

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

YASMIN DAOUALIBI VIANNA SIQUEIRA

PARASITOSE PULMONAR EM LOBOS-MARINHOS-
SULAMERICANOS (*Arctocephalus australis*) NA REGIÃO SUL
DO BRASIL

Porto Alegre

2021

YASMIN DAOUALIBI VIANNA SIQUEIRA

**Parasitose pulmonar em lobos-marinhos-sulamericanos
(*Arctocephalus australis*) na região sul do Brasil**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de concentração Patologia Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Profº. Drº. Saulo Petinatti Pararini

Co-orientador: Profº. Drº. João Fábio Soares

Porto Alegre

2021

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

CIP - Catalogação na Publicação

Siqueira, Yasmin Daoualibi Vianna
PARASITOSE PULMONAR EM LOBOS-MARINHOS-SULAMERICANOS
(Arctocephalus australis) NA REGIÃO SUL DO BRASIL /
Yasmin Daoualibi Vianna Siqueira. -- 2021.
49 f.
Orientador: Saulo Petinatti Pavarini.

Coorientador: João Fábio Soares.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2021.

1. Parafilaroides sp.. 2. ITS-2. 3. Pinípedes. 4.
Metastrongilídeos. I. Pavarini, Saulo Petinatti,
orient. II. Soares, João Fábio, coorient. III.
Titulo.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

YASMIN DAOUALIBI VIANNA SIQUEIRA

PARASITOSE PULMONAR EM LOBOS-MARINHOS-SULAMERICANOS
(*Arctocephalus australis*) NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de concentração Patologia Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Saulo Petinatti Pararini

Co-orientador: Prof^o. Dr^o. João Fábio Soares

Aprovado em 18 de março de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Luciana Sonne
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Sílvia Gonzalez Monteiro
Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a. Marcele Bettim Bandinelli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTO

Deixo aqui meu agradecimento e honra as excelentes instituições de ensino que me acolheram: UFRRJ e UFRGS. A todos os professores de Patologia que dedicam suas vidas ao ensino, em especial aos da UFRGS que facilitaram meu aprendizado durante o período do mestrado: prof Saulo Petinatti Pavarini, quem me orientou e tanto serviu como uma grande referência na área; e os professores Luciana Sonne e David Driemeier, pelos tantos ensinamentos nas necropsias, leitura de lâminas e sala de aula. Marcele Bettim Bandinelli pela ajuda com algumas técnicas histológicas do mestrado e principalmente por todo o ensino que fornece nas leituras de lâminas citológicas e histopatológicas com toda paciência, cuidado e dedicação. Cintia de Lorenzo por todos os ensinamentos e ajuda, sempre muito solícita e paciente. A todos os colegas do SPV por toda a ajuda nesses dois anos.

Agradeço por toda a ajuda do professor João Fábio Soares que abriu as portas para me co-orientar e me agregar um pouco ao Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais, além de ter facilitado o tema do projeto com suas parcerias e ferramentas moleculares. Um agradecimento especial para a aluna de doutorado Renata Fagundes Moreira que me ajudou gentil e pacientemente em grande parte deste estudo.

Ao IBAMA que me deu todo suporte nas saídas de campo, e todo o apoio que o Dr Paulo G. C. Wagner e Paulo Renato forneceram.

Meus pais Fátima Daoualibi e Márcio Siqueira por serem meus pilares e aos amigos que estivera comigo, me apoiaram e fizeram a vida ficar mais leve: Gustavo Ferreira, Tatiana Balem, Fernanda Mendes, Anna Carolina Costa, Chico Cordeiro, Desirre Muller, Ivy Michelino, Laura Marzullós, Camila Pohl. Ao Guilherme Magri Guterres agradeço por todo o acolhimento e parceria, assim como a Silvana Magri, tão queridos e especiais.

RESUMO

Diversas espécies de pinípedes são anualmente identificadas no Brasil, principalmente na costa gaúcha. O lobo-marinho-sulamericano (*Arctocephalus australis*) é a espécie de maior ocorrência na região litorânea Norte do Rio Grande do Sul devido ao seu tráfego para descanso e alimentação. Muitas vezes são encontrados encalhados, debilitados ou mortos e ao exame de necropsia, a pneumonia parasitária é um achado frequente. Dois gêneros são descritos em otarídeos incriminados etiologicamente nas pneumonias parasitárias, *Parafilaroides* spp. e *Otostrongylus circumlitus*. Dentre eles o nematódeo *Parafilaroides* spp., é observado tanto de forma incidental, quanto como causa mortis em lobo-marinho-sulamericano. Todavia, pouco se sabe sobre as características da doença, do nematódeo e de sua ocorrência no Brasil. O presente trabalho visa identificar, descrever e detalhar os aspectos morfológicos e moleculares da pneumonia parasitária no lobo-marinho-sulamericano. Para este estudo, foram analisados 26 espécimes de *A. australis*, encontrados mortos na costa norte do litoral gaúcho, no período de 2019 e 2020. Estes animais foram identificados, analisados macroscopicamente através da técnica de necropsia, e seus tecidos foram processados para análise histopatológica. Foram coletados também, fragmentos pulmonares para análise molecular por PCR convencional para amplificação do gene ITS-2 e *COX-1* para a identificação dos metastrongilídeos. No total 12 animais apresentaram parasitos no parênquima pulmonar na análise histopatológica e desses, um exibiu lesão no exame de necropsia, caracterizada por nódulos, esbranquiçados e multifocais em todos os lobos pulmonares. Microscopicamente os nematódeos encontravam-se, sobretudo, nos alvéolos e apresentavam características compatíveis com outros metastrongilídeos. O aparelho reprodutor feminino, por vezes continha ovos larvados. Seis sequências de qualidade do gene ITS-2 foram obtidas, e após análise comparativa via BLAST, sequências de *Parafilaroides normani* foram determinadas. Desta maneira, pneumonia parasitária por *Parafilaroides normani* é um importante diagnóstico diferencial de doença pulmonar em lobos-marinhos-sulamericanos encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul e seu conhecimento permite que os centros de reabilitação atuem de forma direcionada nos casos de encalhe dessa espécie.

Palavras-chave: *Parafilaroides* sp., ITS-2, pinípedes, metastrongilídeos

ABSTRACT

Several species of pinnipeds are identified in Brazil, mainly on the coast of Rio Grande do Sul. The South American fur seal (*Arctocephalus australis*) is a species of greater occurrence in the northern coastal region of Rio Grande do Sul due to its traffic for rest and feeding. They are often found stranded, debilitated or killed and at necropsy, a parasitic pneumonia is a frequent finding. Two genera are identified in otarids etiologically incriminated in verminotic pneumonias, *Parafilaroides* spp. and *Otostrongylus circumlitus*. Among them, the nematode *Parafilaroides* spp., is observed both incidentally and as a cause of death in the South American fur seal. However, little is known about the characteristics of the disease, the nematode and its occurrence in Brazil. The present work aims to identify, and involve the morphological and molecular aspects of parasitic pneumonia in the South American fur seal. For this study, 26 specimens of *A. australis* were forced, found dead on the north coast of the south brazilian coast, in the period of 2019 and 2020. These animals were identified, displaced macroscopically using the necropsy technique, and their tissues were processed for histopathological analysis. Lung fragments were also collected for molecular analysis by conventional PCR to amplify the ITS-2 and COX-1 gene for the identification of metastrongylids. In total 12 animals presented lungworms in the histological analysis, and one exhibited a lesion in the necropsy exam, characterized by whitish and multifocal nodules in all pulmonary lobes. Microscopically, nematodes were found mainly in the alveoli and had characteristics compatible with other metastrongylids. The female reproductive system sometimes contained larvae. Six quality sequences of ITS-2 gene were available, and after comparative analysis via BLAST, sequences of *Parafilaroides normani* were determined. Thus, verminotic pneumonia caused by *Parafilaroides normani* is an important differential diagnosis of lung disease in South American fur seals found on the north coast of Rio Grande do Sul and its knowledge that allows rehabilitation centers in a targeted manner in cases of strandings of this species.

Keywords: *Parafilaroides* sp., ITS-2, pinnipeds, metastrongylids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos nematódeos pulmonares de otarídeos.....	6
Figura 2 - Ciclo do parasito <i>Parafilaroides decorus</i> , descrito no hospedeiro definitivo leão-marinho-californiano (<i>Zalophus californianus</i>) e no hospedeiro intermediário Opaleye (<i>Girella nigricans</i>).....	9
Figura 3 - Lobo-marinho-sulamericano (<i>Arctocephalus australis</i>) observado nos trabalhos de campo deste estudo.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Parafilaroides</i> descritas e seus respectivos hospedeiros.	8
Tabela 2 - Classificação do estado de conservação de animais marinhos em <i>codes</i>	16
Tabela 3 - Relação de sexo, faixa etária, <i>causa mortis</i> e parasitos metazoários encontrados nos lobos-marinhos-sulamericanos (<i>Arctocephalus australis</i>) coletados no litoral norte do Rio Grande do Sul para este estudo.	22
Tabela 4 - Relação de positividade entre histopatologia e reação em cadeia da polimerase (PCR) para <i>Metastrongyloidea</i> nos lobos-marinhos deste estudo.	25
Tabela 5 - Genbank BLAST e resultados para a região ITS-2 dos <i>Parafilaroides</i> sp.	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	Parasitas metazoários em lobos-marinhos	2
2.1.2	Nematódeo	2
2.1.3	Cestódeos	3
2.1.4	Acantocéfalas.....	4
2.1.5	Trematódeos.....	4
2.1.6	Artrópodes.....	5
2.2	Parasitas pulmonares em lobos-marinhos	5
2.2.1	<i>Parafilaroides</i> spp.	6
2.2.2	<i>Otostrongylus circumlitus</i>	12
3	OBJETIVOS.....	15
3.1	Objetivos gerais	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1	Coleta e seleção dos animais estudados.....	16
4.2	Análise dos animais e coleta das amostras.....	17
4.3	Análise histopatológica	17
4.4	Extração de dna.....	18
4.5	Análise molecular por reação em cadeia polimerase	18
4.7	Imuno-histoquímica	20
5	RESULTADOS.....	21
5.1	Resultados gerais.....	21
5.2	<i>Causa mortis</i>	21
5.3	Alterações pulmonares.....	23
5.4	Exame molecular (pcr)	24
5.5	Sequenciamento e filogenia	25
5.6	Imuno-histoquímica	26
6	DISCUSSÃO.....	27

7 CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Diferentes enfermidades que acometem o ecossistema marinho têm sido estudadas mundialmente por pesquisadores de populações de pinípedes com a finalidade de manter sua conservação (SEGUEL *et al.*, 2011; SEGUEL *et al.*, 2013; KATZ *et al.*, 2012; AMORIM, 2014). O estudo da vida desses animais também tem grande importância sob a visão do conceito de *one health*, uma vez que a saúde dos mesmos influencia todo o ecossistema. Como exemplo, doenças parasitárias presentes em espécies de peixes e mamíferos aquáticos representam importantes zoonoses (SEPÚLVEDA *et al.*, 2015). Pinípedes são potentes predadores e sua saúde é muito influenciada pelas condições do meio ambiente aquático (GULLAND; HALL, 2007). Os parasitos encontrados em pinípedes geralmente trazem informações sobre a sua alimentação, tendo a maioria um ciclo heteroxeno, apresentando o peixe como hospedeiro intermediário. Em filhotes a principal via de transmissão de endoparasitos gastrointestinais é pela lactação, que ocorre até os 12 meses de idade no lobo-marinho-sulamericano (LYONS *et al.*, 1997; PONCE DE LEÓN, 1983; PONCE DE LEÓN, 1984).

Doenças parasitárias pulmonares causadas por nematódeos como *Otostrongylus circumlitus* (Metastrongyloidea: Crenosomatidae) e *Parafilaroides* spp. (Metastrongyloidea: Filaroididae) são comumente encontrados em pinípedes (ONDERKA, 1989; DAILEY, 2001; DAILEY, 2009; SIEBERT *et al.*, 2007). Enquanto o nematódeo *Otostrongylus circumlitus* acomete distintos pinípedes, o gênero *Parafilaroides* apresenta sete espécies que aparentemente têm afinidades específicas para cada hospedeiro definitivo de diferentes regiões (DAILEY, 2006; DAILEY, 2009; JACOBUS *et al.*, 2016; REISFELD *et al.*, 2019; ECHENIQUE *et al.*, 2020). A variação de espécies parasitárias que acometem pinípedes, provavelmente ocorre pela especificidade do parasita aos seus hospedeiros intermediários e definitivos, e considerando que todos os lobos-marinhos encontrados nesse estudo são da mesma espécie e região e, portanto, se alimentam de presas de habitats semelhantes, é esperado que também apresentem as mesmas espécies parasitárias (RAND, 1959). Estudos sobre parasitoses em lobos-marinhos são muito escassos, principalmente no hemisfério sul (KATZ *et al.*, 2012; LAUER JUNIOR *et al.*, 2017; REISFELD *et al.*, 2019). Objetiva-se com este trabalho descrever os aspectos morfológicos e moleculares da pneumonia parasitária nos lobos-marinhos-sulamericanos encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PARASITOS METAZOÁRIOS EM LOBOS-MARINHOS

Os lobos-marinhos-sulamericanos são amplamente parasitados por diversas espécies metazoárias (HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2012; KATZ *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2015; LAUER JUNIOR *et al.*, 2017) e podem abrigar estes indivíduos sem grandes malefícios a saúde ou contrair doenças fatais (SEGUEL *et al.*, 2017).

