

THIAGO MATHIAS CHIARIELLO

**Diversidade de protozoários intestinais em aranha-armadeira
(*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981)**

São Paulo

2021

THIAGO MATHIAS CHIARIELLO

Diversidade de protozoários intestinais em aranha-armadeira (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Arlei Marcili

De acordo:

Orientador

São Paulo
2021

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4034
FMVZ

Chiariello, Thiago Mathias
Diversidade de protozoários intestinais em aranha-armadeira (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981) / Thiago Mathias Chiariello. – 2021.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

1. Protozoários. 2. *Phoneutria nigriventer*. 3. Parasitas. 4. Aranhas. 5. Caracterização molecular. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 9th February 2021

CERTIFIED

We certify that the Research "Intestinal Protozoan Diversity in Armed Spiders (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981)", protocol number CEUAX 2465101218 (ID 001042), under the responsibility Arlei Marcili, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day December 12, 2018.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Diversidade de protozoários intestinais em aranha armadeira (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981)", protocolado sob o CEUAX nº 2465101218, sob a responsabilidade de Arlei Marcili, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 12 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Chiariello, Thiago Mathias

Título: Diversidade de protozoários intestinais em aranha-armadeira (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Arlei Marcili, pelo aceite, paciência e por todo ensinamento repassado durante o processo.

Agradeço a minha esposa Ana Elisa S. A. Chiariello por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando.

Agradeço a minha família: minha mãe, meu pai e minha irmã por todo apoio e incentivo desde a graduação.

Agradeço aos meus colegas de VPS, do grupo tryp./ leish. pelas discussões e ensinamentos, principalmente ao Ryan Emiliano da Silva pela paciência, ensinamentos e ajuda durante todas as etapas do processo, e a Jaciara Costa por toda ajuda durante a etapa inicial do trabalho.

Agradeço a todos os técnicos do Laboratório de Doenças Parasitárias do VPS.

Agradeço a Dr. Fan Hui Wen e Dr. Aline Auada por todo apoio, e a todos os colegas do Biotério de Artrópodes do Instituto Butantan, que de alguma forma fizeram parte deste trabalho.

“Ao demonstrar em nossas leis e políticas que a natureza é um processo, não algo a ser explorado, diremos às gerações futuras que aprendemos algo com o estudo das ciências naturais e que nos preocupamos com algo maior do que nossas próprias necessidades egoístas . E então seremos lembrados por gerações posteriores por nossa sabedoria, em vez de nossa rapacidade.”

(Greg Graffin, Anarchy Evolution: Faith, Science, and Bad Religion in a World Without God)

RESUMO

CHIARIELLO, T. M. **Diversidade de protozoários intestinais em aranha-armadeira (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981)**. [Intestinal Protozoan Diversity in Armed Spiders (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981)]. 2021. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O filo Arthropoda compreende aproximadamente 85% das espécies animais já descritas. Dentro deste filo a classe Arachnida inclui invertebrados de grande importância, devido à transmissão de doenças e aos acidentes por envenenamento. Aranhas do gênero *Phoneutria sp.*, popularmente conhecidas como aranha-armadeira, são aracnídeos de interesse médico pertencentes à família Ctenidae. Exemplos destas aranhas são recebidos, quarentenados e mantidos em cativeiro no Biotério de Artrópodes do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, com o objetivo de extrair o seu veneno para posterior produção do soro antiaracnídeo. Foram analisadas em microscopia ótica, amostras de fezes de 509 *Phoneutria nigriventer*, destas, 131 (25,73%) apresentaram infecção por protozoários. As amostras positivas ao exame parasitológico foram submetidas a extração de DNA e reações de amplificação (PCR), resultando em 80 amplificadas, purificadas e sequenciadas. 17 sequências foram obtidas e analisadas por BLAST. Cinco amostras foram identificadas como *Colpoda steinii*, uma como *Colpoda aspera*, uma apenas pelo gênero *Colpoda sp.* e uma identificada como “organismo ciliado”. Quatro amostras foram identificadas como *Parabodo caudatus*, duas como *Urostipulosphaera sp.*, uma como *Helkesimastix sp.* e uma como um protozoário euglenóide. Uma amostra sequenciada foi identificada como uma alga pertencente ao gênero *Laurencia sp.* A presença de sinais clínicos e outros eventos foram observados em 17 aranhas, e então associados ao resultado do sequenciamento.

Palavras-chave: Protozoários. *Phoneutria nigriventer*. Parasitas. Aranhas. Caracterização molecular.

ABSTRACT

CHIARIELLO, T. M. **Intestinal Protozoan Diversity in Armed Spiders (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981)**. [Diversidade de protozoários intestinais em aranha-armadeira (*Phoneutria nigriventer*, Keyserling 1981)]. 2021. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The phylum Arthropoda comprises approximately 85% of the described animal species. Within this phylum, the class Arachnida comprises some invertebrates of great importance, due to the transmission of diseases and to the risk of human envenomation. Spiders belonging to the genus *Phoneutria sp.*, popularly known as armed-spiders, are arachnids of medical importance of the Ctenidae family. These animals are received, quarantined and maintained in captivity at the Biotério de Artrópodes of the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, with the aim to extract its venom for the production of the anti-arachnid serum. 509 *Phoneutria nigriventer* feces samples were analyzed in optical microscopy, being 131 (25.73%) positive for protozoan. The positive samples were subjected to DNA extraction and amplification reactions (PCR), where 80 samples were amplified, purified and sequenced. 17 sequences were obtained and analyzed by BLAST. Five sequences were identified as *Colpoda steini*, one as *Colpoda aspera*, one belonging to the genus *Colpoda sp.* and one as “ciliated organism”. Four sequences were identified as *Parabodo caudatus*, two as *Urostipulosphaera sp.*, one as *Helkesimastix sp.* and one as a Euglena-like protozoan. One sequenced sample was identified as an algae belonging to the genus *Laurencia sp.* The presence of clinical signs and other events was observed in 17 spiders, and then associated with the sequencing results.

Keywords: Protozoa. *Phoneutria nigriventer*. Spider. Parasites. Molecular characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – - *Phoneutria nigriventer* são mantidas em quarentena em potes de vidro, com substrato de papelão e algodão umedecido22

Figura 2 – Figura 2 - Setas mostrando presença de parasitas não identificados em lâminas de fezes de *Phoneutria nigriventer*. Os parasitas apresentavam movimentação durante o exame parasitológico. A, B e C: microscopia ótica 10X; D: microscopia ótica 40X.....25

Figura 3 – A e B: fezes diarreicas, sem diferenciação de porção sólida e líquida. Foto C: Fezes normais de *Phoneutria nigriventer* (seta vermelha), a seta amarela aponta a urina, de coloração branca devido ao urato.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sinais clínicos e eventos associados à infecção.....	26
Tabela 2 – Amplificação das amostras de acordo com cada <i>primer</i>	28
Tabela 3 – Resultado dos sequenciamentos.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Aranhas-armadeiras (<i>Phoneutria</i> Perty 1833)	11
1.2 Parasitismo em aranhas	14
1.3 Protozoários	14
1.4 Protozoários Parasitas de Artrópodes Terrestres	15
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivos específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Recebimento e quarentena de <i>Phoneutria nigriventer</i>	21
4.2 Coleta de Material e Armazenamento	21
4.3 Extração de DNA e Reações de Amplificação	22
4.4 Purificação e sequenciamento	23
4.5 Análise <i>in-silico</i> das Sequências Obtidas.....	24
4.6 Descrição da sintomatologia clínica associada à presença dos protozoários intestinais	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Parasitológico	25
5.2 PCR e Análises das Sequências obtidas	27
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aranhas-armadeiras (*Phoneutria* Perty 1833)

Aranhas são animais pertencentes a um grupo diverso, conquistaram ambiente terrestre e aquático com exceção do mar, habitando desertos, regiões temperadas, tropicais e suportando diferentes gradientes de temperatura e umidade (FOELIX, 1996; VOLLRATH, 1999). A grande capacidade adaptativa que apresentam tornam as aranhas abundantes, sendo encontradas em todos os continentes, exceto o Antártico (FOELIX, 1996; BRESCOVIT et al., 2004). Pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida e já foram descritas mais de 47.000 espécies, sendo a maior diversidade concentrada nas regiões tropicais e subtropicais (CODDINGTON e LEVI, 1991; PINEDA et al., 2014).

A ordem Araneae é considerada o sétimo maior grupo em diversidade de espécies do filo Arthropoda, precedida apenas pela ordem Acari e cinco ordens de insetos (PARKER, 1982). As aranhas são importantes predadores terrestres, reconhecidas como agentes eficientes no controle biológico de pragas na agricultura e de insetos transmissores de doenças (CODDINGTON e LEVI, 1991). São animais invertebrados que periodicamente realizam trocas de uma cutícula quitinosa que funciona como um exoesqueleto rígido; possuem um corpo subdividido em prossoma (cefalotórax) e opstossoma (abdômen), quatro pares de pernas, e um par de pedipalpos (RUPPERT e BARNES, 1996; MCGAVIN, 2013).

A maior parte das aranhas apresentam duas glândulas de veneno, e um par de quelíceras, utilizadas para a inoculação da toxina, porém, apenas algumas espécies possuem veneno ativo no homem, sendo raros acidentes com óbitos (LUCAS, 1987). No Brasil, as espécies de interesse em saúde, ou seja, que causam acidente importante ao homem pertencem aos gêneros *Phoneutria* Perty 1833, *Loxosceles* Heineken e Lowe 1835 e *Latrodectus* Walckenaer 1805, todos sendo parte da subordem Araneomorphae (LUCAS, 1987).

Aranhas do gênero *Phoneutria* pertencem à família Ctenidae, subordem Labidognatha, ordem Araneidae. São popularmente conhecidas como aranhas armadeiras devido ao *display* de defesa adotado quando se sentem ameaçadas, no qual o animal se levanta apoiada nas pernas traseiras erguendo suas quatro pernas dianteiras (PEIGNEUR, 2018). Estão presentes desde a região sul da América

Central (Costa Rica) até a América do Sul (BUCARETCHI et al., 2000; PEIGNEUR, 2018). No Brasil, o gênero *Phoneutria* está distribuído em diversas regiões, e são conhecidas cinco espécies: *Phoneutria fera* Perty 1833 (Amazonas), *P. nigriventer* (Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, e Rio Grande do Sul), *P. reidy* Pickard-Cambridge 1897 (Amazonas, Pará e Roraima), *P. keiserling* Pickard-Cambridge 1897 (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), *P. pertyi* Pickard-Cambridge 1897 (Rio de Janeiro) (Bento, 1996).

São animais populares devido à sua abundância em determinadas regiões, pela alta adaptabilidade que possuem e pela toxicidade de seu veneno, considerada em alguns países da América do Sul problema de saúde pública (VALÉRIO, 1982; FLOREZ et al., 2003; ANTUNES e MÁLAQUE, 2004). O gênero é caracterizado pela disposição dos olhos em três fileiras (2 – 4 – 2), e pela presença de uma densa escópula localizada no lado interno dos pedipalpos (LUCAS, 1987; SILVA, 2011). Os animais adultos possuem aproximadamente três centímetros de comprimento total do corpo, porém podem atingir até 15 cm em extensão das pernas (LUCAS, 1987). Assim como as demais aranhas da família Ctenidae, as aranhas armadeiras apresentam hábito errante e noturno e são encontradas facilmente forrageando a vegetação (HÖELER e BRESCOVIT, 2001).

