, n. 2, p. 201, 2015.

TAJIMA F.; NEI M Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. **Molecular Biology and Evolution** 1:p. 269-285, 1984.

TAKAIWA, F.; OONO, K.; SUGIURA, M. Nucleotide sequence of the 17S–25S spacer region from rice rDNA. **Plant Molecular Biology**, v. 4, n. 6, p. 355-364, 1985.

TANDON, V.; PRASAD, P. K.; CHATTERJEE, A.; BHUTIA, P. T. Surface fine topography and PCR-based determination of metacercaria of *Paragonimus* sp. from edible crabs in Arunachal Pradesh, Northeast India. **Parasitology research**, v. 102, n. 1, p. 21-28, 2007.

TAUTZ, D.; HANCOCK, J. M.; WEBB, D. A.; TAUTZ, C.; DOVER, G. A. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 5, n. 4, p. 366-376, 1988.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TKACH, V. V.; LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D.; KINSELLA, J. M.; SWIDERSKI, Z. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 1, p. 1-15, 2003.

TKACH, V. V.; PAWLOWSKI, J.; SHARPILO, V. P. Molecular and morphological differentiation between species of the *Plagiorchis vespertilionis* group (Digenea, Plagiorchiidae) occurring in European bats, with a re-description of *P. vespertilionis* (Müller, 1780). **Systematic Parasitology**, v. 47, n. 1, p. 9-22, 2000a.

TKACH, V. V.; PAWLOWSKI, J.; MARIAUX, J. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial 18S rDNA sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 83-93, 2000b.

TKACH, V. V.; PAWLOWSKI, J.; MARIAUX, J.; SWIDERSKI, Z. Molecular phylogeny of the suborder Plagiorchiata and its position in the system of Digenea. **Interrelationships of the Platyhelminthes**, p. 186-193, 2001.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. F. T.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, 1969. 886p.

UNWIN, S.; CHANTREY, J.; CHATTERTON, J.; ALDHOUN, J. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Renal trematode infection due to *Paratanaisia braqai* in zoo housed Columbiformes and a red bird-of-paradise (*Paradisaea rubra*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 32-41, 2013.

WAESCHENBACH, A.; WEBSTER, B. L.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, n. 1, p. 311-325, 2007.

WILL, K. W.; MISHLER, B. D.; WHEELER, Q. D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 844-851, 2005.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

ZHENG, X.; CHANG, Q. C.; ZHANG, Y.; TIAN, S. Q.; LOU, Y.; DUAN, H.; GUO, D. H.; WANG, C. R.; ZHU, X. Q. Characterization of the complete nuclear ribosomal DNA sequences of *Paramphistomum cervi*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

Apêndices

Apêndice A - Número de acesso no GenBank, das sequências da região 28S do DNAr utilizadas nas análises .

Espécie	Família	Nº de acesso GenBank
<i>Tanaisia fedtschenkoi</i>	Eucotylidae	AY116870
<i>Paratanaisia bragai</i>	Eucotylidae	JX231099
<i>Tamerlania zarudnyi</i>	Eucotylidae	AF184248
<i>Renicola</i> sp.	Renicolidae	AF184249
<i>Nephromonorcha</i> sp.	Renicolidae	KP710185
<i>Brachycoelium salamandrae</i>	Brachycoeliidae	AF151935

Apêndice B - Número de acesso no GenBank, das sequências da região ITS-2 do DNAr utilizadas nas análises .

Espécie	Família	Nº de acesso GenBank
<i>Antorchis pomacanthi</i>	Faustulidae	KR149731
<i>Paradiscogaster flindersi</i>	Faustulidae	KF017537
<i>Lecithodendrium linstowi</i>	Lecithodendriidae	KJ934792
<i>Paralecithodendrium longiforme</i>	Lecithodendriidae	KJ920283
<i>Pycnopus megacotyle</i>	Lecithodendriidae	KJ920285
<i>Maritrema subdolum</i>	Microphalidae	HM584172
<i>Microphallus abortivus</i>	Microphalidae	HM584173
<i>Probolocoryphe uca</i>	Microphalidae	GQ377842
<i>Prosthogonimus ovatus</i>	Prosthogonimidae	KP192733
<i>Schistogonimus rarus</i>	Prosthogonimidae	KP192724
<i>Nephromonorchia</i> sp.	Renicolidae	KP710187
<i>Diphtherostomum</i> sp.	Zoogonidae	KF483875
<i>Zoogonus</i> sp.	Zoogonidae	KF358773
Unidentified metacercaria sp.		AY245704

Apêndice C - Números de acesso no GenBank das sequências da região 28S do DNAr de *Tanaisia valida*.

Espécie	Nº de acesso GenBank
<i>Tanaisia valida</i> 1	KX913703
<i>Tanaisia valida</i> 6	KX913704
<i>Tanaisia valida</i> 7	KX913705
<i>Tanaisia valida</i> 8	KX913706
<i>Tanaisia valida</i> 9	KX913707
<i>Tanaisia valida</i> 11	KX913708
<i>Tanaisia valida</i> 12	KX913709
<i>Tanaisia valida</i> 17	KX913710
<i>Tanaisia valida</i> 25	KX913711

Apêndice D - Números de acesso no GenBank das sequências da região ITS-2 do DNAr de *Tanaisia valida*.