Os parasitos mais encontrados em lobos-marinhos pertencem aos filos Nematoda, Acanthocephala e Platyhelminthes - classe Cestoda. A classe Trematoda é raramente relatada e considerada irrelevante (LAUCKNER, 1985; RAGA *et al.*, 2009; LAUER JUNIOR *et al.*, 2017). Muitos destes apresentam semelhança com os parasitos encontrados em carnívoros terrestres, como cães, provavelmente devido aos ciclos terrestres que estes animais marinhos apresentam (LEIDENBERGER *et al.*, 2007).

2.1.2 Nematódeo

Os nematódeos formam o grupo de parasitos mais encontrados nas fezes de lobos-marinhos (LAUER JUNIOR *et al.*, 2017) e são os mais registrados como geradores de doenças e mortalidades em pinípedes (LAUCKNER, 1985; SEGUEL *et al.*, 2017; SEGUEL *et al.*, 2018b; REISFELD *et al.*, 2019). São vermes cilíndricos, com dimorfismo sexual, cavidade celomática e aparelho digestivo (TRAVASSOS, 1950; BOWMAN, 2014). Em lobos-marinhos, compreendem gêneros das famílias Ancylostomatidae (duas espécies do gênero *Uncinaria*), Filaroididae (sete espécies de *Parafilaroides*), Crenosomatidae (*Otostrongylus circumlitus*), Anisakidae (14 e espécies que envolvem os gêneros *Pseudoterranova*, *Phocascaris* e *Contracaecum*), e Strongyloididae (*Strongyloides* sp.), que incluem parasitos gastrointestinais e pulmonares (HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2012; RAGA *et al.*, 2019).

Em um estudo realizado no Brasil por Marigo (2003), foi concluído que as pneumonias causadas por parasitos pulmonares são mais prejudiciais aos pinípedes quando comparado as enfermidades por parasitos gastrointestinais. Em *A. australis*, a enterite hemorrágica e anemia por *Uncinaria* sp. é bem documentada e conhecida como uma das principais causas de morte em animais juvenis, frequentemente até seis meses de idade

(SEGUEL *et al.*, 2011; SEGUEL *et al.*, 2013; SEGUEL *et al.*, 2017). *Strongyloides* sp. também é encontrado no intestino delgado e grosso de lobos-marinhos-sulamericanos jovens, assim como em outros pinípedes, porém sem incitar lesões significativas (MORGADES *et al.*, 2006; KATZ *et al.*, 2012). Embora a parasitose pulmonar em *A. australis* necessite de mais estudos, *Parafilaroides* spp. é relatado como um parasita debilitante e potencialmente fatal (AMORIM, 2014; JACOBUS *et al.*, 2016; ECHENIQUE *et al.*, 2020). Da mesma maneira, *Otostrongylus circumlitus* gera intensas pneumonias em pinípedes, no entanto é considerado um importante parasita de elefantes-marinhos-do-norte (*Mirounga angustirostris*) e em focas-do-porto (*Phoca vitulina*) (COLEGROVE *et al.*, 2005). Em otarídeos gera infecções graves com menor frequência, com descrições em leões-marinhos (KELLY *et al.*, 2005) e lobo-marinho-antártico (BAKER; MCCANN, 1989), não tendo sido encontrado relatos em lobos-marinhos-sulamericanos.

Os anisquídeos que acometem pinípedes compreendem os gêneros *Pseudoterranova*, *Phocascaris*, *Contraecum* e *Anisakis*, que podem causar sinais clínicos ou não, independentemente da intensidade da infecção. Quando o hospedeiro é susceptível, o animal pode apresentar gastrite aguda ou crônica, além de ulceração e perfuração gástrica (MEASURES, 2014). O gênero *Anisakis* é amplamente distribuído pelo mundo, e também é o parasita da família Anisakidae mais estudado, já que também infectam humanos que ingerem peixes infectados crus (RAGA *et al.*, 2009). Esse gênero acomete principalmente cetáceos, sendo pouco frequente em pinípedes, porém nestes raramente atingem estágios maduros (RAGA *et al.*, 2009; MEASURES, 2014). Estudos indicam que os lobos-marinhos são mais acometidos pelo gênero *Contraecum*, parasita que apresenta aves aquáticas como hospedeiros primários (RAGA *et al.*, 2009).

2.1.3 Cestódeos

Os cestódeos têm o corpo dividido em escolex, por onde é realizada a fixação ao hospedeiro, pescoço (colo) que é a região germinal que dá origem ao estrobila, região reprodutiva do parasita. São dorso-ventralmente achatados, alongados, acelomados, segmentados, não têm tubo digestivo e são hermafroditas (BOWMAN, 2014). Majoritariamente são compostos de espécies da família Diphyllbothriidae. Desta família, o gênero *Diphyllbothrium* é o mais encontrado e acomete diversas espécies de pinípedes, aves marinhas e humanos. É documentado como o cestódeo que mais ocorre em *A. australis* (HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2013). Este gênero geralmente não causa enfermidade severa,

porém ocasionalmente animais podem ter anemia perniciosa devido à deficiência de vitamina B12 (RAGA *et al.*, 2009). Um gênero de Tetrabothriidae, *Anophryocephalus* (sete espécies) é associado com pinípedes árticos e subárticos. Euphasídeos e peixes são respectivamente os hospedeiros intermediários e paratênicos (LAUCKNER, 1985; RAGA *et al.*, 2009).

2.1.4 Acantocéfalos

Os parasitos acantocéfalos compreendem o grupo de helmintos mais populoso da fauna intestinal de lobos-marinhos-sulamericanos (AZNAR *et al.*, 2004; HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2013). O gênero *Corynosoma*, mais comumente encontrado (mais de 20 espécies) acomete o intestino dos pinípedes hospedeiros definitivos (lobos e leões-marinhos, focas e morsas) raramente pássaros marinhos e cetáceos e apresentam como hospedeiros intermediários os crustáceos (principalmente anfípodes) e peixes como hospedeiros paratênicos (RAGA *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Aznar *et al.* (2004) em 27 lobos-marinhos-sulamericanos, foi encontrado apenas a espécie *Corynosoma australe* que infestou massivamente os intestinos delgado e grosso de todos os animais, mas com predominância no jejuno e íleo. Outras espécies também como *C. cetaceum* também são encontradas com menos frequência nesses animais (HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2013). Os lobos-marinhos são infectados quando começam a ingerir alimento sólido e geralmente não apresentam sérias complicações. Clinicamente foi sugerido que haja mudanças no metabolismo (AZNAR *et al.*, 2004). De forma semelhante, *Bolbosoma* spp. são parasitos que também acometem o intestino de várias espécies de pinípedes de forma irrelevante (LAUCKNER, 1985; RAGA *et al.*, 2009).

2.1.5 Trematódeos

Trematódeos são representados por oito famílias. Dentro de Brachycladiidae (anteriormente Campulidae), quatro espécies do gênero *Orthosplanchnus* infectam focas árticas e subárticas, e morsas, enquanto *O. antarcticus* ocorre em focas-antárticas. *Zalophotrema hepaticum* está associado a parasitose hepática em leões-marinhos-californianos no nordeste do Pacífico. Os braquiclaidídeos dos pinípedes vivem nos ductos biliares, na vesícula biliar e, raramente, no intestino. (LAUCKNER, 1985; RAGA *et al.*, 2009).

Em 2012, uma nova espécie da família Heterophyidae, *Ascocotyle* sp., um trematódeo intestinal foi documentada em leão-marinho (*Otaria flavescens*) na Patagônia. Sugeriu-se que sua infecção ocorre pela transmissão de peixes, através de sua alimentação (HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2012). Em lobos-marinhos amostras fecais positivas para essa classe foram encontradas em três animais, sendo apenas um deles com alta taxa em um lobo-marinho-subantártico, e não foram observadas ocorrências em *A. australis*. Entretanto, as parasitoses por trematódeos em lobos-marinhos parecem ser irrelevantes (HERNÁNDEZ-ORTS *et al.*, 2013; LAUER JUNIOR *et al.*, 2017).

2.1.6 Artrópodes

Dois principais grupos de artrópodes estão relacionados aos pinípedes, piolhos (Echinophthiriidae) e ácaros (Halarachnidae). Os piolhos são amplamente distribuídos, envolve quatro gêneros e nove espécies de parasitos, acometem a pele das três grandes famílias de pinípedes, sendo transmitidos por contato direto (RAGA *et al.*, 2009).

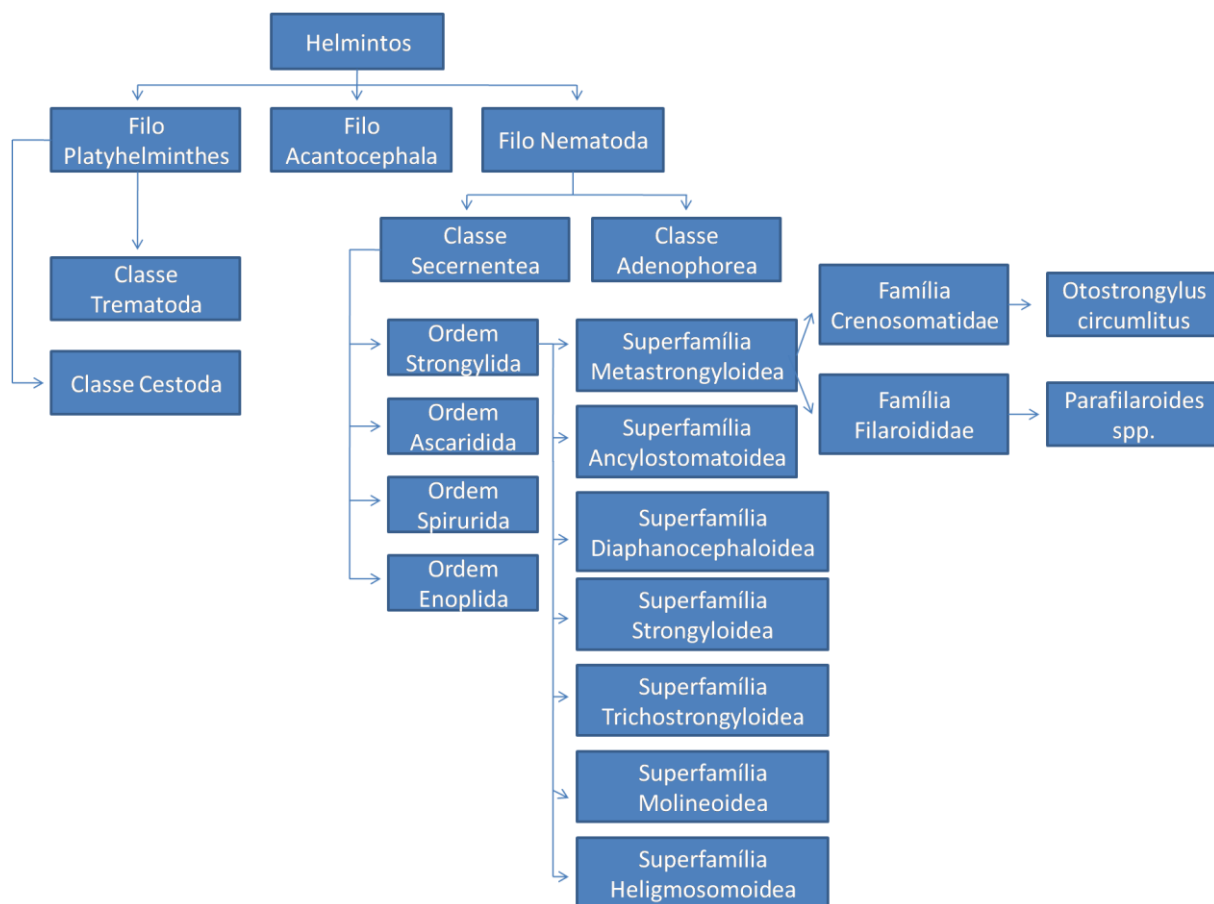
Os ácaros são representados por seis espécies dos gêneros *Halarachne*, que acometem focídeos, e *Orthohalarachne* (*O. diminuata* e *O. attenuata*), que acometem otarídeos e odobenídeos. Todo o ciclo dos ácaros ocorre no mesmo hospedeiro e a transmissão ocorre em terra, quando as larvas são transmitidas por contato direto entre os focinhos dos hospedeiros ou são espirrados pelos mesmos (RAGA *et al.*, 2009). As ninfas e larvas de ambas as espécies habitam a cavidade nasal do hospedeiro, enquanto os ácaros adultos de *O. diminuata* infectam o trato respiratório inferior e de *O. attenuata* infectam a nasofaringe. Os sinais variam de descarga nasal e espirros à infecção pulmonar e enfisema (KIM *et al.* 1980). No trato respiratório inferior, os ácaros podem gerar obstrução das vias aéreas com conseqüente inflamação severa, edema, enfisema, fibrose, congestão e ocasionalmente infecções bacterianas secundárias, podendo ser fatal (SEGUEL *et al.*, 2018a). No trato superior pode ocorrer inflamação crônica da mucosa e hiperplasia de glândulas seromucosas (KIM *et al.* 1980; GASTAL *et al.*, 2016).