As aranhas armadeiras são responsáveis por grande parte dos acidentes araneídicos no Brasil, sendo o principal agente causador em várias áreas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; ANTUNES e MÁLAQUE, 2004). Em 2020 foram registrados 4.763 acidentes com aranhas no Estado de São Paulo, e 32.859 no Brasil em 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; DIVISÃO DE ZOONOSES/CVE, 2020). Dentre os acidentes notificados no Brasil em 2013, 36% foram causados por aranhas deste gênero, sendo a espécie *Phoneutria nigriventer* a principal responsável (BENTO, 1996; MÁLAQUE, 2014). No Estado de São Paulo, aproximadamente 60% dos acidentes araneídicos são ocasionadas pela espécie *Phoneutria nigriventer* (LUCAS, 1988).

Acidentes com *Phoneutria* sp. foram descritos também na América Central, Europa devido à importação de bananas do Brasil, Colômbia, Equador e Guatemala, na Argentina, sendo neste último comuns em funcionários de empresas importadoras de frutas (BÜRCHEL, 1953; SCHIAPELLI e PIKELIN, 1966; GRISOLIA, 1976; ANTUNES e MÁLAQUE, 2004). No Uruguai, a introdução destas aranhas

parece ter ocorrido através do transporte de bananas provenientes da zona rural do litoral de São Paulo (SIMÓ, 1984). São animais sinantrópicos frequentemente associado a habitações humanas como resultado de acúmulo de lixo, que atraí insetos, a presa natural destas aranhas (RAMOS et al., 1998). Apesar de não haver indícios de domesticação para esta espécie, estas aranhas podem acidentalmente entrar em casas, um comportamento que ocorre geralmente com os machos adultos no período de acasalamento, entre os meses de Abril a Julho (RAMOS et al., 1998). A maior frequência dos acidentes ocorre entre os meses de março a maio, quando os machos estão mais ativos em busca das fêmeas (COELHO e GONÇALVES, 1993).

O veneno da aranha armadeira é um composto complexo de proteínas, enzimas e peptídeos, incluindo neurotoxinas que agem nos canais iônicos e quimiorreceptores do sistema neuromuscular de invertebrados e mamíferos (RICHARDSON et al., 2006; DINIZ et al., 2018). O sintoma mais frequente causado pela ação do veneno de *Phoneutria sp.* é dor local imediata, geralmente de intensidade elevada. Também podem ocorrer no local da picada edema, sudorese, eritema, parestesia e fasciculação muscular. Além das manifestações locais, agitação, taquicardia, hipertensão, sialorréia e vômitos são indicativos de efeitos sistêmicos (DINIZ et al., 2018). Em casos mais severos, que ocorrem geralmente com crianças, foram descritos priapismo, vômitos profusos, bradicardia, diarreia, hipotensão cardíaca, arritmia, edema pulmonar agudo e choque (BUCARETCHI et al., 2008; DINIZ et al., 2018).

Devido ao grande número de acidentes no Brasil, e a periculosidade do agravo, o Ministério da Saúde disponibiliza gratuitamente através do sistema único de saúde (SUS), o soro antiaracnídico, produzido a partir dos venenos de aranhas-marrom (*Loxosceles gaucho*) aranhas-armadeiras (*Phoneutria nigriventer*) e escorpião-amarelo (*Tityus serrulatus*). Este soro polivalente é indicado para o tratamento do loxoscelismo, foneutrismo e escorpionismo. O soro antiaracnídico é produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, e para isso, centenas de aranhas-armadeiras são mantidas em cativeiro no Biotério de Artrópodes para que tenham seu veneno extraído para posterior produção do soro.

1.2 Parasitismo em aranhas

A definição de parasitismo é ampla, e varia de acordo com o tipo de relação de dependência entre o parasita e o hospedeiro. Parasitas são definidos como qualquer forma de vida, ou qualquer composto orgânico capaz de se multiplicar, que possui seu nicho ecológico em outra forma de vida, durante pelo menos um período específico de seu ciclo. Muitos parasitas são considerados inofensivos e até necessários para seu hospedeiro (ARAÚJO et Al., 2003). Diversos estudos parasitológicos já foram realizados em diferentes espécies de aranhas em vida livre, com grande ênfase aos parasitas cavitários como nematoides pertencentes à família Mermithidae, e insetos parasitoides como moscas e vespas (VANDERGAST e RODERICK, 2003; IIDA e HASEGAWA, 2003; BIBBS e BUSS, 2012). Tais estudos ainda contemplam diversas espécies de caranguejeiras devido à importância dessas aranhas como animais de estimação em diversos países (PIZZI, 2009). Ácaros são frequentemente encontrados em aranhas, porém as utilizam como meio de dispersão, e não como um hospedeiro ao qual irão se alimentar, portanto, relatos de ácaros como parasitas verdadeiros de aranhas são raros (PARKER e ROBERTS, 1974).

1.3 Protozoários

Os protozoários são a forma de vida mais abundante, sendo encontrados em todos os habitats, e nas cavidades corpóreas dos animais, como no lúmen intestinal, no sangue, diversas células e seus núcleos (LEVINE, 1988). São organismos unicelulares, eucariotas, pertencentes ao reino Protista (LEVINE et al., 1980). Possuem tamanhos variados, a maioria é holozóica ou saprozóica, porém alguns são holofíticos. Evoluíram através de especializações em suas organelas, que possuem funções de alimentação, locomoção, osmorregulação e reprodução. A maioria dos protozoários possui um único núcleo vesicular, porém alguns são multinucleados e os Ciliophora são heterocarióticos. A reprodução varia conforme o grupo em questão, podendo ser assexuada ou sexuada (LEVINE et al., 1980).

Há aproximadamente 80.000 espécies descritas, sendo grande parte delas como fósseis. Sete filos são atualmente reconhecidos: Labyrinthomorpha, Ascetospora, Microspora, Myxozoa, Sarcomastigophora, Ciliophora e Apicomplexa, sendo os três

últimos os maiores. O filo Microspora compreende aproximadamente 550 espécies, sendo a maioria, parasitas de insetos. Já o filo Myxozoa compreende aproximadamente 500 espécies, com grande parte sendo parasita de peixes. O filo Sarcomastigophora compreende tanto protozoários flagelados como sarcodíneos, que são colocados no mesmo filo, pois há algumas espécies transicionais, que possuem flagelos como meio de locomoção em parte de seu desenvolvimento, e pseudópodos em outra. Este filo compreende aproximadamente 4300 espécies de flagelados, sendo 2000 parasitárias, e 41.600 sarcodíneos, sendo aproximadamente 30.000 fósseis, e 250 parasitárias. Por conveniência, os protozoários ameboides, tradicionalmente foram classificados como pertencentes ao grupo Sarcodina (PAWLOWSKI, 2008). O filo Ciliophora por outro lado, se locomove por meio de cílios, porém, sua característica principal é a presença de dois tipos de núcleos: um micronúcleo diploide e um macronúcleo poliploide, enquanto todos os outros filios possuem um núcleo vesicular. São aproximadamente 8000 espécies de protozoários ciliados, sendo 200 fósseis, 2600 comensais e aproximadamente 5200 espécies de vida-livre (FOISSNER, 2007). Por último, o filo Apicomplexa compreende aproximadamente 5000 espécies de parasitas intracelulares obrigatórios, muitos, de grande importância na saúde humana e veterinária (CAVALIER-SMITH, 1993; COVA et al., 2018). Este filo contém quatro grupos definidos: coccídeos, hemogregarinas, piroplasmas e as gregarinas, bastante comuns nos invertebrados (LEVINE, 1988; MORRISON, 2009; COVA et al., 2018). A sistemática do grupo Eugregarinida é questão de debates, por isso não há uma classificação uniforme para este grupo. Tipicamente são classificadas conforme sua morfologia geral e morfometria, morfologia epimérica tamanho e forma e método de deiscência (SMITH e COOK, 2008).

1.4 Protozoários Parasitas de Artrópodes Terrestres

O filo Arthropoda compreende o maior grupo de espécies dentro do Reino Animal, sendo dividida em quatro subfilios: Trilobita (extintos), Chelicerata (contendo os límulos, aranhas, escorpiões e ácaros), Crustacea (contendo os camarões, lagostas e caranguejos) e Uniramia (lacraias, diplópodes e insetos) (RUPPERT e BARNES, 1996). Existem aproximadamente 1200 espécies de protozoários associadas aos insetos. Protozoários entomopatogênicos são comumente

encontrados no trato digestório destes animais como comensais, ou em uma relação de mutualismo (TANADA e KAYA, 1993). Protozoários pertencentes aos filos Rhizopoda, Haplosporidia, Microspora, Zoomastigina, Ciliophora e Apicomplexa, são patogênicos aos insetos, porém, a maior parte das formas altamente patogênicas ocorre com espécies pertencentes aos filos Apicomplexa e Microspora, particularmente àquelas que invadem a hemocele e se desenvolvem no meio intracelular (TANADA e KAYA, 1993). A maioria dos protozoários infectam os insetos por ingestão, porém, os ciliados *Lambornella sp.* penetram através do exoesqueleto (CORLISS e COATS, 1976; TANADA e KAYA, 1993). Transmissão vertical entre a fêmea e a prole pode ocorrer especialmente com protozoários pertencentes ao filo Microsporidia (TANADA e KAYA, 1993). Protozoários sarcodíneos, pertencentes à ordem Amoebida já foram amplamente descritos como presentes no intestino de baratas de diversas espécies: *Blaberus craniifer* (BRISCOE, 1970), *Periplaneta americana* e *Blatella germanica* (PAI et al. 2003). Protozoários ciliados também foram descritos como presentes no trato intestinal de insetos: *Tetrahymena pyriformis*, da ordem Hymenostomatida, foi descrito em porção média de trato gastrointestinal do mosquito *Aedes aegypti* (ZARITSKY et al. 1991), *Balantidium blattarum*, pertencente à ordem Heterotrichida, na barata *Blaberus craniifer*, (BRISCOE, 1971) e *Nyctotherus ovalis* pertencente à ordem Clevelandellida, encontrado na porção média e posterior do trato gastrointestinal das baratas *Blaberus craniifer* (BRISCOE, 1971) e *Periplaneta americana* (HOEK et al., 1998).

A superclasse Gregarina é pertencente ao filo Apicomplexa, e são parasitas espécie-específicos estudados de diversos artrópodes (KIM et al. 2014) Estes protozoários foram identificados em espécies de baratas (SMITH e COOK, 2008) e em insetos pertencentes às ordens Diptera, e Coleoptera (ANDERSON e MAGNARELLI, 1978; KIM et al., 2014). Gregarinas pertencentes aos gêneros *Echinomera sp.*, *Trichorhynchus sp.* e *Grebniackiella sp.* foram identificadas em variadas espécies de lacraias, enquanto os gêneros *Stenophora sp.* e *Cnemidospora sp.* em diplópodes do continente europeu (LEWIS, 1967; DEVETAK, 2019). Chang et al. (2004) reportou alta prevalência de gregarinas em porção anterior e média do aparelho digestivo de diplópodes da espécie *Trigoniulus corallinus*, coletados em Taiwan. Protozoários coccídeos também pertencentes ao filo Apicomplexa foram isolados em porção média do aparelho digestivo de lacraias da espécie *Lithobius variegatus* (LEWIS, 1967).