Espécie	Nº de acesso GenBank
<i>Tanaisia valida</i> 4	KX913712
<i>Tanaisia valida</i> 6	KX913713
<i>Tanaisia valida</i> 12	KX913714

Anexos

Anexo A - Licença do ICMBio para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41095-3	Data da Emissão: 26/02/2014 17:56	Data para Revalidação*: 28/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Fabiana Fedatto Bernardon	CPF: 007.999.960-33
Título do Projeto: Assembléia de helmintos de <i>Chrysomus ruficapillus</i> (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de <i>C. ruficapillus</i> (total 240 aves; 2013 (20), 2014 (120), 2015 (100)) de Rio Grande, RS	10/2013	10/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Está autorizada a coleta de apenas 20 indivíduos em 2013, 120 em 2014 e 100 em 2015, conforme descrição nos dados básicos do projeto.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Gertrud Müller	Orientadora	218.928.730-87	1030796914 SSP-RS	Brasileira
2	Rômulo Silveira Vitória	Coleta das aves	838.478.800-63	9062215927 SJS-RS	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	RIO GRANDE	RS	Fazendas em Rio Grande	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 39525881





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41095-3	Data da Emissão: 26/02/2014 17:56	Data para Revalidação*: 28/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Fabiana Fedatto Bernardon	CPF: 007.999.960-33
Título do Projeto: Assembléia de helmintos de <i>Chrysomus ruficapillus</i> (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

#	Atividade	Taxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Chrysomus ruficapillus</i>
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Chrysomus ruficapillus</i> (*Qtde: 120)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina, Outros métodos de captura/coleta(armadilha alcapao)
---	---------------------------------	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 39525881



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41095-3	Data da Emissão: 26/02/2014 17:56	Data para Revalidação*: 28/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Fabiana Fedatto Bemardon	CPF: 007.999.960-33
Título do Projeto: Assembléia de helmintos de <i>Chrysomus ruficapillus</i> (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.


Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 39525881



Página 3/3

Anexo B - Projeto de pesquisa com número do CEEA.

	Universidade Federal de Pelotas Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Departamento de Pesquisa
Assembleia de helmintos de <i>Chrysomus ruficapillus</i> (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil	

1. Identificação

Título do **Assembleia de helmintos de *Chrysomus ruficapillus* (Passeriformes: Icteridae) do sul do Brasil**

Data **03/12/2013**

Unidade: **IB - INSTITUTO DE BIOLOGIA**

Grupo de Pesquisa: **Parasitos de Animais Silvestres**

Período de Realização: **03/12/2013** até **20/12/2016**

Carga Horária Semanal: **1** Código COCEPE: **4245**

2. Dados Gerais

Grande Área **2.00.00.00-6 - Ciências Biológicas**

Área CNPQ: **2.13.00.00-3 - Parasitologia**

Resumo: **O Brasil está entre as nações com o maior índice de biodiversidade do mundo, estima-se que essa biodiversidade represente cerca de 20% do que há de vida no planeta. Os parasitos representam uma grande proporção da diversidade de vida no mundo, sendo o parasitismo um dos modos de vida mais bem sucedidos exibidos pelos organismos vivos. Nesse contexto, os vertebrados são conhecidos por abrigar uma grande quantidade desses parasitos, em sua maioria, ainda desconhecidos. O projeto visa gerar conhecimento sobre a diversidade de helmintos de *Chrysomus ruficapillus* (Vieillot, 1819) (Passeriformes: Icteridae), popularmente conhecido como garibaldi. Serão coletados 240 espécimes provenientes do município de Rio Grande, RS.**

Envolve experimentação com modelos de animais sob **Sim** Registro **1477**

Objetivos: **Objetivo geral Identificar as espécies de helmintos que compõem a diversidade parasitária de *Chrysomus ruficapillus* do Rio Grande do Sul. Objetivos específicos - Conhecer a diversidade de helmintos que a espécie abriga. - Quantificar as infecções através dos parâmetros de prevalência, abundância e intensidade médias. - Verificar a possível existência de diferenças quantitativas e qualitativas na carga de helmintos de *C. ruficapillus* em relação aos períodos de coleta das aves e estágio das lavouras de arroz, levando em consideração a disponibilidade de recursos alimentares (presença ou ausência das plantações de arroz) e conseqüentemente acesso a hospedeiros intermediários. - Comparar os parasitos dos espécimes em diferentes estágios de desenvolvimento e sexo (machos, fêmeas, juvenis).**

3. Equipe

Coordenador

SIAPE	Nome	Email
6420568	GERTRUD MULLER ANTUNES	gertruda@ufpel.edu.br

Alunos

Matrícula - Nome	Curso	C.H. Sem.	C.H. Total
13104874 - FABIANA FEDATTO BERNARDON	Parasitologia	30	4800

Bolsistas

Matrícula - Nome	Curso	Bolsa Tipo	C.H. Total
12100555 - TATIELE DE AGUIAR LOPES SOARES	Ciências Biológicas	PIBIC/CNPq	636

4. Fonte financiadora

Fonte Financeira	Valor
- CAPES	R\$ 2000.00

Para validar este documento acesse o site da UFPEL item **Validador de documentos** e informe o código **HO270160JQ**