2.2 PARASITOS PULMONARES EM LOBOS-MARINHOS

Os parasitos pulmonares encontrados em otarídeos compreendem espécies incluídas em dois gêneros da Superfamília Metastrongyloidea: *Parafilaroides* e *Otostrongylus* (DAILEY,

2001; SIEBERT *et al.*, 2007; REISFELD *et al.*, 2019). Na Figura 1, encontra-se ilustrado a taxonomia desses parasitos.

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos nematódeos pulmonares de otarídeos.



Fonte: (ANDERSON, 1978; DAILEY, 2006; BOWMAN, 2014).

2.2.1 *Parafilaroides* spp.

Parafilaroides (DOUGHERTY, 1946; ANDERSON 1978), são pequenos nematódeos delicados que parasitam o parênquima respiratório de pinípedes (MEASURES, 2001; DAILEY, 2009). Pertencem à Superfamília Metastrongyloidea e a família Filaroididae, junto com o subgênero *Filaroides* que acomete os pulmões de carnívoros, primatas e marsupiais australianos (DAILEY, 2006). A família Filaroididae, na qual o gênero *Parafilaroides* encontra-se inserido, é caracterizada particularmente por não apresentar bursa copulatória (ANDERSON, 1978). *P. gymnurus* foi originalmente descrito como uma espécie de *Pseudalius* devido à presença de uma indistinta bursa (Railliet, 1899). Morfologicamente, não existem afinidades do gênero *Parafilaroides* com a família

Pseudaliidae, já que estes apresentam estruturas distintas no final da cauda. Então foram caracterizados como um subgênero da família Filaroididae (ARNOLD; GASKIN, 1975). Entretanto, Dailey (2006) restaurou o *Parafilaroides* como um gênero, devido a descobertas de características como os raios papilares indistintos (ou degenerados) e espículas menores que as de *Filaroides* spp. Carreno e Nadler (2003) realizaram um estudo de análise filogenética da superfamília dos metastrongilídeos, e seus dados apontam que *Parafilaroides* assemelham-se mais evolutivamente com a família Pseudaliidae e sugerem que a partir de mais estudos a atual classificação seja novamente analisada.

Parafilaroides spp. compreendem sete espécies que estão especificados na Tabela 1. A diferença entre as espécies é caracterizada por aspectos morfológicos relacionados ao comprimento das estruturas de cada um (DAILEY *et al.*, 2009). Gosselin e Measures (1997) identificaram quatro espécies anteriormente descritas: *Parafilaroides gymnurus* (Railliet, 1899; Anderson 1978), *P. decorus* (Dougherty e Herman, 1947; Anderson 1978), *P. hydrurgae* (Mawson, 1953; Kennedy, 1986), e *P. hispidus* (Kennedy, 1986). Dailey em 2006 descreveu as espécies *P. measuresae* e *P. gullandae*, e em 2009 descreveu a espécie *P. normani*. Estas espécies são provenientes de pinípedes que foram encontrados no Hemisfério Norte, com exceção de *P. Hydrurgae* e *P. normani* que foram reportados em animais marinhos no Hemisfério sul. Dailey (2009) diagnosticou uma nova espécie de *Parafilaroides* em pinípedes (*P. normani*), identificada no lobo-marinho-australiano (*Arctocephalus pusillus doriferus*, Wood Jones 1925), no lobo-marinho-da-Nova Zelândia (*A. forsteri*, Lesson 1828), e lobo-marinho-subantártico (*A. tropicalis*, Gray 1872) encontrado na África do Sul. Antes disso, uma única espécie de *Parafilaroides* (*P. hydrurgae*) havia sido descrita no Hemisfério Sul, encontrada na ilha Heard, na Austrália, em dois leopardos-marinhos (*Hydrurga leptonyx*) (MAWSON, 1953). Após a pesquisa de Mawson (1953), pneumonias parasitárias por espécies não identificadas de *Parafilaroides* foram relatadas em leão-marinho-australiano (NICHOLSON; FANNING, 1981) e lobo-marinho-antártico (BAKER; MCCANN, 1989). Pesquisas recentes no Brasil identificaram casos de pneumonia por *Parafilaroides normani* em lobo-marinho-sulamericano (*A. australis*) (JACOBUS *et al.*, 2016; ECHENIQUE *et al.*, 2020); um caso de pneumonia por *Parafilaroides* spp. em um lobo-marinho-antártico (*Arctocephalus gazella*) (JACOBUS *et al.*, 2016) e em um lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) (REISFELD *et al.*, 2019); e um caso de *P. normani* em em um lobo-marinho-subantártico (ECHENIQUE; VALENTE, 2014).

Tabela 1 - Espécies de *Parafilaroides* descritas e seus respectivos hospedeiros.

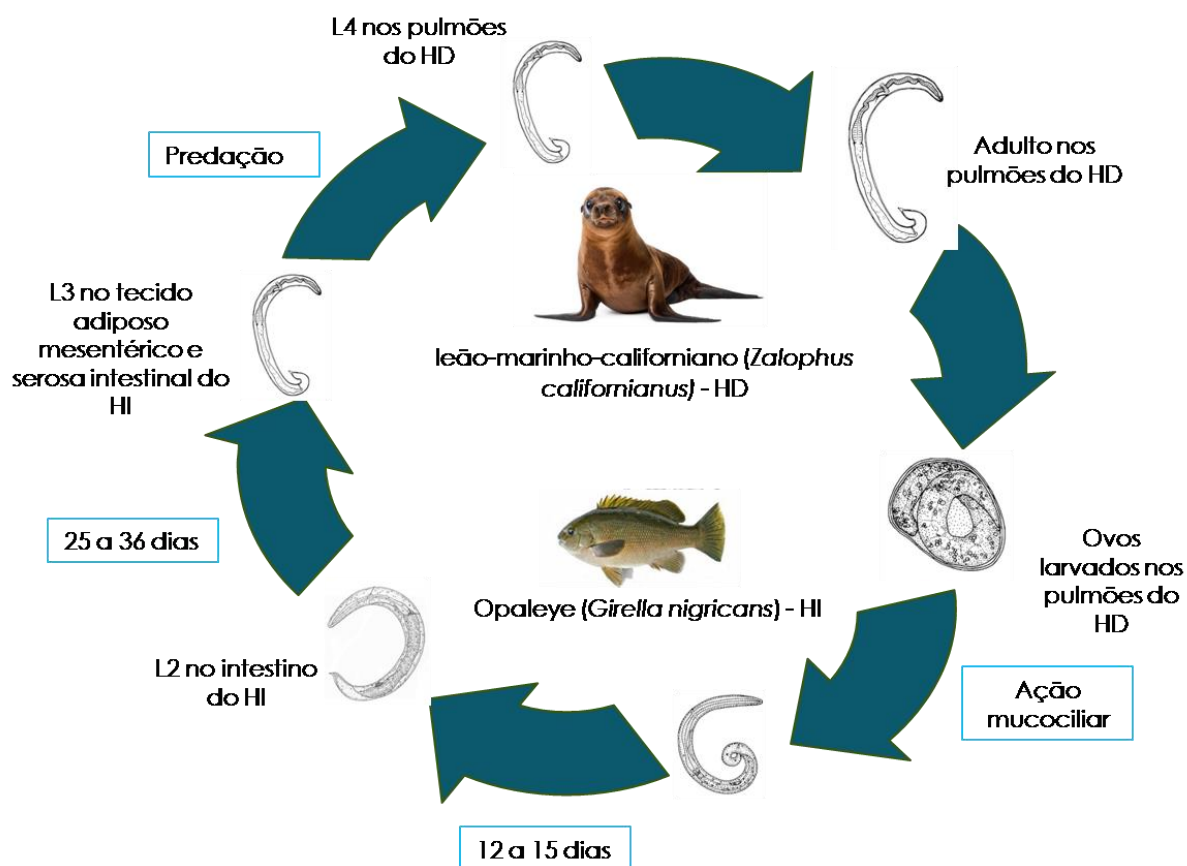
Espécie de <i>Parafilaroides</i>	Hospedeiro
<i>P. gymnurus</i>	<i>Phoca vitulina vitulina</i>
	<i>Pusa hispida</i>
	<i>Pagophilus groenlandicus</i>
	<i>Phocalargha</i>
	<i>Halichoerus grypus</i>
<i>P. decorus</i>	<i>Erignathus barbatus</i>
	<i>Pusa sibirica</i>
	<i>Zalophus californianus</i>
<i>P. hydrurgae</i>	<i>Callorhinus ursinus</i>
	<i>Eumetopias jubatus</i>
<i>P. hispidus</i>	<i>Hydrurga leptonyx</i>
	<i>Halichoerus grypus</i>
<i>P. measuresae</i>	<i>Pusa hispida</i>
	<i>Mirounga angustirostris</i>
<i>P. gullandae</i>	<i>Phoca vitulina richardii</i>
	<i>Arctocephalus pusillus doriferus</i>
<i>P. normani</i>	<i>A. forsteri</i>
	<i>A. tropicalis</i>
	<i>A. australis</i>

Fonte: (MEASURES, 2001; RAGA *et al.*, 2009).

O ciclo de vida dos parasitos pulmonares em pinípedes não é bem conhecido. Entretanto, Dailey (1970) identificou três estágios infecciosos de *P. decorus*, a partir de estudos experimentais, que se encontram ilustrados na Figura 2. Observou-se que após peixes Opaleye (*Girella nigricans*) de áreas não contaminadas ingerirem fezes de leões-marinhos-californianos, *Zalophus californianus*, contendo larvas de primeiro estágio, outros dois estágios larvais do parasito se desenvolveram no organismo do peixe em um período de 36 dias. Aparentemente, a primeira muda ocorreu 12–15 dias após a infecção, quando a L2 foi observada nas camadas musculares do intestino do peixe. A segunda muda, L3, ocorreu 25-36 dias após a ingestão das fezes contaminadas, no tecido adiposo mesentérico e na serosa intestinal do peixe. Ao alimentar um leão-marinho-californiano com o peixe infectado foi observado o aparecimento de L1 nas fezes 21 dias depois, indicando que o peixe aparentemente serviu de hospedeiro intermediário, não necessitando de hospedeiros paratênicos. O parasito é ingerido pelo hospedeiro definitivo quando este se alimenta com o peixe infectado, então a L3 migra através do sistema digestório para o intestino, atinge a

circulação sanguínea e migra ao tecido pulmonar onde realizará a muda para L4 e finalmente atingirá a maturidade (MEASURES, 2001; RHYAN *et al.*, 2018). As fêmeas são vivíparas e realizam as L1 no tecido pulmonar. Como as larvas são vistas no muco e fezes, presume-se que as larvas se movem passivamente por ação mucociliar, em direção ao estômago e vão para o meio externo através das fezes (MEASURES, 2001). Aparentemente, as infecções permanecem patentes por até um ano (SWEENEY; GILMARTIN, 1974) e podem persistir por anos (DAILEY; 1986). Hill (1971) expôs um filhote de leão-marinho-Steller (*Eumetopias jubatus*) à L3 de *P. decorus* proveniente de um *G. nigricans* infectado experimentalmente. Aos 60 dias após a infecção, o leão-marinho morreu de pneumonia. Estudos recentes constataram a partir de experimentos em peixes, possíveis hospedeiros intermediários de *P. gymnurus*: *Agonus cataphractus*, *Pleuronectes platessa*, e *Limanda limanda* (LEHNERT *et al.*, 2010, OSINGA, 2015).

Figura 2 - Ciclo do parasito *Parafilaroides decorus*, descrito no hospedeiro definitivo leão-marinho-californiano (*Zalophus californianus*) e no hospedeiro intermediário Opaleye (*Girella nigricans*).



Fontes: esquema ilustrativo adaptado de Dailey (1970) e realizado com imagens de leão-marinho-californiano e peixe Opaleye retiradas de Google imagens (<https://br.depositphotos.com/> e www.pinterest.com.br respectivamente), e estágios parasitários de Dailey (1970) e Gosselin; Measues (1997).