Protozoários flagelados de diferentes ordens, como Retortamonadida, Hypermastigida e Trypanosomidae, já foram encontrados em trato gastrointestinal de diferentes artrópodes. Os protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae são parasitas uniflagelados de grande interesse médico e econômico, que podem ter seu ciclo de vida em um único hospedeiro (monoxênicos) ou em mais de um hospedeiro (heteroxênicos) (WALLACE, 1966; CAMARGO, 1999; CAVALIER-SMITH, 2010). Os importantes gêneros *Leishmania sp.* e *Trypanosoma sp.* são exemplos de Trypanosomatideos heteroxênicos (WALLACE, 1966; CAMARGO, 1999). O formato externo dos tripanossomatídeos variam muito, porém, de modo geral, possuem um formato alongado (WALLACE, 1966). A maioria dos flagelados se reproduz assexuadamente por fissão binária longitudinal (CAMARGO, 1999).

Os carrapatos são aracnídeos da subclasse acari, superordem parasitiformes, que incluem os Ixodida, Mesostigmata e Holothyrida. São ectoparasitas obrigatórios de vertebrados durante todo seu ciclo de vida, causando assim diversos efeitos diretos e indiretos em seus hospedeiros. Um dos principais papéis desempenhados pelos carrapatos é a sua função como vetores de diversos patógenos, entre eles, protozoários (MÁRQUEZ-JIMENÉZ et al., 2005). Patógenos transmitidos por carrapatos são responsáveis por mais de 100.000 casos de doenças em humanos pelo mundo. Estes aracnídeos são considerados o segundo vetor que mais transmite doenças a humanos, ficando atrás dos mosquitos. Porém são os maiores causadores de doenças em animais domésticos e selvagens (DE LA FUENTE et al., 2008). A babesiose é causada por uma infecção intra-eritrocitária de protozoários do gênero *Babesia*, transmitidos através dos carrapatos do gênero *Ixodes*. Casos de babesiose em humanos são raros, porém há alta incidência da doença em diversos mamíferos (ESCH e PETERSEN, 2013). Protozoários do gênero *Theileria sp.* são responsáveis por causar doenças em um grande número de hospedeiros ruminantes, domésticos e selvagens, e alguns animais não ruminantes (LAU, 2009; SIVAKUMAR et al., 2014). Estes protozoários são economicamente importantes para ruminantes domésticos por causar anemia e queda de produção, enquanto ruminantes selvagens são geralmente assintomáticos e servem como fonte de infecção (BISHOP et al., 2004).

Ácaros também são importantes transmissores de protozoários em vertebrados (POINAR JR e POINAR, 1998). Protozoários do gênero *Karyolysus* Labbé 1894 são transmitidos por ácaros *Ophionyssus sp.* Oudemans, 1901, ordem

Mesostigmata, e foram relatados em lagartos europeus e asiáticos. Acredita-se que a infecção nestes vertebrados ocorra através da ingestão de ácaros contendo esporozoítos (HAKLOVÁ-KOČÍKOVÁ et al., 2014). Gregarinas também foram descritas em ácaros da espécie *Damaeus oblongus*. Apesar de poderem se tornar grandes e aparentemente distender o trato intestinal posterior do hospedeiro, não há nenhum relato de condição patológica em ácaros parasitados por gregarinas, sendo seu dano restrito apenas a destruição de poucas células intestinais (POINAR Jr e POINAR, 1998). Protozoários parasitas de aracnídeos são poucos descritos, porém há uma extensa lista de gregarinas identificadas no trato gastrointestinal de Opiliões (COKENDOLPHER, 1993)

2. JUSTIFICATIVA

A quarentena é o primeiro contato que um animal recém-chegado terá com o novo ambiente, e é neste período que o máximo de dados deve ser coletado, buscando conhecer o estado sanitário do indivíduo antes de adicioná-lo aos demais animais da coleção. Os protocolos de quarentena objetivam proteger a coleção existente da introdução de doenças infecciosas, e estes protocolos variam conforme a espécie em questão (MEEHAN, 2012).

No caso dos invertebrados, o envolvimento veterinário costuma limitar-se a protocolos de manejo, porém, doenças infecciosas estão cada vez mais sendo reconhecidas em caranguejeiras de cativeiro, e grande parte destas doenças é parasitária. Apesar do avanço no diagnóstico de doenças infecciosas em aranhas, ainda há uma escassez de informações na literatura referente a doenças que acometem aracnídeos em geral (PIZZI, 2009).

A medicina veterinária em invertebrados terrestres está em seu começo, sendo assim, a falta de conhecimento dos diferentes quadros clínicos e das doenças infecciosas e parasitárias de aranhas mostra a extrema importância de um período de quarentena quando se trata de uma coleção de animais vivos, com fluxo de entrada e saída de indivíduos. A introdução de uma quarentena para recebimento dos animais no Biotério de Artrópodes do Instituto Butantan, mostrou-se eficaz na observação e identificação de sinais clínicos como prostração, anorexia e diarreia, salientando que a descrição de um quadro clínico relacionado a parasitoses intestinais causadas por protozoários em aranhas nunca antes foi realizada.

Dentro deste contexto exposto, e devido à falta de estudos relacionados, faz-se necessário a identificação dos parasitas que acometem as aranhas do gênero *Phoneutria sp.*, bem como sua relação com o hospedeiro, buscando a otimização dos animais em relação a produção de veneno e maior longevidade em cativeiro.

3. OBJETIVOS

O presente projeto tem por objetivo principal o conhecimento da diversidade de protozoários intestinais em aranhas armadeira (*Phoneutria nigriventer*) e a sintomatologia clínica associada.

3.1 Objetivos específicos

Caracterização molecular dos protozoários intestinais de *Phoneutria nigriventer* obtidos nas amostras diretas de fezes, através do gene ribossômico (SSUrDNA);

Descrever a sintomatologia clínica associada à presença dos protozoários intestinais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Recebimento e quarentena de *Phoneutria nigriventer*

As aranhas armadeiras utilizadas neste trabalho foram coletadas pela equipe do Biotério de Artrópodes, ou recebidas pela recepção de animais peçonhentos do Instituto Butantan, nos meses de março, agosto, outubro e novembro de 2018, e fevereiro, março, abril, outubro, novembro e dezembro de 2019. Após encaminhadas ao Biotério de Artrópodes, as aranhas foram classificadas quanto à espécie, sexo e fase de envolvimento. As *Phoneutria nigriventer* recebidas na quarentena do Biotério de Artrópodes são pesadas, sexadas e recebem uma identificação numérica individual, que irá acompanhar o animal durante toda a permanência dentro do biotério. O período de quarentena varia de 7 a 14 dias, e compreende a observação de cada aranha quanto ao seu estado geral (busca por ectoparasitas, lesões em exoesqueleto, comportamento e outras observações gerais).

Durante este período, as aranhas são mantidas em temperatura constante de 24°C (+- 0,5°C), em recipientes de vidro, com substrato de papelão e um algodão umedecido em água (Figura 1). A água utilizada é testada buscando garantir sua qualidade, evitando assim a possível presença de parasitas. As aranhas recebem ainda alimentação (baratas *Phoetalia palida* ou *Nauphoeta cineria* criadas em cativeiro), sendo a aceitação ou recusa do alimento um parâmetro importante a ser observado. As baratas ofertadas são provenientes da criação suporte do Biotério de Artrópodes, e passam por controle sanitário rotineiro, incluindo exame parasitológico de fezes. O aspecto das fezes das aranhas também foi observado assim que possível, e amostras são coletadas para exame parasitológico por microscopia ótica. Ao longo do período de estudo, foram obtidas amostras de 509 animais, com variabilidade em relação ao sexo, idade, procedência e época do ano.

4.2 Coleta de Material e Armazenamento

As fezes foram coletadas diretamente do fundo dos potes de vidro nos quais os animais eram mantidos, com o auxílio de uma pipeta descartável do tipo Pasteur. A triagem para verificação da presença ou não de parasitas foi realizada através de esfregaço direto e observação em microscópio (Nikon® YS100). As amostras foram

consideradas positivas quando apresentavam algum movimento e eram morfológicamente distintos de parasitas vermiformes. O material positivo foi armazenado em temperatura constante ($24^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) em tubo do tipo Eppendorf® de 0,5mL, contendo PBS 1X.

Figura 1 - *Phoneutria nigriventer* são mantidas em quarentena em potes de vidro, com substrato de papelão e algodão umedecido



4.3 Extração de DNA e Reações de Amplificação

A extração e a purificação de DNA foram realizadas utilizando kit comercial (Genomic Purelink, ThermoFisher). Foram utilizados os primers 18SFU (ATGCTTGTCTCAAAGGRYTAAGCCATGC) e 18RFU (CWGGTTCACCWACGGAAACCTTGTTACG) (TIKHONENKOV, et al., 2016); d3 (TGGAGGGCAAGTCTGGTG) e r7 (GGGCGGTGTGTACAAA) (MILYUTINA et al., 2001; YUBUKI et al., 2016); *barcode* V7- V8 (ULIANA et al., 1991).

Para as reações de PCR foi utilizada a seguinte mistura de reação: 100 ng de DNA genômico, 100 ng de cada *primer* e 20uL de solução mix GreenTaq (Sinapse).

Os ciclos de amplificação e as temperaturas de anelamento foram definidos de acordo com os *primers* empregados: 18SFU (ATGCTTGTCTCAAAGGRYTAAGCCATGC) e 18RFU (CWGGTTCACCWACGGAAACCTTGTTACG) com etapas de desnaturação a 94°C por um minuto, de anelamento a 55°C por um minuto e de extensão da fita a 72°C por dois minutos repetidos por 30 ciclos. O tamanho do produto de amplificação é de aproximadamente 1000pb. Os *primers* 18SFU e 18RFU foram utilizados para amplificar o gene 18S rRNA.

Para os *primers* d3 (TGGAGGGCAAGTCTGGTG) e r7 (GGGCGGTGTGTACAAA) os ciclos foram: etapas de desnaturação a 94°C por um minuto, de anelamento a 55°C por um minuto e de extensão da fita a 72°C por dois minutos repetidos por 30 ciclos. O tamanho do produto de amplificação é de aproximadamente 1000pb. Os *primers* d3 e r7 foram utilizados para amplificar regiões codificadoras de rRNA tipo 16S nuclear.

V7-V8 é um *barcode* utilizado na identificação de Tripanossomatídeos, obtido através de oligonucleotídeos descritos em trabalhos anteriores (ULIANA et al., 1991). Os ciclos para o *barcode* V7-V8 foram: etapas de desnaturação a 94°C por um minuto, de anelamento a 55°C por um minuto e de extensão da fita a 72°C por dois minutos repetidos por 30 ciclos. O tamanho do produto de amplificação é de aproximadamente 800pb.