Diferente dos aspectos epidemiológicos da infecção por *O. circumlitus* que são amplamente conhecidos por acometer pinípedes com menos de um ano de idade (ONDERKA, 1989), infecções por *Parafilaroides* spp. foram relatadas em todas as faixas etárias (KONTRIMAVICHUS; DELYAMURE, 1979; ONDERKA 1989; GOSSELIN *et al.* 1998), embora haja uma predominância de relatos da infecção em animais jovens, com menos de um ano de idade (GREIG *et al.*, 2005). Entretanto esses fatores não podem ser levados em consideração para determinação de uma predileção por faixa etária, uma vez que a maioria dos animais de vida livre estudados por captura ou encalhe é jovem (MEASURES, 2001).

Os aspectos clínicos e patológicos dependem da intensidade da infecção e susceptibilidade do hospedeiro, que variam de inexistentes ou leves, principalmente quando o hospedeiro é bem adaptado, a graves com sequelas secundárias quando já se encontram com a imunidade comprometida (MEASURES, 2001; SEGUEL *et al.*, 2018b; REISFELD *et al.*, 2019). É difícil diferenciar os sinais clínicos específicos causados por *Parafilaroides* spp., mas leões-marinhos-californianos aparentemente abrigam apenas *P. decorus* e os sinais variam de ausentes a graves e incluem tosse, na qual a larva é expelida pelas vias aéreas e dificuldade em se alimentar (FLEISCHMAN; SQUIRE, 1970; MEASURES, 2001; MEASURES, 2018). Nas infecções precoces ou leves, o aumento da frequência respiratória com tosse produtiva leve (SWEENEY, 1986) pode progredir para dificuldade respiratória, vômitos, perda de peso e complicações graves em casos avançados (MORALES; HELMBOLDT, 1971). Os sinais clínicos podem incluir anorexia, emaciação, dispneia, broncoespasmo, tosse com expectoração de muco e sangue. Após a auscultação do tórax, sons de estertores, crepitações e chiados podem ser ouvidos, embora uma ausência de sons possa indicar oclusão total dos brônquios. A mucosa pode apresentar palidez ou cianose (SWEENEY, 1986). Pinípedes de vida livre com infecções moderadas a graves podem ser menos capazes de mergulhar ou procurar alimentos de forma eficiente, exigindo tempos de recuperação mais longos na superfície, aumentando assim o risco de predação (MEASURES, 2001). E por fim, embora infrequente, esses parasitos podem acometer de forma fatal (STROUD; DAILEY, 1978; SEGUEL *et al.*, 2018b; REISFELD *et al.*, 2019).

Os parasitos adultos são pequenos, delicados, finos e encontram-se enrolados em meio à lesões nodulares no parênquima pulmonar e subpleural, o que dificulta serem retirados de forma íntegra e determinar dados de intensidade da infecção. Estes dados muitas vezes são obtidos apenas por análise histológica, forma não tão segura já que apenas

pequenos fragmentos de todo o órgão são analisados (ONDERKA, 1989; GOSELIN *et al.*, 1998; MEASURES, 2001). Em animais vivos é possível detectar a infecção pela técnica de Bermann modificada, através de amostras do muco nasal, pulmonar ou fezes, entretanto esta só detecta infecções patentes, além de apresentar pouca sensibilidade e especificidade e não ser quantitativa (BERGERON *et al.*, 1997; MEASURES, 2001). Uma opção é a técnica de PCR em tempo real, recentemente estudada no muco e fezes de leões-marinhos infectados com *P. decorus* (WILLIAMS *et al.*, 2020).

Macroscopicamente, *Parafilearoides* spp. podem afetar todo o parênquima pulmonar, estando contidos em nódulos (reação granulomatosa) que apresentam um ou mais parasitos (FLEISCHMAN; SQUIRE, 1970; ONDERKA, 1989; GOSELIN *et al.* 1998; MEASURES, 2001) ou confinados a alvéolos e bronquíolos (DAILEY, 1970; STROUD; DAILEY, 1978; NICHOLSON; FANNING, 1981; RHYAN *et al.*, 2018). Alguns parasitos estão nos brônquios (KONTRIMAVICHUS; DELYAMURE, 1979) e septos interlobulares (ONDERKA, 1989; REISFELD *et al.*, 2019). Outros autores observaram ainda estes parasitos nos pulmões e artérias pulmonares, além do fígado, timo e linfonodos (SCHUMACHER *et al.*, 1990; SEGUEL *et al.*, 2018b).

Histologicamente são pequenos e comumente encontrados gravídicos em secções transversais nos alvéolos, diferente do único outro nematódeo encontrado nos pulmões de otarídeos, *Otostrongylus circumlitus*, que é maior e está localizado em grandes bronquíolos e brônquios (MEASURES, 2001). *Parafilearoides* spp. frequentemente são vistos em grupos de três a cinco nematódeos (RHYAN *et al.*, 2018). Particularmente eles apresentam cutícula estreita e lisa, musculatura polimiariana/celomeriana, trato intestinal revestido por células vacuolizadas e com bordas em escova (GARNER *et al.*, 1997; DAILEY, 2009). O útero é frequentemente revestido por larvas enroladas (GARNER *et al.*, 1997; SEGUEL *et al.*, 2018b). *Parafilearoides* spp. observados nos pulmões de pinípedes podem apresentar cocobacilos evidenciados pela coloração de Giemsa e Azul de Toluidina em associação com a superfície apical das células que revestem o útero de algumas fêmeas, no lúmen intestinal, espermatozóides e larvas em desenvolvimento (GARNER *et al.*, 1997; RHYAN *et al.*, 2018). As lesões pulmonares em pinípedes infectados por *Parafilearoides* spp. variam de leve a acentuadas e são caracterizadas principalmente por infiltrado inflamatório broncointersticial composto por macrófagos, linfócitos e/ou neutrófilos, com possíveis formações de microabscessos ou granulomas, localizados predominantemente ao redor do parasita (DELYAMURE *et al.* 1980; NICHOLSON; FANNING, 1981; ONDERKA, 1989;

JACOBUS *et al.*, 2016; REISFELD *et al.*, 2019). Onderka (1989) sugeriu que as inflamações leves indicam um parasita bem adaptado ao seu hospedeiro. Frequentemente, numerosos nematódeos adultos e larvas encontram-se em áreas enfisematosas (REISFELD *et al.*, 2019). Podem ser observadas ainda áreas com hemorragia, edema, atelectasia, fibrina, fibrose e congestão, secundários às lesões ocasionadas pelos parasitos (DELYAMURE *et al.* 1980; NICHOLSON; FANNING 1981; JACOBUS *et al.*, 2016; REISFELD *et al.*, 2019). A migração dos parasitos pelos vasos sanguíneos pulmonares faz parte do ciclo dos mesmos, o que pode ocasionar fatal trombose, infarto e endarterite (SEGUEL *et al.*, 2018b). Parasitos adultos vivos no parênquima pulmonar parecem estimular pouca reação inflamatória em animais saudáveis. Os casos mais severos apresentaram como consequência obstrução de vias aéreas e enfisema alveolar com distorção e ruptura septal (MEASURES, 2001; JACOBUS *et al.*, 2016).

Devido ao grande número de animais parasitados por *Parafularoides* spp., que também apresentavam infecções bacterianas por *Brucella* spp., foi sugerido que esses parasitos possivelmente carregavam tais agentes infecciosos. As bactérias carregadas por *Parafularoides* spp., podem agravar o estado de saúde dos pinípedes infectados, acentuando a pneumonia e causando sintomatologias relacionadas a outros órgãos (GARNER *et al.* 1997; RHYAN *et al.*, 2018). Tal enfermidade parasitária também foi associada a agentes virais como calicivirus (BARLOUGH *et al.*, 1986), morbillivirus (MUNRO *et al.*, 1992), e herpesvírus (REISFELD *et al.*, 2019).

2.2.2 *Otostrongylus circumlitus*

Otostrongylus circumlitus (Railliet 1899; de Bruyn 1933) (Metastrongyloidea: Crenosomatidae) é um helminto de distribuição mundial que se encontra predominantemente nas vias aéreas de pinípedes. A distribuição é Holártica e Circumpolar, porém os estudos são mais numerosos no Hemisfério Norte (MEASURES, 2001).

A infecção por *O. circumlitus* na foca-do-porto (*Phoca vitulina richardsi*) e no elefante-marinho-do-norte (*Mirounga angustirostris*) são consideradas importantes devido a frequência e severidade do acometimento (GULLAND *et al.*, 1997). Entretanto, a infecção também foi relatada em focas-cinza (*Halichoerus grypus*), focas-anelares (*Phoca hispida*), leão-marinho-californiano e lobo-marinho-antártico (BAKER; MCCANN, 1989; ONDERKA, 1989; KELLY *et al.*, 2005; BARNETT *et al.*, 2019).

Semelhante aos *Parafilaroides* spp., estudos experimentais indicam que o ciclo de vida do parasita compreende seu desenvolvimento nos hospedeiros intermediários, que geralmente são peixes, e realizam maturação nos hospedeiros definitivos, os pinípedes. A migração da larva de primeiro estágio ocorre a partir dos pulmões dos pinípedes, por meio de movimentos ciliares do sistema respiratório para o trato gastrointestinal, onde são deglutidos e eliminados nas fezes. Os peixes então, ao se alimentarem com esses excrementos se contaminam, desenvolvem a larva nos seus tecidos que será maturada nos pinípedes ao ingerirem suas presas. Os parasitos ingeridos chegam aos pulmões pela circulação sanguínea (MEASURES, 2001). Bergeron e colaboradores (1997) identificaram o peixe Solha americana (*Hippoglossoides platessoides*) como um hospedeiro intermediário de *Otostrongylus circumlitus* (Railliet, 1899) em uma foca cinzenta, *Halichoerus grypus*. Lehnert *et al.* (2010) ao infectar experimentalmente o peixe Turbot (*Psetta máxima*) com *Otostrongylus circumlitus*, evidenciou seu desenvolvimento nos tecidos desta presa de cetáceos e pinípedes do Hemisfério Norte. Não há dados sazonais, no entanto, sugere-se que a infecção ocorra após do desmame, indicando transmissão horizontal através da cadeia alimentar (ONDERKA, 1989; GOSSELIN *et al.* 1998).

Predominantemente os animais parasitados apresentam menos de um ano, provavelmente devido à imunocompetência referente à idade, visto que animais adultos têm infecções pelo nematódeo com menos frequência, sendo considerado raro em animais acima de 25 anos. Os animais mais velhos, quando apresentam infecção decorrente do parasita, geralmente também são acometidos por outras doenças crônicas (ONDERKA, 1989; MEASURES, 2001).

Os sinais clínicos variam nas diferentes espécies de hospedeiros definitivos que são acometidas, assim como a carga parasitária e a capacidade de resposta do hospedeiro a infecção (ELSON-RIGGINS *et al.*, 2001). Acredita-se que esses parasitos influenciam na saúde e na capacidade de mergulho afetando a capacidade de alimentação, crescimento e sobrevivência do hospedeiro (ONDERKA, 1989; BERGERON *et al.*, 1997; GOSSELIN *et al.*, 1998). Frequentemente os animais infectados estão acometidos por mais de um parasita, como *Parafilaroides* spp. ou *Acanthocheilonema spirocauda*, e devido a isso é difícil atribuir sinais clínicos relacionados a um único parasita. A infecção geralmente é leve a moderada e os sinais clínicos podem ser inaparentes ou discretos, mas a infecção pode ser severa, com consequentes sinais sistêmicos e respiratórios, e finalmente morte. De maneira

geral, os sinais são associados a bronquite, broncopneumonia e arterite pulmonar (ONDERKA, 1989; GULLAND *et al.*, 1997).

Macroscopicamente a lesão pulmonar é caracterizada por broncopneumonia, com grandes nematódeos à secção pulmonar, mas o parasita também pode estar presente e causar lesão na artéria pulmonar, traqueia, ventrículo direito e menos frequentemente nos vasos sanguíneos hepáticos (GULLAND *et al.*, 1997; MEASURES, 2001).

Microscopicamente, há broncopneumonia multifocal com infiltrado de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, além de fibrose, depósito de fibrina, hiperplasia de glândulas mucosas e células caliciformes. Pode haver também necrose dos septos ou epitélio, oclusão de vias aéreas e artérias, acúmulo de muco nas vias respiratórias e coagulação intravascular disseminada. Os vasos podem apresentar espessamento com projeções papilares e reação Splendore-Hoeppli (ONDERKA 1989; BARNETT *et al.*, 2019). De acordo com Dungworth (1985), a inflamação dos brônquios grandes têm menos significado clínico do que a inflamação dos pequenos brônquios e dos bronquíolos. Nessas regiões mais profundas dos pulmões, as vias aéreas podem ser facilmente ocluídas por exsudato abundante e estão distantes demais para um reflexo eficaz da tosse.

Assim como *Parafilaroides* spp., *O. circumlitus* também foi associado a outros agentes infecciosos, em infecções bacterianas ou virais como o morbillivírus phocine (GULLAND *et al.* 1997; MEASURES, 2001). Parasitos como *O. circumlitus* e *Parafilaroides decorus* podem ser vetores de vírus ou bactérias como *Brucella* spp. (GARNER *et al.* 1997) e calicivirus (SMITH *et al.* 1980).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Objetiva-se com este estudo identificar e caracterizar as pneumonias parasitárias em lobos-marinhos-sulamericanos encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul no período de 2019 a 2020.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Com dados de necropsia e histopatologia, identificar se a parasitose pulmonar foi responsável pela causa *mortis* dos lobos-marinhos estudados;
- Identificar a intensidade do acometimento pulmonar dos lobos-marinhos estudados pelos nematódeos encontrados.
- Descrever e classificar pneumonias pulmonares causadas por nematódeos, baseando-se nos achados macroscópicos e microscópicos, assim como obter dados histopatológicos da morfologia dos parasitos realizando sua identificação.
- Identificar as espécies de nematódeos que acometeram os lobos-marinhos, através de ferramentas moleculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E SELEÇÃO DOS ANIMAIS ESTUDADOS

Durante os meses de junho a setembro de 2019 e julho a setembro de 2020 foram realizados monitoramentos semanais, totalizando quatro por mês, no litoral Norte do Rio Grande do Sul, ao longo de 55,32 km, entre as praias de Tramandaí (30°00'20.6"S 50°07'54.8"W) ao final de Palmares do Sul (30°28'40.4"S 50°19'18.9"W), passando pelo Balneário Pinhal e Quintão. No total dos 23 monitoramentos, foram percorridos 1.272,36 km de praia. O deslocamento foi realizado com o carro oficial do IBAMA (SISBIO: 61987-1), o qual realizou parceria de pesquisa científica e monitoramento de praia, em uma velocidade média de 30 km/h, propiciando a visualização de lobos-marinhos vivos e mortos, na faixa de areia e no mar. Os animais foram classificados quanto o estado de conservação de acordo com Geraci; Lounsbury (2005). Foram encontrados, entre vivos e mortos, 77 lobos-marinhos no litoral percorrido. Esses animais foram classificados conforme seus respectivos *codes*, que representa a estado de preservação do indivíduo em vida ou após a morte (Tabela 2). Desses, 13 animais estavam vivos (*code* 1) e 38 estavam em estado de decomposição avançada (*code* 4 e 5). Vinte e seis exemplares foram considerados aptos a serem coletados e examinados (*code* 2 e 3). Os animais vivos foram fotografados de longe e observados com a finalidade de constatar integridade física e comportamental. Os indivíduos classificados como *code* 2 e 3, ou seja, que não apresentavam estado de autólise avançada, foram identificados quanto a espécie através das características de pelagem e dentição (REPENNING *et al.*, 1971; BRUNNER, 2004), registradas suas localizações geográficas a partir de um aparelho de GPS monitorado por satélite (AndLocation), fotografados, coletados e encaminhados para o Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Tabela 2 - Classificação do estado de conservação de animais marinhos em *codes*
(continua)

Codes	Estado de preservação do animal
1	Animal vivo.
2	Cadáver fresco, morto recentemente.

Tabela 3 - Classificação do estado de conservação de animais marinhos em *codes*
(continuação)

3	Cadáver decomposto com órgãos preservados, com leve a moderada autólise.
4	Cadáver em avançado estado de decomposição, com órgãos modificados quanto à arquitetura padrão e avançada autólise e putrefação.
5	Cadáver mumificado ou esqueletizado.

Fonte: (GERACI; LOUNSBURY, 2005)

4.2 ANÁLISE DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS

Cada lobo-marinho coletado apresentou um número de registro de necropsia, com a identificação da espécie, sexo e localização de coleta. As medidas de cada animal foram mensuradas de forma retilínea da extremidade do focinho até a ponta da cauda (PONCE DE LÉON, 1983) e do começo da nadadeira caudal ao fim da mesma. Com a impossibilidade da coleta do canino superior para a determinação da idade através das linhas incrementais da dentina, a faixa etária foi estipulada a partir da medição dos animais. Os animais com 100 a 154 cm de comprimento foram considerados subadultos, abaixo de 100 cm eram juvenis e acima de 154 cm eram adultos (PONCE DE LÉON, 1983). A condição corporal foi realizada pela inspeção do tecido adiposo da região do processo xifoide e classificada em ruim, moderado ou bom (LYONS *et al.*, 1997; KATZ *et al.*, 2012). Na necropsia foram realizados exame externo e posteriormente à abertura das cavidades, exame interno, com a observação e registros escrito e fotográfico das alterações anatomo-patológicas. Os tratos respiratórios foram analisados minuciosamente, realizando-se uma incisão na traquéia, brônquios e bronquíolos o mais distal possível, assim como cortes transversais e longitudinais no parênquima pulmonar atentando-se à presença de parasitos. As outras cavidades e órgãos foram analisadas de acordo com técnicas convencionais de necropsia. Fragmentos de pele, músculo esquelético, baço, pâncreas, intestinos delgado e grosso, linfonodos, fígado, estômago, adrenais, rins, bexiga, gônadas, útero, coração, pulmões, timo, tireóide, e encéfalo foram coletados para análise histopatológica.

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os tecidos coletados para análise histopatológica foram fixados por 72 horas em formalina a 10%, tamponada, e processados rotineiramente. Para cada animal, foram coletados também quatro fragmentos de diferentes lobos pulmonares, selecionados por alterações macroscópicas ou, se ausentes, aleatoriamente para a análise histológica, totalizando 104 fragmentos. Após o processamento, foram obtidos cortes dos tecidos parafinados de 3 a 5 µm de espessura, corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e montados com resina sintética diluída em tolueno. As lâminas foram analisadas no microscópio óptico e descritas. E as alterações pulmonares foram classificadas quanto ao as células inflamatórias e a quantificações das lesões.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Dois fragmentos pulmonares de cada um dos 26 lobos-marinhos-sulamericanos foram coletados e congelados em microtubos para a realização de análises moleculares em conjunto com o Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais da Faculdade de Veterinária (UFRGS). Para a extração do DNA genômico foram processados 25mg das amostras de tecidos pulmonares de forma individual utilizando o kit comercial Pure Link® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen TM, Carlsbad, CA, EUA), conforme as recomendações do fabricante. Para a quantificação do DNA, com a finalidade de estabelecer um padrão quantitativo de DNA em todas as amostras extraídas, foi utilizado um espectrofotômetro comercial NanoDrop™. Amostras que continham aproximadamente 100-150 ng/µL de DNA, bem como, adequada relação 260/280 foram utilizadas e as que tiveram menos de 100 ng/µL de DNA foram corrigidas ou utilizadas em maior quantidade na realização da PCR.

4.5 ANÁLISE MOLECULAR POR REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE

As análises moleculares foram realizadas pela técnica de PCR convencional, utilizando dois diferentes genes na pesquisa dos parasitos pulmonares da Superfamília Metastrongyloidea, que compreende os dois principais gêneros que acometem os otarídeos, *Otostrongylus circumlitus* e *Parafilaroides* sp., pertencentes as famílias Crenosomatidae e Filaroididae respectivamente (Tabela 2). Para a detecção da Superfamília Metastrongyloidea utilizou-se *primers* que amplificam aproximadamente 560 bp do gene Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2) de acordo com Lehnert *et al.*, (2010), com os *primers foward*

(*pf*) e *primers reverse* (*pr*), respectivamente: 5' GCAGACGCTTAGAGTGGTGAAA3' / 5'ACTCGCCGTTACTAAGGGAATC3'.

Para amplificação do gene Citocromo Oxidase Mitocondrial Subunidade 1 (*COX-I*) foram utilizados os *pf*5'AGTTCTAATCATAARGATATYGG3' e *pr*5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3' de acordo com Dailey (2009).

Foram adicionados em cada reação 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 IM de cada dNTP, 1 µL de cada *primer* (*pf* e *pr*), 0,26µL de Taq Platinum e 2 µL de DNA molde em um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Simpli Amp™ Thermal Cycler (Applied Biosystem®, Foster City, CA, EUA) pelas seguintes condições: 95°C por 5 minutos; seguidos por 30 ciclos de 95° por 45 segundos, 46°C (*COX-I*) e 56°C (*ITS-2*) por 30 segundos, e 72°C por 45 segundos; e a extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, posteriormente visualizados em um transiluminador LED Kasvi® (São José dos Pinhais, PR, Brasil).

4.6 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

As amostras positivas para os *primers* utilizados neste trabalho e que eram igualmente positivas para nematódeos na histopatologia foram selecionadas para a purificação e posterior sequenciamento.

Os amplicons foram purificados com o kit de purificação Invitrogen™ PureLink™ Quick PCR (Thermo Fisher Scientific Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA) e sequenciados em um sequenciador automático (Sanger). As sequências geradas foram submetidas à análise BLAST® (ALTSCHUL *et al.*, 1990) para determinar as semelhanças no *GenBank*®. Na árvore filogenética 1, as sequências parciais obtidas no presente estudo foram alinhadas com o gene ITS-2 correspondente a 30 sequências da espécie *P. decorus* e semelhantes, estas recuperadas do *GenBank*® usando Clustal / W v.1.8.1 (THOMPSON *et al.*, 1994). Uma árvore filogenética de máxima verossimilhança usando o modelo Tamura-3 parâmetro com Gamma distribuição (+G) foi gerada usando Mega 10 software com 100 réplicas de bootstrap. O modelo de substituição foi selecionado usando Software Mega 7 (KUMAR *et al.*, 2018) de acordo com a menor informação Bayesian Information Criterion score. Na árvore filogenética 2, as sequências parciais do presente estudo foram alinhadas com o gene ITS-2 correspondente a 19 sequências da espécie *P. decorus* e semelhantes, estas também foram recuperadas do *GenBank*® usando Clustal / W v.1.8.1 (THOMPSON

et al., 1994). Uma árvore filogenética de máxima verossimilhança usando o modelo Hasegawa-Kishino-Yano com Gamma distribuição (+G) foi gerada usando Mega 10 software com 100 réplicas de bootstrap, e o modelo de substituição foi selecionado usando Software Mega 10 (KUMAR *et al.*, 2018) de acordo com a menor informação Bayesian Information Criterion score.

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Uma lâmina de cada caso igualmente positivo na histologia e no sequenciamento para *Parafilaroides* sp. foi selecionada para análise imuno-histoquímica para detecção de antígenos *Brucella* spp. associados aos parasitos, empregando um anticorpo policlonal primário produzido em coelhos (não comercial) anti-*Brucella abortus*. O método realizado foi o polímero universal. A recuperação antigênica foi obtida com Proteinase K (Dakocytomation, Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos e a imuno-histoquímica foi revelada com o cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC; Sigma, St. Louis, MO, EUA). Lâminas de casos conhecidos de infecção pulmonar em bovinos por *Brucella abortus* foram usadas como controle positivo.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS GERAIS

Todos os lobos-marinhos coletados eram da espécie *Arctocephalus australis* (Figura 3). Catorze animais (53,8%) foram classificados como subadultos, oito como juvenis (30,8%) e quatro como adultos (15,4%). Quinze animais eram machos (57,7%) e 11 eram fêmeas (42,3%). As estimativas de idade e o sexo dos animais estão especificados na Tabela 3.

Figura 3 - Lobo-marinho-sulamericano (*Arctocephalus australis*) observado nos trabalhos de campo deste estudo.



Fonte: arquivo pessoal (fotografia realizada por Yasmin Daoualibi Vianna Siqueira).

5.2 CAUSA MORTIS

As alterações macroscópicas e microscópicas foram analisadas e a *causa mortis* foi determinada para cada lobo-marinho e encontra-se detalhada na Tabela 3. Das causas, a maioria foi diagnosticada como traumatismos de diferentes naturezas, seguida de inanição. Os lobos-marinhos-sulamericanos analisados que não apresentaram alterações macroscópicas e/ou microscópicas representativas de possíveis condições causadoras de morte, foram classificados como inconclusivos. Nenhum dos 26 lobos-marinhos-

sulamericanos estudados no presente trabalho apresentou características morfológicas compatíveis com insuficiência respiratória e, contudo, a parasitose pulmonar não foi relacionada a causa da morte. Comumente foram observados parasitos respiratórios e gastrointestinais nos exames de necropsia e histologia e também foram adicionados à Tabela 3.

Tabela 4 - Relação de sexo, faixa etária, *causa mortis* e parasitos metazoários encontrados nos lobos-marinhos-sulamericanos (*Arctocephalus australis*) coletados no litoral norte do Rio Grande do Sul para este estudo.