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1.5%) em tampão TAE a 100V/100 mA. Após a eletroforese os géis foram corados com Syber Safe (Termofisher®) e fotografados em transluminador de luz U.V

4.4 Purificação e sequenciamento

Fragmentos de DNA amplificados por PCR (produtos amplificados em três reações independentes) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com Gel-Red (Biotium). Os fragmentos foram purificados através do Kit Exosap-IT (Thermofisher®). Os produtos purificados foram submetidos diretamente à reação de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer®), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

(Perkin Elmer®). As reações foram submetidas a 30 ciclos: 15 s 96 °C; 15 s 50 °C; 4 min 60 °C, com um ciclo inicial de 1 min 96 °C.

4.5 Análise *in-silico* das Sequências Obtidas

As sequências obtidas por PCR dos diferentes genes utilizados como alvo foram analisadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), submetidas a alinhamentos múltiplos pelo programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997) alterando os parâmetros relativos à inserção de “indels” (peso de inserção=1, Extensão=1) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al., 1997).

4.6 Descrição da sintomatologia clínica associada à presença dos protozoários intestinais

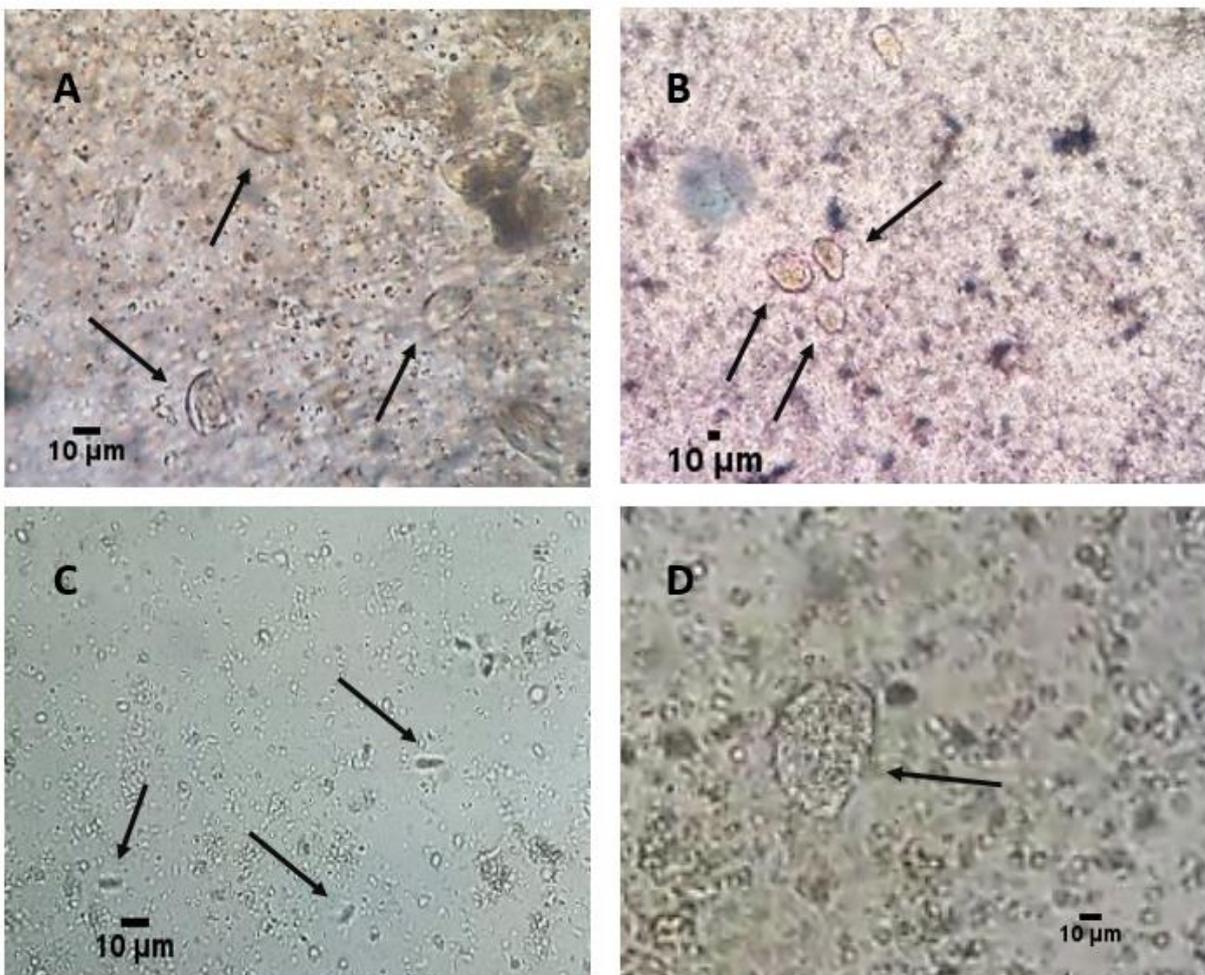
Os animais foram acompanhados e avaliados durante o período em que permaneceram na quarentena. Foram observados os seguintes parâmetros: qualidade das fezes, peso do animal na entrada e na saída da quarentena, comportamento, ingestão de alimento e outros eventos concomitantes relacionados aos animais positivos para as espécies de protozoários intestinais identificados, tais como, presença de outros parasitas nas fezes, produção de ootecas e realização de ecdise.

5. RESULTADOS

5.1 Parasitológico

Foram analisadas em microscopia ótica, amostras de fezes de 509 *Phoneutria nigriventer*, destas, 131 (25,73%) apresentaram infecção por protozoários (Figura 2). Dos animais positivos no exame parasitológico, 45 aranhas eram fêmeas (34,35%), 35 machos (26,71%), 46 jovens de sexo indefinido (35,11%) e cinco destas amostras não continham informações quanto ao sexo (3,81%).

Figura 2 - Setas mostrando a presença de parasitas não identificados em lâminas de fezes de *Phoneutria nigriventer*. Os parasitas apresentavam movimentação durante o exame parasitológico. A, B e C: microscopia ótica 10X; D: microscopia ótica 40X



O exame parasitológico por microscopia ótica foi ainda relacionado ao quadro clínico e outros eventos associados apresentados por 19 aranhas. Quatorze animais (10,6%), do total de amostras positivas na microscopia, apresentaram diarreia (Figura 3) associada à perda de peso e anorexia, sendo que dois destes animais, apresentaram infestação por helmintos não identificados associados à infecção por protozoários, não sendo possível identificar a causa exata dos sinais clínicos. Duas aranhas (1,53%) apresentaram apenas perda de peso. Dos 16 animais que apresentaram algum sinal clínico, oito (50%) foram a óbito durante o período de quarentena. Outros eventos ocorreram concomitantes à infecção: dois animais produziram ooteca e um animal realizou ecdise. Não houve observação de ectoparasitas ou lesões externas em nenhuma aranha positiva no exame parasitológico. A tabela 1 relaciona os animais que apresentaram algum sinal clínico ou evento observado durante o período de quarentena, associado ao organismo identificado ou não identificado.

Tabela 1 - Sinais clínicos e eventos associados à infecção

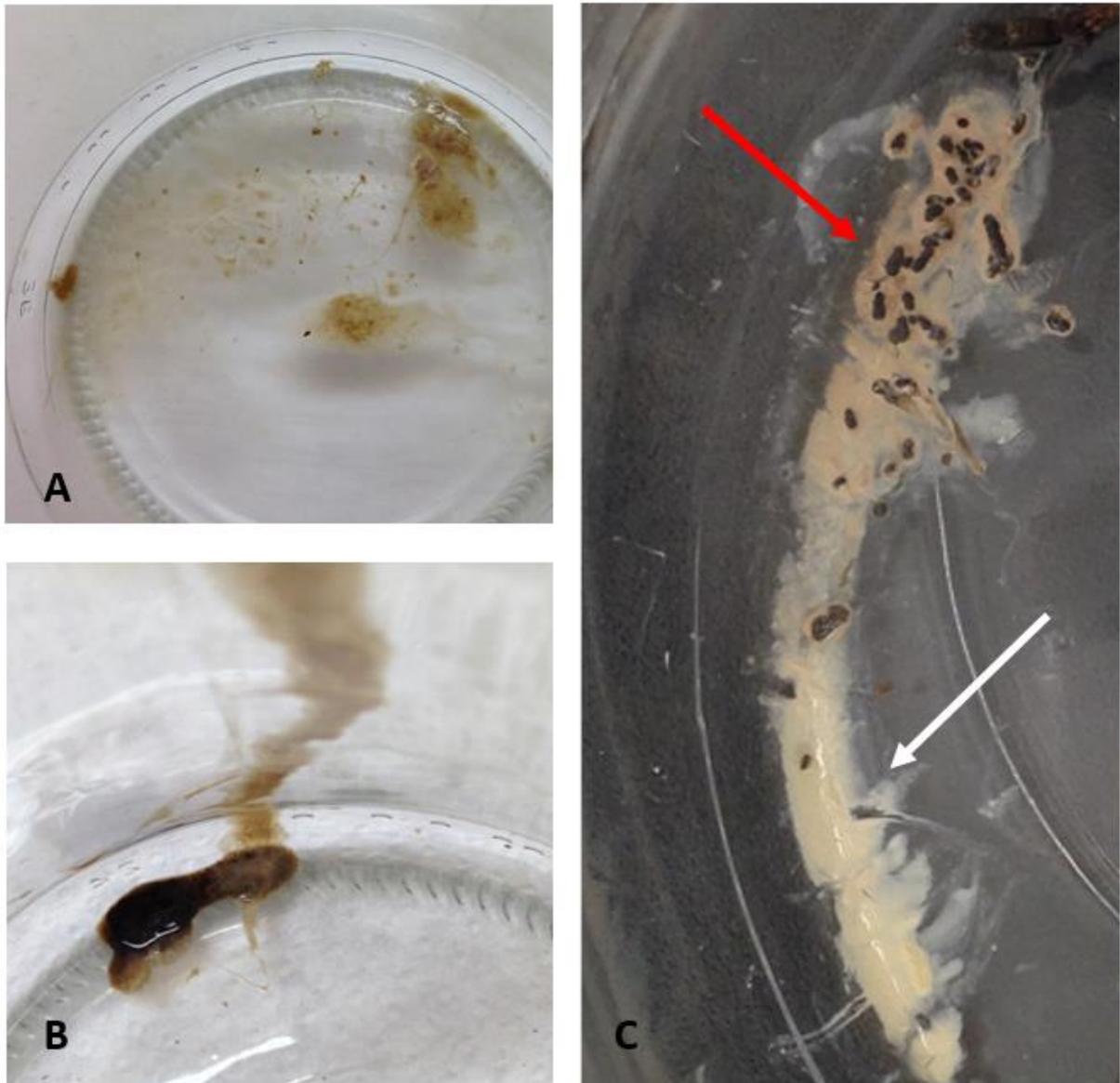
Aranha	Sinais clínicos / eventos	Organismo	Óbito
2127	Diarreia, perda de peso, e anorexia	<i>Urostipulosphaera sp.</i>	N
2132	Diarreia, perda de peso e anorexia	NI	S
2133	Diarreia, perda de peso e anorexia	Ciliado	S
2176	Perda de peso	NI	N
2182	Perda de peso	<i>Laurencia sp.</i>	N
2196	Diarreia, perda de peso e anorexia	<i>Colpoda steinii</i>	S
2435	Ooteca	NI	N
2664	Ooteca	<i>Parabodo caudatus</i>	N
3031	Ecdise	NI	N
3036	Diarreia, infestação por helmintos associada	Helmintos	N
3039	Diarreia, perda de peso e anorexia	NI	N
3051	Diarreia, perda de peso e anorexia	NI	S
3126	Diarreia, infestação por helmintos associada	Helmintos	N
3318	Diarreia, perda de peso e anorexia	NI	S
3388	Diarreia, perda de peso e anorexia	NI	S
3403	Diarreia, perda de peso e anorexia	<i>Urostipulosphaera sp.</i>	S
3413	Diarreia, perda de peso e anorexia	NI	N
3414	Diarreia, perda de peso e anorexia	Uroglenóides	S
3431	Diarreia, perda de peso e anorexia	NI	N

NI – Não identificados

N – Não

S – Sim

Figura 3 - A e B: fezes diarreicas, sem diferenciação de porção sólida e líquida. Foto C: Fezes normais de *Phoneutria nigriventer* (seta vermelha), a seta amarela aponta a urina, de coloração branca devido ao urato.