(continua)

ID	Sexo	Faixa etária	<i>Causa mortis</i>	Parasitos encontrados
1	M	Subadulto	Traumatismo corto-contundente	<i>Parafilaroides</i> spp., <i>Corynosoma</i> spp.
2	F	Subadulto	Inanição	<i>Corynosoma</i> spp.
3	M	Juvenil	Politraumatismo contundente	<i>Strongyloides</i> spp.
4	M	Juvenil	Ruptura esofágica com miosite abscedativa secundária (<i>Streptococcus</i> sp.)	<i>Parafilaroides</i> sp., Anisquídeo
5	M	Subadulto	Inconclusivo	<i>Parafilaroides</i> spp., Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp., <i>Strongyloides</i> spp.
6	F	Subadulto	Trauma contundente e perfuro-cortante	Anisquídeo, <i>Diphyllobothrium</i> spp., <i>Corynosoma</i> spp.
7	M	Juvenil	Inanição	<i>Corynosoma</i> spp.
8	F	Subadulto	Trauma corto-contundente	<i>Corynosoma</i> spp. <i>Parafilaroides</i> spp., Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp.
9	F	Subadulto	Inconclusivo	<i>Parafilaroides</i> spp., Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp.
10	M	Juvenil	Inconclusivo	Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp., <i>Diphyllobothrium</i> spp.
11	F	Subadulto	Inconclusivo	<i>Parafilaroides</i> spp., Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp.
12	F	Subadulto	Inanição	Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp. <i>Parafilaroides</i> spp.
13	M	Juvenil	Trauma corto-contundente	Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp., <i>Diphyllobothrium</i> spp., <i>Parafilaroides</i> spp.,
14	M	Juvenil	Trauma corto-contundente	<i>Corynosoma</i> spp., <i>Diphyllobothrium</i> spp.
15	F	Subadulto	Inconclusivo	<i>Parafilaroides</i> spp., Anisquídeo,

Tabela 5 - Relação de sexo, faixa etária, *causa mortis* e parasitos metazoários encontrados nos lobos-marinhos-sulamericanos (*Arctocephalus australis*) coletados no litoral norte do Rio Grande do Sul para este estudo.

(continuação)				
16	F	Adulto	Inconclusivo	NI
17	M	Subadulto	Inconclusivo	<i>Parafilaroides</i> spp.
18	M	Juvenil	Trauma corto-contundente	Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp.
19	F	Subadulto	Inanição	Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp.
20	M	Subadulto	Inanição	<i>Parafilaroides</i> spp., <i>Corynosomaspp.</i>
21	M	Juvenil	Traumatismo corto-contundente	<i>Corynosoma</i> spp.
22	M	Adulto	Inanição	<i>Corynosoma</i> spp.
23	F	Adulto	Inconclusivo	Anisquídeo, <i>Corynosoma</i> spp.
24	M	Adulto	Inconclusivo	<i>Parafilaroides</i> spp., <i>Corynosoma</i> spp., <i>Diphyllobothrium</i> spp.
25	F	Subadulto	Inanição	<i>Corynosoma</i> spp.
26	M	Subadulto	Inanição	<i>Corynosoma</i> spp., <i>Diphyllobothrium</i> spp.

Fonte: arquivo pessoal. ID = identificação do animal; M = macho; F = fêmea; NI = não identificado macroscopicamente.

5.3 ALTERAÇÕES PULMONARES

Um lobo-marinho-sulamericano apresentou alterações pulmonares macroscópicas compatíveis com pneumonia por *Parafilaroides* spp. Foram observadas, em todos os lobos pulmonares, áreas nodulares circunscritas, brancas e subpleurais, com discreta elevação, que variavam de 0,5 cm a 2,5 cm de diâmetro, além de moderado edema difuso e enfisema multifocal a coalescente. Nos outros animais analisados havia lesões interpretadas como inespecíficas com edema pulmonar, enfisema multifocal e pequenos focos de atelectasia.

Em 12 dos 26 lobos-marinhos analisados foi possível identificar estruturas parasitárias no parênquima pulmonar através da análise histológica. Foram observados cortes transversais e longitudinais de nematódeos, que variavam de 30 µm a 130 µm. Eram observados grupos de dois a oito parasitos, que exibiam cutícula eosinofílica delgada, cavidade pseudocelomática, musculatura polimiariana/celomiariana, hipoderme delgada, cordas laterais e sistema digestório evidente ora com esôfago, ora com intestino multinucleado. Eram dióicos, sendo o macho menor e bem mais raro de se observar do que a

fêmea. As fêmeas apresentavam ovários, óvulos e útero com ou sem ovos larvados com filárias. Por vezes eram observados depósitos de espermatozóides nas fêmeas.

Os parasitos estavam localizados predominantemente no lúmen alveolar (9 casos), ocasionando numerosas áreas enfisematosas adjacentes, de extensão variável que geralmente eram relativas à quantidade de nematódeos. Predominantemente estas áreas enfisematosas associadas à estruturas parasitárias eram visualizadas nas periferias dos lobos pulmonares, próximo à pleura visceral, no entanto, sua distribuição era multifocal e aleatória. Em torno dessas áreas de enfisema foram observados com frequência focos de atelectasia pulmonar compressiva. Além do espaço alveolar, os parasitos também foram observados ocasionalmente em bronquíolos (5 casos) e brônquios (2 casos), os quais também apresentavam áreas enfisematosas adjacentes, bem como, acúmulo de discreta quantidade de material mucinoso no lúmen. Em quatro animais foram observadas áreas circunscritas multifocais compostas por acentuado infiltrado de macrófagos epitelioides e espumosos, e em menor quantidade eosinófilos e fibrina, que envolviam parasitos em diversos estágios de degeneração. Externamente a estas estruturas havia moderado infiltrado de linfócitos e plasmócitos, envolto por feixes de tecido conjuntivo colagenoso. Nos outros oito casos, havia discreto infiltrado intersticial de linfócitos adjacente aos nematódeos adultos. Era frequente grupos de parasitos sem nenhuma reação inflamatória associada. Outras lesões observadas frequentemente nos pulmões eram de congestão e edema alveolar. Trombose vascular, pulmonar, multifocal e moderada foi observada em dois animais parasitados.

5.4 EXAME MOLECULAR (PCR)

Das 26 amostras pulmonares testadas na PCR com os primers para metastrongilídeos, nove foram positivas para ITS-2, e 14 foram positivas para *COX-1*. Onze amostras apresentaram resultados positivos tanto na histologia, as quais eram morfológicamente compatíveis com metastrongilídeos, quanto em pelo menos um gene na PCR e foram selecionadas para purificação e seqüenciamento. As amostras selecionadas estão especificadas na Tabela 4.

Tabela 6 - Relação de positividade entre histopatologia e reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Metastrongyloidea* nos lobos-marinhos deste estudo.

ID	ITS-2	COX-1	Histopatologia	Sequenciar
1	N	P	Sim	x
2	N	N	Não	
3	P	P	Não	
4	P	P	Sim	x
5	N	P	Sim	x
6	P	P	Não	
7	N	N	Não	
8	N	P	Não	
9	N	P	Sim	x
10	P	N	Sim	x
11	P	N	Sim	x
12	N	P	Não	
13	P	N	Sim	x
14	N	N	Sim	
15	N	P	Sim	x
16	N	N	Não	
17	P	P	Sim	x
18	N	N	Não	
19	N	P	Não	
20	P	P	Sim	x
21	N	N	Não	
22	N	N	Não	
23	P	P	Não	
24	N	P	Sim	x
25	N	N	Não	
26	N	N	Não	

Fonte: dados obtidos em parceria com os laboratórios SPV e Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais da UFRGS. P = positivo; N = negativo; P** = banda dupla; P# = banda fraca.

5.5 Sequenciamento e filogenia

As amostras que apresentaram banda fraca e banda dupla não foram selecionadas para sequenciamento. Seis amostras analisadas para o gene ITS-2 foram compatíveis com a espécie *Parafilaroides* sp. registrada no *Genbank* com os números de acesso KP402084 e KP402085, por Jacobus *et al.* (2016) e estão especificados na Tabela 5. O sequenciamento das oito amostras que foram processadas com o gene *COX-1* apresentaram compatibilidade com a amplificação do gene do hospedeiro.

Tabela 7 - Genbank BLAST e resultados para a região ITS-2 dos *Parafilaroides* sp.

ID	Tamanho do fragmento (bp)	Porcentagem de similaridade do Blast	Porcentagem de cobertura
4	568	99,82% com <i>Parafilaroides</i> sp. Genbank: (KP402084)	99%
10	623	99,65% com <i>Parafilaroides</i> sp. Genbank: (KP402084)	90%
11	648	99,82% com <i>Parafilaroides</i> sp. Genbank: (KP402085)	87%
13	578	99,27% com <i>Parafilaroides</i> sp. Genbank: (KP402084)	94%
17	576	100% com <i>Parafilaroides</i> sp. Genbank: (KP402084)	92%
20	586	99,65% com <i>Parafilaroides</i> sp. Genbank: (KP402084)	96%

Fonte: arquivo pessoal associado a informações retiradas do site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

As duas árvores realizadas nesse estudo demonstram uma estreita relação genética com as espécies de *Parafilaroides* spp.. As espécies identificadas neste trabalho formam um clado monofilético com os números de acesso KP402084 e KP402085 depositados por Jacobus *et al.* (2016).

5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os casos em que foram realizadas análises imuno-histoquímicas com anticorpo para *Brucella abortus* mostraram-se negativos, concluindo ausência de coco-bacilos *Brucella* spp. associados ao *Parafilaroides* spp. ou à pneumonia ocasionada por este parasito nos casos analisados.

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico de pneumonia parasitária por *Parafilaroides* sp. nos lobos-marinhos-sulamericanos do presente estudo foi estabelecido pela análise histopatológica, PCR e sequenciamento. Macroscopicamente, *Parafilaroides* spp. são descritos como parasitos pequenos e delicados (JACOBUS *et al.*, 2016). Em um lobo-marinho-sulamericano dos 26 analisados, foram observadas alterações macroscópicas comumente descritas nesta enfermidade em pinípedes com parafilaroidíase com a formação de granulomas parasitários (MEASURES, 2001; REISFELD *et al.*, 2019). Outra apresentação macroscópica caracterizada pela formação de pequenas pústulas amareladas, contendo parasitos no interior foram descritas em pinípedes parasitados por *Parafilaroides* spp. (DAILEY, 1970; ECHENIQUE *et al.*, 2020). Segundo Dailey (1970), tal lesão era visualizada quando a infecção era massiva, e esses pequenos nódulos firmes, associados à formação de granulomas parasitários de exemplares degenerados (ONDERKA, 1989). Esse tipo de reação inflamatória ocorreria em animais mais susceptíveis a infecções, como em indivíduos debilitados e em situações de estresse (MEASURES, 2001). Assim como no presente estudo, grande parte dos casos de lesão parasitária pulmonares em lobos-marinhos é diagnosticada apenas microscopicamente (ONDERKA, 1989; MEASURES, 2001).

A caracterização histopatológica dos parasitos pulmonares identificados foi compatível com a Superfamília Metastrongyloidea. Os dois nematódeos pulmonares descritos em otarídeos, *Otostrongylus circumlitus* e *Parafilaroides* spp., são distinguidos principalmente pelas características inerentes às respectivas famílias, nas quais Crematosotidae apresenta bursa, enquanto em Filaroididae ela é ausente ou indistinta. *Otostrongylus circumlitus* é maior e por isso facilmente identificado na macroscopia, além de estar localizado em brônquios, bronquíolos e ocasionalmente em artérias. *Parafilaroides* spp. é menor e tem a localização predominantemente alveolar (ONDERKA, 1989; KELLY *et al.*, 2005). Microscopicamente *Otostrongylus circumlitus* apresenta aproximadamente 900µm, uma espessa cutícula e hipoderme (BARNETT *et al.*, 2019) enquanto *Parafilaroides* spp., assim como visto no presente trabalho, têm de 30 a 130µm de diâmetro, e uma cutícula lisa e fina (GARNER *et al.*, 1997). Além disso, a faixa etária de pneumonia por *Parafilaroides* spp. em pinípedes é variável e acomete animais de todas as faixas etárias, enquanto *Otostrongylus* é predominante em animais com menos de um ano de idade

(ONDERKA, 1989; ECHENIQUE *et al.*, 2020), o que pode explicar nossa ocorrência exclusiva de *Parafilaroides* sp., já que não encontramos animais com esta faixa etária neste estudo.

Os parasitos visualizados na histopatologia foram morfológicamente compatíveis com *Parafilaroides* spp., nematódeo previamente descrito como causador de doença respiratória em pinípedes, que pode resultar em altas taxas de mortalidade (DAILEY, 1970; ONDERKA, 1989; GARNER *et al.*, 1997; SIEBERT *et al.* 2007). Todavia, os pulmões dos lobos-marinhos-sulamericanos com infecção por estes agentes, normalmente apresentam lesões leves a moderadas, o que pode indicar uma co-evolução estratégica para evitar perda de hospedeiros (ONDERKA, 1989; SUKHDEO, 1994). Embora áreas de atelectasia e enfisema nos pulmões tenham sido observadas no presente trabalho, a associada redução do parênquima respiratório era leve. Foi observado ainda que a inflamação era mais severa e granulomatosa quando havia estruturas parasitárias degeneradas, igualmente visto por Onderka (1989). Embora tais infecções parasitárias pulmonares não tenham sido consideradas suficientemente graves para levar a morte, sugere-se que tais parasitos debilitem os pinípedes dificultando seu comportamento biológico de alimentação, desempenho de fuga de predadores e ameaças, e possibilitando infecções secundárias por outros agentes (MEASURES, 2001). Quatro animais infectados pelo *Parafilaroides* sp. morreram por causas traumáticas, e um por inanição, causas frequentes de morte em lobos-marinhos-sulamericanos, relatadas também por outros autores (SEGUEL *et al.*, 2011; SEGUEL *et al.*, 2013; KATZ *et al.*, 2012; AMORIM, 2014). No Brasil, e em outros países da América do Sul (fora das colônias reprodutivas) as causas traumáticas estão relacionadas à interação destes animais com cães, e interação antrópica, seja com a pesca ou por agressão (KATZ *et al.*, 2012; AMORIM *et al.*, 2014; BALDASSIN *et al.*, 2017). Dos nove casos diagnosticados como trauma nesse estudo, sete foram caracterizados em animais juvenis ou subadultos por traumatismo corto-contundente com frequentes perfurações na pele e lacerações na musculatura e tecidos adjacentes, que se assemelhava à mordida de cães. É compreendido que a intensidade da infecção parasitária interfere no diagnóstico, e os animais identificados com inanição neste estudo não apresentaram lesões suficientemente graves diferente do lobo-marinho-subantártico relatado por Reisfeld *et al.* (2019), que apesar de caquético e portador de outras doenças infecciosas, teve pneumonia por *Parafilaroides* sp. como causa da morte. Estudos descrevem frequentemente pinípedes parasitados por *Parafilaroides* sp. e acometidos a outros agentes etiológicos e foi sugerido ainda que este

nematódeo seja hospedeiro de agentes como *Brucella pinnipedialis* (REISFELD *et al.*, 2019; RHYAN *et al.*, 2018). No entanto, os lobos-marinhos-sulamericanos estudados por nós não apresentaram marcação na imuno-histoquímica para o anticorpo policlonal anti-*Brucella abortus* sugerindo que os nematódeos pulmonares desta região não têm relação com esta espécie bacteriana ou com outras espécies do mesmo gênero a partir de reação cruzada, possivelmente pela distância das colônias reprodutivas que estes animais foram encontrados.

Relatos anteriores de parafilaroidíase em pinípedes sugerem que a morte ocasionada pela pneumonia verminótica pode estar relacionada com obstrução das vias aéreas, além do acentuado enfisema com conseqüente distorção septal e ruptura (MEASURES, 2001; JACOBUS *et al.*, 2016; REISFELD *et al.*, 2019). Observamos neste estudo, nematódeos no lúmen de brônquios e bronquíolos, no entanto, não havia uma resposta inflamatória tão marcada comparado aos casos de estruturas parasitárias nos alvéolos, que frequentemente geravam como conseqüência áreas de enfisema e atelectasia.

Além da morfologia observada nas análises histopatológicas ter sido condizente com o gênero *Parafilaroides*, as análises filogenéticas demonstraram alta similaridade com as sequências KP402084 e KP402085 depositados como *Parafilaroides* sp. por Jacobus *et al.* (2016), cujo trabalho demonstrou que essas espécies eram *Parafilaroides normani* a partir da amplificação pelo gene COI. Portanto existem altas evidências de que as espécies encontradas neste trabalho também sejam pertencentes a esta espécie que hospedava igualmente animais do sul do Brasil. Diferente dos dados encontrados por Dailey (2009), os resultados da amplificação do gene *COX-1* nas nossas amostras pulmonares de lobos-marinhos-sulamericanos amplificaram o gene do hospedeiro. Os produtos da PCR com gene ITS-2 apresentaram resultados satisfatórios, entretanto mais animais apresentaram resultados positivos para *Parafilaroides* spp. na histopatologia comparada à análise molecular, provavelmente devido ao padrão de distribuição multifocal do agente e a ausência de lesão macroscópica que direcionasse a amostragem para a detecção molecular, ainda que todos os lobos pulmonares tenham sido amostrados bilateralmente.

7 CONCLUSÕES

1. Pneumonia parasitária por metastrongilídeos foi morfológicamente observada em 12 lobos-marinhos-sulamericanos, *A. australis*, dos 26 estudados, com curso leve a moderado e não foi correlacionada diretamente como a causa de morte.
2. A macroscopia específica da lesão por *Parafilaroides normani* foi evidenciada em um animal, com lesão nodular, multifocal e moderada.
3. A histopatologia estabeleceu o diagnóstico, caracterização da lesão pulmonar, assim como sua intensidade.
4. A PCR com o primer ITS-2 determinou a espécie da pneumonia parasitária dos lobos-marinhos-sulamericanos em seis animais estudados, enquanto o primer *COX-1* amplificou amostras do hospedeiro, tendo sido insatisfatório para o estudo de parasitos causadores de pneumonia em lobos-marinhos-sulamericanos.
5. E o sequenciamento genético indicou alta compatibilidade no BLAST com a espécie *Parafilaroides normani*, estabelecida como agente etiológico das pneumonias parasitárias deste estudo.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, D. B. **Estudo de causa mortis de *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) (Lobo-marinho-Sul-Americano) no litoral norte do Rio Grande do Sul.** 2014. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade: manejo e conservação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, 2014.
- ANDERSON, R. C. **CIH keys to the nematode parasites of vertebrates.** Keys to genera of the superfamily Metastrongyloidea. Farnham Royal, Bucks, England: Common wealth Agricultural Bureaux, 1978.n. 5.
- ARNOLD, P. W.; GASKIN, D. E. Lungworms (Metastrongyloidea: Pseudaliidae) of harbor porpoise *Phocoena phocoena* (L. 1758). **Canadian Journal of Zoology**, v. 53, p. 713–735, 1975.
- BAKER, J. R; MCCANN, T. S. Pathology and bacteriology of adult male Antarctic fur seals, *Arctocephalus gazella*, dying at Bird Island, South Georgia. **British Veterinary Journal**, v. 145, p. 263–275, 1989.
- BALDASSIN P.; AMORIM D. B.; WERNECK M. R.; MARIANI D. B. Pathologies of Pinnipeds in Brazil. In: ALAVA, J. J. (ed.). **Tropical pinnipeds: bio-ecology, threats and conservation.** CRC Press, 2017, p. 269-285.
- BARLOUGH, J. E.; BERRY, E. S.; SKILLING, D. E.; SMITH, A. W. Sea lions, caliciviruses and the sea. **Avian/Exotic Practice**, v. 3, p. 8–20, 1986.
- BARNETT, J. E. F.; BEXTON, S.; FRAIJA-FERNÁNDEZ, N.; CHOONEEA, D.; WESSELS, M. E. Novel Pulmonary Vasculitis with Splendore–Hoepli Reaction in Grey Seals (*Halichoerus grypus*) Associated with *Otostongylus circumlitus* Infection. **Journal of comparative pathology**, v. 173, p. 83-91, 2019.
- BERGERON, E.; MEASURES, L. N.; HUOT, J. Experimental transmission of *Otostongylus circumlitus* (Railliet, 1899) (Metastrongyloidea: Crenosomatidae), lungworm of seals in eastern arctic Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, p. 1364–1371, 1997.
- BOWMAN, D. **Georgis' parasitology for veterinarians.** 10th ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2014.
- BRUNNER, S. Fur seals and sea lions (Otariidae): identification of species and taxonomic review. **Systematics and Biodiversity**, v. 1, n. 3, p. 339-439, 2004.
- CARRENO, R. A.; NADLER, S. A. Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 965-973, 2003.

COLEGROVE, K. M.; GREIG, D. J.; GULLAND, F. M. D. Causes of live strandings of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) and Pacific harbor seals (*Phoca vitulina*) along the central California coast, 1992–2001. **Aquatic Mammals**, v.31, p. 1–10, 2005.

DAILEY, M.D. The transmission of *Parafilaroides decorus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in the California sea lion (*Zalophus californianus*). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 37, p. 215–222, 1970.

DAILEY, M. D. Parasitology—Basic considerations. *In: Zoo and wild animal medicine*. M. E. Fowler. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1986. pp. 781–784.

DAILEY, M. D. Parasitic diseases. *In: DIERAUF, L.A.; GULLAND, F. M. D. (eds.), C.R.C. Handbook of marine mammal medicine*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 357-379.

DAILEY, M. D. Restoration of *Parafilaroides* (Dougherty, 1946) (Nematoda: Metastrongyloidea) with description of two new species from pinnipeds of eastern central Pacific. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 589–594, 2006.

DAILEY, M. D. A new species of *Parafilaroides* (Nematoda: Filaroididae) in three species of fur seals (Carnivora: Otariidae) from the southern hemisphere. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 156–159, 2009.

DELYAMURE, S. L.; POPOV, V. N.; TRASHCHENKOV, A. N. Study of the helminth fauna of the seals of the Baltic Sea and Lake Ladoga [In Russian]. Nauchnye Doklady Vysshei Shkoly, **Biologicheski Nauki**, v. 7, p. 43–45, 1980. Canadian Translation of Fisheries and Aquatic Sciences, n. 5112, 1984.

DOUGHERTY, E. C. The genus *Aelurostrongylus* Cameron, 1927 (Nematoda: Metastrongyloidea), and its relatives; with descriptions of *Parafilaroides*, gen. nov., and *Angiostrongylus gubernaculatus* sp. nov. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 13, p. 16–26, 1946.

DUNGWORTH, D. L. The respiratory system. *In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. Pathology of domestic animals*. Ed. Orlando, FL: Academic Press, 1985. p. 413–556.

ECHENIQUE, J.; PEREIRA, E.; PRADO, J.; SCHILD, A. L.; VALENTE, A. L. New host and geographical records for *Parafilaroides normani* (Nematoda: Filaroididae) Dailey, 2009 in South American fur seal, *Arctocephalus australis*, from southern Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 94, 2020.

ECHENIQUE J. V. Z.; VALENTE, A. L. Vermintic pneumonia caused by *Parafilaroides normani* (Nematoda: Filaroididae) in *Arctocephalus australis* in southern Brazil. *In: Congreso Colombiano de Zoología*; 2014. p. 852–853.

ELSON-RIGGINS, J. G.; AL-BANNA, L.; PLATZER, E. G.; KALOSHIAN, I. Characterization of *Otostrongylus circumlitus* from Pacific harbor and northern elephant seals. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 73-78, 2001.

- FLEISCHMAN, R. W.; SQUIRE, R. A. Verminous pneumonia in the California sea lion (*Zalophus californianus*). **Pathologica Veterinaria**, v. 7, p. 89–101, 1970.
- FOLKENS, P. A.; REEVES, R. R. **Guide to marine mammals of the world**. National Audubon Society, 2002.
- GARNER, M. M.; LAMBOURN, D. M.; JEFFRIES, S. J.; HALL, P. B.; RHYAN, J. C.; EWALT, D. R.; POLZIN, L.M.; CHEVILLE, N.F. Evidence of *Brucella* infection in *Parafilaroides* lungworms in a pacific harbor seal (*Phocavitulina richardsi*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 298–303, 1997.
- GASTAL, S. B.; MASCARENHAS, C. S.; RUAS, J. L. Infection rates of *Orthohalarachne attenuata* and *Orthohalarachne diminuata* (Acari: Halarachnidae) in *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) (Pinipedia: Otariidae). **Comparative Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 245-249, 2016.
- GERACI, J.R.; LOUNSBURY, V.J. **Marine mammals ashore: a field guide for strandings**. 2nd ed. Baltimore: National Aquarium in Baltimore, 2005.
- GERPE, M. S.; PONCE DE LEÓN, A.; BASTIDA, R.; MORENO, V. J.; RODRÍGUEZ, D. H. Sharp accumulation of heavy metals after weaning in the South American fur seal *Arctocephalus australis*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 375, p. 239–245, 2009.
- GREIG, D. J.; GULLAND, F. M. D.; KREUDER, C. A decade of live California sea lion *Zalophus californianus* strandings along the central California coast: causes and trends, 1991-2000. **Aquatic Mammals**, v. 31, n. 1, p. 11–22, 2005.
- GOSELIN, J-F.; MEASURES, L.N. Redescription of *Filaroides* (*Parafilaroides*) *gymnurus* (Railliet, 1899) (Nematoda: Metastrongyloidea), with comments on other species in pinnipeds. **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, p. 359–370, 1997.
- GOSELIN, J-F., MEASURES, L. N.; HUOT, J. Lungworm (Nematoda: Metastrongyloidea) infections in canadian phocids. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, p. 825–834, 1998.
- GULLAND, F. M. D.; BECKMEN, K.; BUREK, K.; LOWENSTINE, L.; WERNER, L.; SPRAKER, T.; DAILEY, M.; HARRIS, E. Nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infestation of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the central California coast. **Marine Mammal Science**, v. 13, p. 446–459, 1997.
- GULLAND, F. M.; HALL, A. J. Is marine mammal health deteriorating? Trends in the global reporting of marine mammal disease. **EcoHealth**, v. 4, p. 135–150, 2007.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, p. 160-174, 1985.
- HERNÁNDEZ-ORTS, J. S.; MONTERO, F. E.; CRESPO, E. A.; GARCÍA, N. A.; RAGA, J. A.; AZNAR, F. J. A new species of ascocotyle (Trematoda: Heterophyidae) from the South American sea lion, *Otaria flavescens*, off Patagonia. **Argentina Journal of Parasitology**, v. 98, p. 810-816, 2012.