5.2 PCR e Análises das Sequências obtidas

As amostras positivas ao exame parasitológico foram submetidas a três reações de amplificação, cada reação utilizando um conjunto de *primers* descritos, totalizando 393 reações. Das 131 amostras positivas no exame parasitológico, 80 (61%) foram amplificadas por um ou mais *primers*, enquanto 51 (38,9%) não foram amplificadas. Das 131 reações realizadas com o primer 18SFU-18SRU, 58 (44,27%) foram amplificadas e 73 (55,72%) não amplificadas. Quando utilizado o *primer* d3-r7,

65 (49,6%) amostras foram amplificadas, e 66 (50,3%) não amplificadas. Apenas duas amostras (1,52%) foram amplificadas quando utilizado o *barcode* v7-v8. A tabela 2 relaciona as amostras que foram amplificadas ou não por cada *primer*

Tabela 2 – Amplificação das amostras de acordo com cada *primer*

Amostra	v7-v8	18sfu - 18rfu	d3 – r7
2092	-	-	+
2127	-	+	+
2132	-	-	+
2133	-	+	+
2176	-	+	-
2182	-	+	+
2196	-	-	+
2201	-	+	+
2209	-	+	+
2221	-	+	+
2430	-	+	+
2443	-	+	+
2454	-	+	-
2455	-	+	+
2664	+	-	+
2727	-	+	+
2737	-	+	+
2742	-	+	+
2744	-	+	-
2748	-	+	-
2749	-	-	+
2754	-	+	+
3016	-	+	-
3019	-	+	+
3022	-	+	-
3039	-	+	-
3051	-	+	+
3126	-	+	+
3129	-	+	+
3264	-	+	-
3309	-	+	+
3310	-	-	+
3317	-	+	+
3318	-	-	+
3329	-	-	+
3330	-	+	-
3345	-	-	+
3346	-	+	+
3347	-	+	+
3357	-	-	+
3359	-	+	+
3364	-	+	+
3366	-	+	+
3379	-	+	-

Tabela 2 – Amplificação das amostras de acordo com cada *primer*

Amostra	v7-v8	18sfu - 18rfu	d3 - r7
3383	-	+	+
3388	-	+	+
3389	-	-	+
3393	-	+	+
3403	-	+	+
3405	-	-	+
3408	-	-	+
3413	-	+	+
3414	-	+	+
3415	-	+	+
3420	-	+	-
3422	-	+	+
3431	-	+	+
3438	-	+	+
3568	-	+	+
5258	-	+	+
5270	-	-	+
5279	-	-	+
5295	-	-	+
5298	-	+	-
5300	-	+	+
5303	-	-	+
5304	-	+	+
5305	-	-	+
5318	-	+	-
5323	-	+	+
5377	-	+	+
PBS	-	+	+
S/N	+	-	+
Salina	-	+	-
S1	-	+	-

S/N – Sem número

+: Amplificada

-: Não amplificada

Das 80 amostras amplificadas foram obtidos 17 sequenciamentos, relacionados na tabela 3. Tais resultados correspondiam a 15 animais, uma vez que as amostras 2201a e 2201b pertenciam ao mesmo animal, e as amostras 3317a e 3317b pertenciam à outra aranha. Após análise dos sequenciamentos por BLAST, oito organismos (47%) foram identificados como ciliados, oito flagelados (47%) e um organismo (6%) como alga. Entre as oito amostras sequenciadas como protozoários flagelados, cinco (62,5%) foram identificadas como *Colpoda steinii*, uma (12,5%) como *Colpoda aspera*, uma (12,5%) apenas pelo gênero *Colpoda sp.* e uma (12,5%) identificada como “organismo ciliado”. Entre os oito flagelados, quatro (50%) foram

identificados como *Parabodus caudatus*, duas (25%) como *Urostipulosphaera sp.*, uma (12,5%) como *Helkesimastix sp.* e uma (12,5%) como um protozoário euglenóide. A alga sequenciada foi identificada como *Laurencia sp.*

Tabela 3 - Resultado dos sequenciamentos

Amostra	% Similaridade	Organismo	Número de acesso GenBank
2127	93,67%	<i>Urostipulosphaera sp.</i>	MK153246
2133	98%	Ciliado	KF995027
2182	98,89%	<i>Laurencia sp.</i>	MN447109
2196	100%	<i>Colpoda steinii</i>	KY454454
2201a	97,64%	<i>Colpoda steinii</i>	KJ607915
2201b	90,09%	<i>Colpoda steinii</i>	KJ607915
2209	94,27%	<i>Colpoda steinii</i>	KJ607915
2664	96,32%	<i>Parabodo caudatus</i>	AY028450
2727	92,68%	<i>Colpoda steinii</i>	MH715344
2737	81,43%	<i>Helkesimastix sp.</i>	FJ410915
3129	94,89%	<i>Parabodo caudatus</i>	DQ207590
3317a	97,05%	<i>Parabodo caudatus</i>	X53910
3317b	98,86%	<i>Parabodo caudatus</i>	DQ207590
3347	98,74	<i>Colpoda aspera</i>	KF111344
3403	95,59%	<i>Urostipulosphaera sp.</i>	MK153247
3414	99,12%	Uroglenóides	MK834582
3415	97,58%	<i>Colpoda sp.</i>	MH715344

Amostra 2201a e 2201b correspondem ao mesmo animal, porém colhidas em tempos diferentes.

Amostra 3317a e 3317b correspondem ao mesmo animal, porém colhidas em tempos diferentes.

6. DISCUSSÃO

Estudos parasitológicos em aranhas, com ênfase à infestação por nematoides cavitários pertencentes à família Mermithidae são diversos. Poinar Jr. (1987) demonstrou que em condições laboratoriais, aranhas são susceptíveis à infestação por nematóides pertencentes à ordem Rhabditida, podendo potencialmente causar a morte do hospedeiro. Existem ainda estudos demonstrando a relação de diversas espécies de aranhas com insetos parasitoides, como moscas e vespas. Pesquisas e identificação de protozoários intestinais em aranhas-armadeira, nunca antes foram realizadas, bem como o curso das infecções, tratando-se de animais cativos ou de vida livre.

O sequenciamento e a identificação de protozoários intestinais isolados a partir de amostras de fezes de *P. nigriverter* foram demonstrados aqui pela primeira vez, destacando sinais clínicos e eventos que podem estar diretamente ou indiretamente relacionados à infecção. Apesar de coletadas enquanto em cativeiro, as amostras de fezes deste estudo foram provenientes de aranhas capturadas em ambiente natural, sendo assim, os protozoários identificados refletem infecções causadas durante a vida livre das aranhas. O controle de qualidade da água oferecida aos animais, bem como o controle sanitário das baratas utilizadas na alimentação, exclui a possibilidade da infecção parasitária ter sido causada em cativeiro.

Para a identificação molecular dos protozoários intestinais de aranhas foram utilizados três diferentes conjuntos de *primers* para a amplificação do SSUrDNA, devido à ausência de estudos prévios em aranhas. Os iniciadores propostos por Tikhonenkov, et. al., (2016) foram padronizados para amplificar o gene 18S rRNA, sendo o mais generalista dos três conjuntos utilizados. Já os iniciadores propostos por Milyutina et. al., (2001) e Yubuki et. al., (2016) foram padronizados para amplificar amostras relacionadas ao supergrupo Excavata, que abrange protozoários do subgrupo Kinetoplastida (MASLOV et al., 2001). Este subgrupo é subdividido entre as subordens Bodonina e Trypanossomatina, contendo espécies de vida livre, patógenos de invertebrados, vertebrados e até plantas (MASLOV et al., 2001; SIMPSON et al., 2006). A região de *barcode* V7-V8 (MAIA DA SILVA et al., 2004) é utilizada para amplificar uma região utilizada na identificação de protozoários da família de parasitas obrigatórios Trypanosomatidae (SIMPSON et al., 2006).

Foram realizadas reações de amplificação das 131 amostras positivas ao exame parasitológico com cada um dos *primers* descritos, totalizando 393 reações. 51 amostras não foram amplificadas por nenhum dos três *primers* utilizados, o que é esperado devido à natureza deste trabalho, refletindo a dificuldade em escolher *primers* específicos devido à falta de estudos referente à microbiota intestinal de aracnídeos, especificamente protozoários. As amostras não amplificadas podem ser também justificadas por uma provável quantidade insuficiente de DNA ou a presença de inibidores da reação.

O gênero *Colpoda* sp. foi identificado na maioria das 17 amostras sequenciadas. Este gênero pertence ao Filo Ciliophora, classe Colpodea (WARREN, 2011). São protozoários adaptáveis e amplamente distribuídos, frequentemente encontrados em solo molhado, vegetação em decomposição, água parada, e corpos d'água, podendo ser fresco, salobro ou levemente salgado (LYNN, 2008; COSTACHE et al., 2011). Protozoários deste gênero não estão adaptados à vida parasitária em animais homeotérmicos, apenas ectotérmicos, pois se dividem e assumem forma ativa em temperaturas entre 8°C e 35°C, sendo a temperatura ótima entre 25°C e 28°C. Possuem também alta adaptabilidade a condições diversas, como pH, osmolaridade, ambiente anaeróbico (COSTACHE et al., 2011). *Colpoda steinii* é descrito como parasita facultativo de organismos invertebrados, como lesmas, porém existem alguns relatos deste protozoário como simbioses, provavelmente comensais, de outros organismos, como répteis, anfíbios e cervos (REYNOLDS, 1936; LYNN, 2008; COSTACHE et al., 2011). O ciliado *Colpoda aspera* foi igualmente descrito como parasita de gastrópodes terrestres, apesar da falta de informações, acredita-se serem comensais facultativos, e não sérios patógenos (VAN AS e BASSON, 2004).

Reynolds (1936) demonstrou que gastrópodes foram facilmente infectados por *Colpoda steinii* em laboratório após se alimentarem de alface contaminada, sugerindo que adquirem a infecção da mesma maneira na natureza. A infecção por estes protozoários em *Phoneutria nigriventer* pode ser explicada pelo consumo de presas infectadas, pois assim como lesmas, insetos podem se infectar através da alimentação, por plantas e outros alimentos contaminados. A observação de aranhas-armadeira em laboratório, mostrou que estes animais consomem água diretamente de fontes fornecidas (pote com água, gotas etc.), sugerindo que podem

também ingerir *Colpoda sp.* diretamente do consumo de água em ambiente natural. Apesar de apenas uma amostra, de um indivíduo que foi a óbito ainda durante a quarentena, ter sido identificada como *Colpoda steinii*, Reynolds (1936) descreve que lesmas infectadas em laboratório morriam aparentemente devido à infecção após um mês.

Parabodo caudatus (Stein) Moreira et.al.; binômio: *Bodo caudatus* Stein, pertence ao filo Euglenozoa, família *Bodonidae*. Nenhum dos animais infectados por este protozoário foi associado a algum sinal clínico ou evento adverso. *P. caudatus* são protozoários bacterívoros, biflagelados, encontrados em água fresca ou salgada, água parada com pouco ou nenhum oxigênio, esgoto, e como parasitas intestinais. É o clado de vida livre mais próximo aos Trypanosomatídeos (SKALICKÝ et al., 2017). Esta espécie é pouco documentada, porém há estudos indicando sua presença na urina de um cão apresentando hematuria, e em fezes de gorilas (VANDERSEA, et al., 2015; VOTÝPKA et al., 2018).

Helkesimastix sp. pertence ao filo Cercozoa, família Sainouridae (CAVALIER-SMITH et al., 2009). Foi isolado em uma amostra, não associada a nenhum sinal clínico. Existem três espécies descritas: *H. faecicola*, *H. major* and *H. marina*. Todas são flageladas, pequenas, cilíndricas com nenhum estágio do ciclo de vida conhecido (BASS et al., 2016). As duas primeiras espécies foram descobertas em esturmo de ovelhas e cabras, descritas como protozoários carregados passivamente pelo trato digestivo em forma de cistos. Posteriormente ambas foram encontradas no solo e água fresca (WOODCOCK e LAPAGE, 1915; WOODCOCK, 1921; TIKHONENKOV et al. 2012). Apesar de pouco abundante, *Helkesimastix sp.* é um dos zooflagelados mais amplamente registrados no solo (CAVALIER-SMITH et al., 2009).

O morfotipo semelhante à *Uroglena sp.* é representado por flagelados coloniais de vida livre, presentes em água doce (PUSZTAI e PAVEL, 2019). *Urostipulosphaera sp.* são flagelados coloniais, pertencentes ao filo Ochrophyta, família Ochyromonadaceae. Foram isolados em amostras de água doce de diversos países europeus (PUSZTAI e PAVEL, 2019). Não existem relatos na literatura referentes ao isolamento deste gênero em animais ou suas excretas. Todos as aranhas em que foram sequenciadas amostras compatíveis como *Urostipulosphaera sp.* e uroglenóides, apresentaram diarreia, perda de peso e anorexia, sendo que um animal positivo para *Urostipulosphaera sp.* e um positivo para uroglenóide foram a

óbito durante o período de quarentena. A presença de sinais clínicos e a alta letalidade indicam que estes protozoários podem possuir alta patogenicidade em *P. nigriverter* nas condições de cativeiro indicadas neste estudo.

O gênero *Laurencia* sp. representa algas de coloração vermelho-púrpura, amplamente distribuídas por oceanos temperados e tropicais (FUJII e SENTÍES, 2005). Pertence ao filo Rhodophyta, família Rhodomelaceae, compreendendo aproximadamente 145 espécies (KYAW e HTUN, 2019). Esta alga foi sequenciada em uma amostra de fezes de uma aranha que apresentou perda de peso progressivo. Na entrada do animal em quarentena foi registrado 4,86g de peso, desde então três pesagens foram realizadas: após dezoito dias, pesando 4,7g; após 48 dias, pesando 4,45g; após 60 dias, registrando 4,2g de peso. Apesar da perda de peso, algas do gênero *Laurencia* sp. apresentaram em estudos diversos, propriedades benéficas como atividade citotóxica contra células cancerígenas, atividades antivirais, antibacterianas, anti-helmínticas, antifúngicas, antimalárica, antiasmática, entre outras (AL-MASSARANI, 2014). A alga foi identificada nas fezes de uma aranha proveniente de Resende, Rio de Janeiro. O animal foi coletado no entorno de uma represa, porém, o gênero *Laurencia* sp. é composto por espécies marinhas, não havendo associação com o local descrito.

Assim como o gênero *Colpoda* sp., os gêneros *Helkesimastix* sp., *Urostipulosphaera* sp., a espécie *Parabodo caudatus* e parasitas euglenóides, são descritos como protozoários de vida livre, sendo encontrados em solo e água, distribuídos amplamente. Aranhas armadeira possuem hábito errante, e se alimentam de insetos variados, o que pode explicar a infecção pelos protozoários identificados neste trabalho. Associando informações relacionadas ao parasitismo em vertebrados e condições de cativeiro, alguns pontos podem ser sugeridos. De modo geral, o impacto do parasita ao seu hospedeiro irá depender de diversos fatores: carga parasitária, espécie do parasita, sistema imune do hospedeiro, entre outros. Devido aos seus hábitos, as aranhas-armadeira estão constantemente em movimento, sendo assim, como ocorre com diversos animais de vida livre, raramente irão permanecer em contato com suas excretas ou com o mesmo ambiente durante um período prolongado. Mesmo quando permanecerem, o ambiente poderá ser alterado por chuvas, vento e outros fatores, tornando muitas vezes infecções parasitárias autolimitantes. Quando mantido em cativeiro, o animal é forçado a viver em uma área delimitada, aumentando significativamente a probabilidade de

reexposição a parasitas, sendo continuamente reinfestado. Por este motivo, os parasitas identificados neste trabalho podem apresentar importâncias distintas ao hospedeiro quando em vida livre ou em cativeiro.

Apesar de pouco estudado em aranhas, o *stress* apresenta impactos negativos e positivos nos invertebrados, desencadeando uma série de mudanças fisiológicas como resposta. O *stress* crônico é um fator que afeta negativamente a resposta imune dos animais, além de levar a perda de peso, entre outros efeitos (ADAMO, 2012). Parasitismo é uma causa de *stress* crônico, e somado a outros fatores, como a captura do animal, a manipulação a qual são submetidos durante a quarentena e à rotina do cativeiro, elevam a exposição do animal ao *stress* e aos seus efeitos. Estudos realizados com diversos animais mostram que o *stress* nutricional em animais jovens pode afetar a maturidade sexual de diversas maneiras, incluindo tamanho do animal adulto, sucesso reprodutivo, comportamento, tempo de vida, entre outros (METCALFE e MONAGHAN, 2001; JESPERSEN e TOFT, 2003). Não se sabe o tipo de relação entre os protozoários identificados neste trabalho e o hospedeiro, bem como o impacto causado, porém, protozoários intestinais podem levar à má absorção de nutrientes, má digestão, anormalidades na mucosa intestinal e desequilíbrio da microbiota (SOLOMONS, 1982; HOSTE, 2001). O *stress* do cativeiro associado a patogenicidade causada pela infecção parasitária podem estar diretamente e indiretamente relacionadas à longevidade das aranhas parasitadas, bem como seu desenvolvimento, e demais funções fisiológicas.

Das 131 amostras positivas ao exame parasitológico, 14 estavam relacionadas a sinais clínicos ou eventos observados durante o período de quarentena. Todos os sinais clínicos observados foram relacionados ao trato digestivo, sendo eles: diarreia, perda de peso e anorexia. Dois animais apresentaram infestação por helmintos concomitantes à infecção por protozoários, sendo observado o mesmo quadro gastrointestinal. Oito destes animais (57,14%) foram à óbito durante o período de quarentena, indicando alta mortalidade entre os animais infectados que apresentaram sinais clínicos. Os sinais apresentados pela maior parte destes animais, mostrou possível relação com a infecção por protozoários, porém, não há na literatura estudos direcionados à patogenicidade de parasitas intestinais em aranhas, mostrando a necessidade de novas pesquisas para o melhor entendimento dos resultados e observações aqui descritos. Dois animais realizaram a confecção de ootecas viáveis e um terceiro animal realizou ecdise sem complicações durante o

período de quarentena, não sendo possível associar estes eventos à infecção por parasitas intestinais.

7. CONCLUSÃO

De modo geral, uma quantidade alta de *P. nigriventer* recebidas no Biotério de Artrópodes no período descrito, apresentou infecção por protozoários, alguns animais ainda, apresentando sinais clínicos importantes associados. A virulência e a patogenicidade de protozoários intestinais em aranhas são desconhecidas, sendo assim, em condições de cativeiro, parasitas podem facilmente ser carreados por insetos ou fômites, podendo causar grande impacto em um plantel.

A medicina veterinária em aranhas é pouco desenvolvida, sendo assim, a falta de informações referentes à microbiota intestinal e sinais clínicos associados a parasitoses se torna um grande obstáculo para o diagnóstico e para a definição da necessidade de instaurar um tratamento. Neste trabalho foram pesquisados e identificados pela primeira vez, protozoários intestinais que acometem aranhas-armadeiras, sendo um passo inicial para o entendimento de doenças parasitárias nestes animais, e para a adequação de protocolos de manejo geral e sanitário para *P. nigriventer* mantidas em cativeiro.

8. REFERÊNCIAS

ADAMO, S. A. The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. **Hormones and Behavior**. v. 62, n. 3, p. 324-330, ago. 2012

AL-MASSARANI, S. M. Phytochemical and Biological Properties of Sesquiterpene Constituents from the Marine Red Seaweed *Laurencia*: A Review. **Nat. Prod. Chem. Res.**, v. 2, n. 3, p. 1-13, ago. 2014.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. *Cometoides pechumani* sp. n. (Protozoa: Eugregarinida), a Gregarine Parasite of Salt Marsh Deerflies (Diptera: Tabanidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 31, n. 3, p. 324-328, mai. 1978.

ARAÚJO, A.; JANSEN, A. M.; BOUCHET, F.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. F. Parasitism, the Diversity of Life, and Paleoparasitology. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 5-11, jan. 2003.

BASS, D.; SILBERMAN, J. D.; BROWN, M. W.; PEARCE, R. A.; TICE, A. K.; JOUSSET, A.; GEISEN, S.; HARTIKAINEN, H. Coprophilic amoebae and flagellates, including *Guttulinopsis*, *Rosculus* and *Helkesimastix*, characterise a divergent and diverse rhizarian radiation and contribute to a large diversity of faecal-associated protists. **Environmental Microbiology**. v. 18, n. 5, p. 12064-1619, mai. 2016.

BENTO, A.C. **Caracterização bioquímica e farmacológica de polipeptídeos do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer***. 1996. Tese (Doutorado em Fisiologia e Biofísica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1996.

BIBBS, C. S.; BUSS, L. J. Widow Spider Parasitoids *Philolema latrodecki* (Fullaway) (Insecta: Hymenoptera: Eurytomidae) and *Baeus latrodecki* Dozier (Insecta: Hymenoptera: Platygasteridae). Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/in919> 2012> Acesso em: 24/ set. 2020.

BISHOP, R.; MUSOKE, A.; MORZARIA, S.; GARDNER, M.; NENE, V. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. **Parasitology**. v. 129, p. 271-283, 2004.

BRESCOVIT, A. D.; BERTANI, R.; PINTO-DA-ROCHA, R.; RHEIMS, C. A. Aracnídeos da estação ecológica da Juréia-Itatins: inventario preliminar e história natural (Arachnida). In: Marques, A. O., Duleba, W. **Ambiente Fauna e Flora da Estação Ecológica da Juréia-Itatins**. Ribeirão Preto, 2004. p. 198-221.

BRISCOE, M.S. A Survey of the Protozoan Fauna of the Cockroach *Blaberus craniifer*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 17, n. 2, p. 291, mar. 1971.

BUCARETCHI, F.; DE DEUS, R. C. R.; HYSLOP, S.; MADUREIRA, P. R.; DE CAPITANI, E. M.; VIEIRA, R. J. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. **Rev. Inst. Med. trop.** v. 42, n. 1, p. 17-21, fev. 2000.

BUCARETCHI, F.; MELLO, S. M.; VIEIRA, R. J.; MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. S. L.; ANTUNES, E.; HYSLOP, S. Systemic envenomation caused by the wandering spider *Phoneutria nigriventer*, with quantification of circulating venom. **Clin Toxicol (Phila)**. v. 46, n. 9, p. 885-889, nov. 2008.

BÜRCHEL, W. Dosagem Comparada da Atividade dos extratos glandulares e do veneno puro de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling), 1891. **Mem. Inst. Butantan**. v. 25, p. 01-21, 1953.

CAMARGO, E.P. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in Parasitology**. v. 42, p.29-112, 1999.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. **Microbiological Reviews**. v. 57, n. 4, p. 953-994, dez. 1993.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms protozoa and chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**. v. 6, p. 342-345, dez. 2010.

CAVALIER-SMITH, T.; LEWIS, R.; CHAO, E. E.; OATES, B.; BASS, D. *Helkesimastix marina* n. sp. (Cercozoa: Sainouroidea superfam. n.) a Gliding Zooflagellate of Novel Ultrastructure and Unusual Ciliary Behaviour. **Protist**. v. 160, n. 3, p. 452-479, ago. 2009.

CHANG, W. L.; YANG, C. Y.; HUANG, Y. C.; CHAO, D. Prevalence and Observation of Intestine-Dwelling Gregarines in the Millipede *Trigoniulus corallinus* (Spirobolida: Pachybolidae) Collected from Shoushan, Kaohsiung, Taiwan. **Formosan Entomol.** v. 24, p. 137-145, jun. 2004.

CLOPTON, R.E., *Leidyana migrator* n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida: Leidyaniidae) from the Madagascar Hissing Cockroach, *Gromphadorhina portentosa* (Insecta: Blattodea). **Invertebrate Biology**. v. 114, n. 4, p. 271-278, 1995.

CODDINGTON, J.A.; LEVI, H. W. Systematics and evolution of spiders (Araneae). **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 22, n. 1, p. 565-592, 1991.

COELHO, L. K.; GONÇALVES JR, J. C. *Phoneutria* sp. bite: clinical aspects and treatment. IVth Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins (IST). Campinas, Brazil, 1992. **Toxicon**. v. 31, p. 120, 1993.

COKENDOLPHE, R. J. C. Pathogens and parasites of opiliones (arthropoda: arachnida). **The Journal of Arachnology**. v. 21, p. 120-146, dez. 1993.

CORLISS, J.O.; COATS, D. W. A New Cuticular Cyst-producing Tetrahymenid Ciliate, *Lambornella clarki* n. sp., and the Current Status of Ciliatosis in Culicine Mosquitoes. **Trans. Amer. Cros. Soc.** v. 95, n. 4, p. 725-739, out. 1976.

COSTACHE, C.; BURSAȘIU, S.; FILIPAȘ, C.; COLOSI, I. A Case of Ciliate Protozoa *Colpoda* Spp. (Ciliata: Colpodidae) Detected In Human Urine. **Iran J Parasitol**. v. 6, n. 4, p. 99-104, dez. 2011.

COVA, M.; LÓPEZ-GUTIÉRREZ, B.; ARTIGAS-JERÓNIMO, S.; GONZÁLEZ-DÍAZ, A.; BANDINI, G.; MAERE, S.; CARRETERO-PAULET, L.; IZQUIERDO, L. The Apicomplexa-specific glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase gene family encodes a key enzyme for glycoconjugate synthesis with potential as therapeutic target. **Scientific Reports**. v. 8, p. 01-12, mar. 2018.

DINIZ, M. R.V.; PAIVA, A. L. B.; GUERRA-DUARTE, C.; NISHIYAMA JR, M.; MUDADU, M. A.; DE OLIVEIRA, U.; BORGES, M. H.; YATES, J.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. **PLoS One**. v. 13, p.. 1-29, ago. 2018.

DIVISÃO DE ZONÓSES/CVE. **Distribuição dos Acidentes por Aranhas Segundo Coeficiente de Incidência, Óbitos e Letalidade, Segundo Ano de Ocorrência, Estado de São Paulo, Período de 1988 a 2020**. Disponível em: < http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/peconhentos/peco_aranhas.pdf.> Acesso em: 27 dez. 2020.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**. v. 13, p. 6938-6946, mai. 2008.

DEVETAK, D.; MIHELAK, K.; KOS, I. Gregarines (Apicomplexa: Eugregarinida) of Chilopoda and Diplopoda in Slovenia. **Acta zool. bulg.** v. 71, n. 1, p. 121-128, mar. 2019.

FLOREZ, E.D.; ORTIZ, A.; MONTOYA, M. Accidentes por mordedura de la araña de las bananeras *Phoneutria boliviensis* (Araneae, Ctenidae) en la región de Uraba, Colombia. **Entomólogo**. v. 96, p. 01-04, 2003.

FOISSNER, W.; CHAO, A.; KATZ, L. A. Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). In: Foissner W., Hawksworth D.L. (eds) Protist Diversity and Geographical Distribution. **Topics in Biodiversity and Conservation**. v. 8, p. 111-129, 2007.

FUJII, M. T.; SENTÍES, A. G. Taxonomia do complexo Laurencia (Rhodomelaceae, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo. **Monografias Ficológicas**. v. 02, p. 69-135, ago. 2005.

GRISOLIA, C. S. Introducción accidental de fauna de interes sanitario en la República Argentina. **Neotropica**. v. 22, p. 50-52, 1976.

HAKLOVÁ-KOČÍKOVÁ, B.; HIŽŇANOVÁ, A.; MAJLÁTH, I.; RAČKA, K.; HARRIS, D. J.; FÖLDVÁRI, G.; TRYJANOWSKI, P.; KOKOŠOVÁ, N.; MALČEKOVÁ, B.; MAJLÁTHOVÁ, V. Morphological and molecular characterization of *Karyolysus* – a neglected but common parasite infecting some European lizards. **Parasites & Vectors**. v. 7, p. 555-567, dez. 2014.

HOEK, A. H. A.M.; VAN ALEN, T. A.; SPRAKE, V. S. I.; HACKSTEIN, J. H. P.; VOGELS, G. D. Evolution of Anaerobic Ciliates from the Gastrointestinal Tract: Phylogenetic Analysis of the Ribosomal Repeat from *Nyctotherus ovalis* and its Relatives. **Molecular Biology and Evolution**. v. 15, n. 09, p.1195-1206, set. 1998.

HÖFER, H.; BRESCOVIT, A. D. Species and guild structure of a Neotropical spider assemblage (Araneae) from Reserva Ducke, Amazonas, Brazil. **Andrias**. v. 15, n. 12, p. 99-119, dez. 2001.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. **International Journal for Parasitology**. v. 31, n. 3, p. 231 -244, mar. 2001.

IIDA, H.; HASEGAWA, H. First Record of a Mermithid Nematode Emerging from the Wolf Spider *Pardosa Pseudoannulata* (Araneae: Lycosidae). **Acta Arachnologica**. v. 52, n. 2, p. 77-78, dez. 2003.

JESPERSEN, L. B.; TOFT, S. Compensatory Growth Following Early Nutritional Stress in the Wolf Spider *Pardosa prativaga*. **Functional Ecology**. v. 17, n. 6, p. 737-746, dez. 2003.

KIM, J. I.; MIN, J. S.; KWON, M.; CHOI, J. Y.; LEE, S. H. Morphological and molecular characterizations of the Gregarina sp. (Apicomplexa: Protozoa) parasitizing on *Phaedon brassicae* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v. 17, n. 1, p. 1–5, mar. 2014.

KYAW, S. P. P.; HTUN, U. S. Morphology and distribution of *Laurencia* sp. 1 (Ceramiales, Rhodophyta) from Myanmar. **Journal of Aquaculture & Marine Biology**. v. 8, n. 6, p. 190-196, nov. 2019.

LAU, A. O. An overview of the *Babesia*, *Plasmodium* and *Theileria* genomes: A comparative perspective. **Mol Biochem Parasitol**. v. 164, n. 1, p. 1-8, dez. 2009.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH 3RD, A. R.; LOM, J., LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**. v. 27, n. 1, p. 37-58, fev. 1980.

LEVINE, N. D. **Introduction**. In: **The Protozoan Phylum Apicomplexa Vol I**. 1 ed. CRC Press, 1988.

LEWIS, J.G.E. Seasonal fluctuations in the protozoan parasites of the centipedes *Lithobius variegatus* and *Lithobius forficatus* in a Yorkshire woodland. **Journal of Zoology**. v. 151, n. 1, p.163–169, jan. 1967.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**. v. 26, n. 9, p. 759-772, 1988.

LYNN, D. H. **The ciliated protozoa: characterization, classification, and guide to the literature**. 3 ed. Pergamon Press, 2008.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A. C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; BRIGIDO, M. C.; JUNQUEIRA, A. C. V.; COURA, J. R.; TAKEFA, G. F.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. **Parasitology**. v. 128, n. 3, p. 283–94, mar. 2004.

MÁLAQUE, C. M. S.; ANTUNES, E. **Mecanismo de Ação do veneno de *Phoneutria* e aspectos clínicos do foneutrismo**. In: CARDOSO, J. L. C.; DE FRANÇA, F. O.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds) **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos Acidentes**. 1 ed. Sarvier, 2004.

MÁLAQUE, C. M. S. Acidentes causados por artrópodes peçonhentos. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/peconhentos_peco_16_acidente_artropodes_sjrp.pdf. ca. 2014
Acesso em: 21 nov. 2020.

MÁRQUEZ-JIMÉNEZA, F. J.; HIDALGO-PONTVEROSA, A.; CONTRERAS-CHOVAB, F.; RODRÍGUEZ-LIÉBANAA, J. J.; MUNIAIN-EZCURRA, M. A. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v. 23, n. 2, p. 94-102, fev. 2005.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A.; LUKE, J. Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 96, n. 3, p. 397-402, abr. 2001.

MCGAVIN, G. C. **Prologue**. In: **The Insects Structure e Function**. 5 ed. Cambridge University Press, 2013.

MEEHAN, T. P. **AAZV Guidelines for Zoo and Aquarium Veterinary Medical Programs and Veterinary Hospitals**. In: **Zoo and Wild Animal Medicine**. 1 ed. Elsevier Saunders, 2012.

METCALFE, N. B.; MONAGHAN, P. Compensation for bad start: grow now, pay later? **Trends in Ecology and Evolution**. v. 16, n. 5, p. 254-260, mai. 2001.

MILYUTINA, I. A.; ALESHIN, V. V.; MIKRJUKOV, K. A.; KEDROVA, O.S.; PETROV, N. B. The unusually long small subunit ribosomal RNA gene found in amitochondriate amoeboflagellate *Pelomyxa palustris*: its rRNA predicted secondary structure and phylogenetic implication. **Gene**. v. 272, n. 11, p.131–139, jul. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos**. <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13682-situacao-epidemiologica-dados> Acesso em: 10 jul. 2020.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An update view of kinedoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 1861-1875, set. 2004.

MORRISON, D. A. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? **Trends in Parasitology**. v. 25, n. 8, p. 375-382, ago. 2009.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS JR, H.B.; DEERFIELD II, D.W. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. **Embnew news**.v.4, p.14. 1997.

PACHECO, R. S.; MARZOCHI, M. C. A.; PIRES, M. Q.; BRITO, C. M. M.; MADEIRA, M. F.; BARBOSA-SANTOS, M. G. O. Parasite Genotypically Related to a Monoxenous Trypanosomatid of Dog's Flea Causing Opportunistic Infection in an HIV Positive Patient. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, n. 4, p. 531-537, jul. 1998.

PAI, H. H.; KO, Y. C.; CHEN, E. R. Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. **Acta Tropica**. v. 87, n. 3, p. 355-359, ago. 2003.

PARKER, J. R.; ROBERTS, M. J. Internal and External Parasites of the Spider *Pardosa hortensis* (Thorell) (Araneae: Lycosidae). **Bull Brit Arach Soc**. v.3, n. 3, p. 82-84, 1974.

PARKER, S. P. **Synopsis and classification of living organisms**. 2ed. McGraw-Hill, 1982.

- PAWLOWSKI, J. The Twilight of Sarcodina: a molecular perspective on the polyphyletic origin of amoeboid protists. **Protistology**. v. 5, n. 4, p. 281-302, 2008.
- PEIGNEUR, S.; DE LIMA, M. E.; TYTGAT, J. *Phoneutria nigriventer* venom: A pharmacological treasure. **Toxicon**. v. 151, n. 1, p. 96-110, set. 2018.
- PINEDA, S. S.; UNDHEIN, E. A.; RUPASINGHE, D. B.; IKONOMOPOULOU, M. P.; KING, G. F. Spider venomics: implications for drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**. v. 6, n. 15, p. 1629-1643, out. 2014.
- PIZZI, R. Parasites of Tarantulas (Theraphosidae). **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 18, n. 4, p. 283-288, out. 2009.
- POINAR JR., G. Nematode Parasites of Spiders. **Ecophysiology of Spiders**. p. 299-308, dez. 1987.
- POINAR JR., G.; POINAR, R. Parasites and Pathogens of Mites. **Annu. Rev. Entomol.** v. 43, n. 1, p. 449 – 69, jan. 1998.
- PUSZTAI, M.; PAVEL, S. Elucidating the evolution and diversity of Uroglena-like colonial flagellates (Chrysophyceae): polyphyletic origin of the morphotype. **European Journal of Phycology**. v. 54, n. 3, p.1–13, dez. 2019.
- RAMOS, E. F.; ALMEIDA, C. E.; GOUVEA, E.; CARMO-SILVA, M. D. Considerações sobre a atividade de locomoção, preferência por ecótopos e aspectos territoriais de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891). **Rev. Bras. Biol.** v. 58, n. 1, p. 71–78, fev. 1998.
- REYNOLDS, B. D. *Colpoda steini*, a Facultative Parasite of the Land Slug, *Agriolimax agrestics*. **The Journal of Parasitology**. v. 22, p. 48-53, 1936.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. v. 17, n. 1, p. 208-212, abr. 1963.

RICHARDSON, M.; PIMENTA, A. M. C.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M. M.; BEIRAO, P. S. L.; LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; BLOCH JR. C.; VASCONCELOS, E. A. R.; CAMPOS, F. A. P.; GOMES, P. C.; CORDEIRO, M. N. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. **Comparat. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.** v. 142, n. 3-4, p. 173–187, abr. 2006.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics.** v. 19, n. 12, p. 1572-1574, dez. 2003.

RUPPERT, E.; BARNES, R.D. **Zoologia Dos Invertebrados.** 6ed. Roca Ed.1996.

SOLOMONS, N. W. Giardiasis: Nutritional Implications. **Reviews of Infectious Diseases.** v. 4, n. 4, p. 859–869, 1982.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. CSH Laboratory Press, 1989.

SCHIAPELLI, R. D.; DE PIKELIN B. S. G. Estudio comparativo de *Phoneutria fera* Perty, 1833 y *Phoneutria nigriventer* (Keyserling), 1981 (Araneae: Ctenidae). **Mem. Inst. Butantan.** v. 33, n. 3, p. 675-682, 1966.

SILVA, L. M.; FORTES-DIAS, C. L.; SHAFFERT, P. P.; BOTELHO, A. C. C.; NACIF-PIMENTA, R.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; CORDEIRO, M. N.; PIMENTA, P. F. P. Developmental biology of the Brazilian ‘Armed’ spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891): Microanatomical and molecular analysis of the embryonic stages. **Toxicon.** v. 57, n. 1, p. 19-27, set. 2011.

SIMÓ, M. Nota breve sobre la introducción al Uruguay de la araña del banano: *Phoneutria nigriventer* (Keyserling 1891) y *Phoneutria keyserling* (Pickard-Cambridge 1897) (Araneae, Ctenidae). **Aracnol.** v. 4, n. 1, p. 1-4, 1984.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology.** v. 22, n. 4, p. 168-174, fev. 2006.

SVAKUMAR, T.; HAYASHIDA, K.; SUGIMOTO, C.; YOKOYAMA, N. Evolution and genetic diversity of *Theileria*. **Infect Genet Evol.** v. 27, p. 250-263, out. 2014.

SKALICKÝA, T.; DOBÁKOVÁA, E.; WHEELERC, R. J.; ROVÁA, M. T.; FLEGONTOVA, P.; JIRSOVÁA, D.; VOTÝPKAA, J.; YURCHENKOA, V.; AYALAG, F. J.; LUKEŠ, J. Extensive flagellar remodeling during the complex life cycle of *Paratrypanosoma*, an early-branching trypanosomatid. **PNAS**. v. 114, n. 44, p. 11757-11762, out. 2017.

SMITH, A. J.; COOK, T. J. Host Specificity of Five Species of Eugregarinida among Six Species of Cockroaches (Insecta: Blattodea). **Comparative Parasitology**. v. 75, n. 2, p. 288-291, jul. 2008.

SWOFFORD, D.L. **PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and Other Methods)**. Sinauer Associates, 1998.

TANADA, Y.; KAYA, H. K. **Insect Pathology**. Academic Press, 1993.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. v. 25, n. 24, p. 4876-4882, dez. 1997.

TIKHONENKOV, D. V.; MYLNIKOV, A. P.; GONG, Y. C.; FENG, W. S.; MAZEI, Y. Heterotrophic flagellates from freshwater and soil habitats in subtropical China (Wuhan area, Hubei province). **Acta Protozool**. v. 51, n. 1, p. 65–79, 2012.

TIKHONENKOV, D. V.; JANOUŠKOVEC, J.; KEELING, P. J.; MYLNIKOV, A. P. The Morphology, Ultrastructure and SSU rRNA Gene Sequence of a New Freshwater Flagellate, *Neobodo borokensis* n. sp. (Kinetoplastea, Excavata). **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 63, n. 2, p. 220-232, abr. 2016.

ULIANA, S. R.; AFFONSO, M. H.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania* : genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Exp. Parasitol**. v. 72, n. 2, p. 157-163, fev. 1991.

VALERIO, C.E. Sobre la presencia de *Phoneutria boliviensis* (F.O.P Cambridge) (Araneae, Ctenidae) en Costa Rica. **The Journal of Arachnology**. v. 11, p. 101-102, 1982.

VAN AS, J.; BASSON, L. **Ciliophoran (Ciliophora) parasites of Terrestrial Gastropods**. In BARKER, G. M. **Natural Enemies of Terrestrial Molluscs**. CABI Publishing, 2004.

VANDERGAST, A. G.; RODERICK, G. K. Mermithid Parasitism of Hawaiian *Tetragnatha* Spiders in a Fragmented Landscape. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 84, n. 2, p. 128-136, out. 2003.

VANDERSEA, M. W.; BIRKENHEUER, A. J.; LITAKER, R. W.; VADEN, S. L.; RENSCHLER, J. S.; GOOKIN, J. L. Identification of *Parabodo caudatus* (class Kinetoplastea) in urine voided from a dog with hematuria. **J Vet Diagn Invest**. v. 27, n. 1, p. 117-120, jan. 2015.

VOLLRATH, F. Biology of spider silk. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 24, n. 2 - 3, p. 81-88, mar. 1999.

VOTÝPKA, J.; PAFČO, B.; MODRÝ, D.; MBOHLI, D.; TAGG, N.; PETRŽELKOVÁ, K. J. An unexpected diversity of trypanosomatids in fecal samples of great apes. **Parasites and Wildlife**. v. 7, n. 3, p. 322–325, dez. 2018.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**. v. 18, n. 1, p. 124-193, fev. 1966.

WANG, Y.; TIAN, R. M.; GAO, Z. M.; BOUGOUFFA, S.; QIAN, P. Y. Optimal Eukaryotic 18S and Universal 16S/18S Ribosomal RNA Primers and Their Application in a Study of Symbiosis. **PLoS ONE**. v. 9, n. 3, mar. 2014.

WARREN, A. **Colpoda steini** in: **World Ciliophora Database**. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=426727>>. Acesso em: 15 dez. 2020.

WOODCOCK, H. M.; LAPAGE, G. Observations on the life-cycle of a new flagellate, *Helkesimastix faecicola*, n. g., n. sp.: Together with remarks on the question of syngamy in the trypanosomes. **Proc R Soc Lond**. v. 88, n. 604, p. 353– 370, fev. 1915.

WOODCOCK, H. M. Notes on coprozoic flagellates: 1. On the presence of an accessory flagellum in the genus *Helkesimastix*, Woodcock and Lapage. **Arch Zool Exp Gen.** v. 60, p.11–15, 1921.

YUBUKI, N.; ZADROBÍLKOVÁ, E.; ČEPIČKA, I. Ultrastructure and Molecular Phylogeny of *Iotanema spirale* gen. nov. et sp. nov., a New Lineage of Endobiotic Fornicata with Strikingly Simplified Ultrastructure. **Journal of Eukaryotic Microbiology.** v. 64, n. 4, p. 422-433, jul. 2016.

ZARITSKY, A.; BEN-DOV, E.; ZALKINDER, V.; BARAK, Z. Digestibility by and Pathogenicity of the Protozoa *Tetrahymena pyriformis* to Larvae of *Aedes aegypti*. **Journal of Invertebrate Pathology.** v. 59, n. 3, p. 332-334, mai. 1992.