HERNÁNDEZ-ORTS, J. S.; MONTERO, F. E.; JUAN-GARCÍA, A.; GARCÍA, N. A.; CRESPO, E. A.; RAGA, J. A.; AZNAR, F. J. Intestinal helminth fauna of the South American sea lion *Otaria flavescens* and fur seal *Arctocephalus australis* from northern Patagonia, Argentina. **Journal of Helminthology**, v. 87, n. 3, p. 336, 2013.

HERNANDEZ-ORTS, J. S.; VIOLA, M. N. P.; GARCIA, N. A.; CRESPO, E. A.; GONZALEZ, R.; GARCIA-VARELA, M.; KUCHTA, R. A checklist of the helminth parasites of marine mammals from Argentina. **Zootaxa**, v. 3936, n. 3, p. 301-334, 2015.

HILL, B. L. **Comparative morphology of *Parafilaroides decorus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in the California and Steller sea lions**. M.Sc. Thesis - California State College at Long Beach, Long Beach, CA, 1971.

JACOBUS, K.; MARIGO, J.; GASTAL, S. B.; TANIWAKI, S. A.; RUOPPOLO, V.; CATÃO-DIAS, J. L.; TSENG, F. Identification of respiratory and gastrointestinal parasites of three species of pinnipeds (*Arctocephalus australis*, *Arctocephalus gazella*, and *Otaria flavescens*) in southern Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 47, n. 1, p. 132-140, 2016.

JEFFERSON, T. A.; WEBBER, M. A.; PITMAN, R. L. **Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification**. Elsevier, 2011.

KATZ, H.; MORGADES, D.; CASTRO-RAMOS, M. Pathological and Parasitological Findings in South American Fur Seal Pups (*Arctocephalus australis*) in Uruguay. **International Scholarly Research Network**, ISRN Zoology Volume, 2012, Article ID 586079, 7 pages doi:10.5402/2012/586079

KELLY, T. R.; GREIG, D.; COLEGROVE, K. M.; LOWENSTINE, L. J.; DAILEY, M.; GULLAND, F. M.; HAULENA, M. Metastrongyloid nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infection in a stranded California sea lion (*Zalophus californianus*)—A new host-parasite association. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 3, p. 593-598, 2005.

KIM, K. C.; HAAS, V. L.; KEYES, M. C. Populations, microhabitat preference and effects of infestation of two species of *Orthohalarachne* (Halarachnidae: Acarina) in the northern fur seal. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 16, p. 45–51, 1980.

KING, J. E. **Seals of the World**. British Museum (Natural History) & Cornell University Press, Nueva York, Second Edition, 1983. 240 p.

KONTRIMAVICHUS, V. L.; DELYAMURE, S. L. Filaroids of domestic and wild animals. **Fundamentals of Nematology**. v. 29, 1979. (In Russian). Translated for the US Dept. of Agriculture and National Science Foundation, Washington. 1985.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LAUCKNER, G. Diseases of Mammalia: Pinnipedia. In: KINNE, O. (Ed.). **Diseases of Marine Animals**. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, 1985. v. IV, pt. 2, p.683–793.

LAUER JÚNIOR, C. M.; MEDEIROS, A. W.; GIONGO, A.; BORGES, L. G. D. A.; AMORIM, D. B. D.; TAVARES, M., FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G. Fecal eukaryotic community of wild young South American (*Arctocephalus australis*) and Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). In: **Annals of marine biology and research**. San Diego, CA, 2017. v. 4, n. 2, p. 1-6.

LEHNERT, K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SCHAUDIEN, D.; BLEIDORN, C.; WOHLSEIN, P.; SIEBERT, U. Transmission of lungworms of harbour porpoises and harbour seals: molecular tools determine potential vertebrate intermediate hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 7, p. 845-853, 2010.

LEIDENBERGER, S.; HARDING, K.; HÄRKÖNEN, T. Phocid seals, seal lice and heartworms: a terrestrial host-parasite system conveyed to the marine environment. **Diseases of Aquatic organisms**, v. 77, n. 3, p. 235-253, 2007.

LYONS, E. T.; DELONG, R. L.; MELIN, S. R.; TOLLIVER S. C. Uncinariasis in northern fur seal and California sea lion pups from California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 4, p.848–852, 1997.

MARIGO, J. **Patologia comparada das principais enfermidades parasitárias de mamíferos marinhos encontrados na costa sudeste e sul do Brasil**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. p.131.

MAWSON, P. M. Parasitic nematode collected by the Australian National Antarctic Research Expedition. Head Island and Mac-Quarie Island, 1948–1951. **Parasitology**, v. 43, p. 291–297, 1953.

MEASURES, L. N. Helminths and parasitic arthropods. In: GULLAND, F. M. D.; DIERAUF, L. A.; WHITMAN, K. L. (Eds.) **Handbook of Marine Mammal Medicine**. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 2018. p. 471–497.

MEASURES, L. N. Lungworms of marine mammals. In: SAMUEL, W. M.; PYBUS, M. J.; KOCAN, A. A. (Eds.). **Parasitic diseases of wild mammals**. 2nd ed. Ames: The Iowa State University Press, 2001.p. 279-300.

MEASURES, L.N. Anisakiosis and pseudoterranovosis: U.S. **Geological Survey Circular 1393**. 2014.

MORALES, G. A.; HELMBOLDT. C. F. Verminous pneumonia in the California sea lion (*Zalophus californianus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 7, p. 22–27, 1971.

MORGADES, D.; KATZ, H.; CASTRO, O. Fauna parasitaria del lobo fino *Arctocephalus australis* y delleón marino *Otaria flavescens* (Mammalia, Otariidae) en la costa uruguaya. Bases para La conservación y el manejo de la costa atlántica uruguaya. In: MENAFRA, R.; RODRÍGUEZ-GALLEGO, L.; SCARABINO, F.; CONDE, D. (Eds.). **Vida Silvestre**. Montevideo, Uruguay, 2006.p. 89–96.

MOURA, J. F.; DI DARIO, B. P. S.; SICILIANO, S. Occurrence of pinnipeds on the coast of Rio de Janeiro State, Brazil. **Marine Biodiversity Records**, v. 4, 2011.

MUNRO, R.; ROSS, H.; CORNWELL, C.; GILMOUR, J. Disease conditions affecting common seals (*Phoca vitulina*) around the Scottish mainland, September–November 1988. **The Science of the Total Environment**, v. 115, p. 67–82, 1992.

NICHOLSON, A.; FANNING, J. C. Parasites and associated pathology of the respiratory tract of the Australian sea lion: *Neophoca cinerea*. In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Wildlife disease of the Pacific basin and other countries**. Proceedings of the Fourth International Conference of the Wildlife Disease Association, Sydney, Australia, 1981. p. 178–181.

OLIVEIRA, L. R. **Estudo da ecologia alimentar dos pinípedes (Pinnipedia, Otariidae e Phocidae) ocorrentes no litoral norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, entre abril de 1993 e dezembro de 1998**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999. p. 72.

ONDERKA, D. K. Prevalence and pathology of nematode infections in the lungs of ringed seals (*Phoca hispida*) of the western arctic of Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, p. 218–224, 1989.

OSINGA N. **Comparative biology of common and grey seals along the Dutch coast: stranding, disease, rehabilitation and conservation**. PhD Dissertation - Leiden University, 2015.

PETRY, M. V.; FONSECA, V. D. S. Mamíferos marinhos encontrados mortos no litoral do Rio Grande do Sul de 1997 a 1998. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 23, p. 225-235, 2001.

PINEDO, M. C. Ocorrência de pinípedes na costa brasileira. **Garcia de Orta, Série Zoologia**, v. 15, n. 2, p. 37-48, 1990.

PINEDO, M. C. **Cetáceos e Pinípedes do Brasil: uma revisão dos registros e guia para identificação das espécies**, 1992.

PINEDO, M. C.; BARROS, N. Análises dos conteúdos estomacais do leão-marinho *Otaria flavescens* e do lobo-marinho *Arctocephalus australis* na costa do Rio Grande do Sul, Brasil. In: **Resumos In: Actas del VIII Simposio Latinoamericano de Oceanografía Biológica**. Montevideo, Uruguay, v.28, 1983.

PONCE DE LEÓN, A. Crecimiento Intrauterino y Postnatal del Lobo de dos Pelos Sudamericano, *Arctocephalus australis* (Zimmerman, 1783), en Islas de Uruguay. In: **Actas del VIII Simposio Latinoamericano de Oceanografía Biológica**. Montevideo, Uruguay, 1983.

PONCE DE LEÓN, A. Lactancia y Composición Cuantitativa de Leche de Lobo Fino Sudamericano *Arctocephalus australis* (Zimmerman, 1783). ILPE. In: **Anales**. Montevideo, Uruguay, 1984.

RAGA, J. A.; FERNÁNDEZ, M.; BALBUENA, J. A.; AZNAR, F. J. Parasites. In: **Encyclopedia of marine mammals**. Academic Press, 2009. p. 821-830.

RAND, R. W. The Cape fur seal (*Arctocephalus pusillus*). Distribution, abundance, and feeding habits off the south western coast of the Cape Province. **South African Division of Fisheries, Investigative Report**, v. 60, p. 1–39, 1959.

REISFELD, L.; SACRISTÁN, C.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; COSTA-SILVA, S.; DÍAZ-DELGADO, J.; GROCH, K. R.; MARIGO, J.; EWBANK, A. C.; FAVERO, C. M.; GUERRA, J. M.; RÉSSIO, R. A.; CREMER, M. J. ESPERÓN, F.; CATÃO-DIAS, J. L. Fatal pulmonary parafilaroidiasis in a free-ranging subantarctic fur seal (*Arctocephalus tropicalis*) coinfecting with two gammaherpesviruses and *Sarcocystis* sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 3, p. 499-503, 2019.

REPENNING, C. A.; PETERSON, R. S.; HUBBS, C. L. Contributions to the systematics of the southern fur seals, with particular reference to the Juan Fernandez and Guadalupe species. **Antarctic Research Series**, v. 18, p. 1-34, 1971.

RHYAN, J.; GARNER, M.; SPRAKER, T.; LAMBOURN, D.; CHEVILLE, N. *Brucella pinnipedialis* in lungworms *Parafilaroides* sp. and Pacific harbor seals *Phoca vitulina richardsi*: proposed pathogenesis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 131, n. 2, p. 87-94, 2018.

SCHUMACHER, U.; HORNY, H.-P.; HEIDEMANN, G.; SCHULTZ, W.; WELSCH, U. Histopathological findings in harbor seals (*Phoca vitulina*) found dead on the German North Sea coast. **Journal of Comparative Pathology**, v. 102, p. 299–310, 1990.

SEGUEL M.; CALDERÓN K.; COLEGROVE K.; ADKESSON M.; CÁRDENAS-ALAYZA S.; PAREDES E. Helminth and respiratory mite lesions in Pinnipeds from Punta San Juan, Peru. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 4, p. 839–844, 2018a.

SEGUEL, M.; MUNOZ, F.; NAVARRETE, M. J.; PAREDES, E.; HOWERTH, E.; GOTTDENKER, N.. Hookworm infection in South American fur seal (*Arctocephalus australis*) pups: pathology and factors associated with host tissue damage and mortality. **Veterinary pathology**, v. 54, n. 2, p. 288-297, 2017.

SEGUEL, M., NADLER, S., FIELD, C., DUGNAN, P. Vasculitis and thrombosis due to the sea lion lungworm, *Parafilaroides decorus*, in a guadalupe Fur seal (*Arctocephalus philippii townsendi*). **Journal of wildlife diseases**, v. 54, n. 3, p. 638-641, 2018b.

SEGUEL, M.; PAREDES, E.; PAVÉS, H.; MOLINA, R.; HENRÍQUEZ, F.; DE GROOTE, F.; SCHLATTER, R. Pathological findings in South American fur seal pups (*Arctocephalus australis gracilis*) found dead at Guafo Island, Chile. **Journal of comparative pathology**, v. 145, v. 2-3, p. 308-317, 2011.

SEGUEL, M.; PAVES, H.; PAREDES, E.; SCHLATTER, R. Causes of mortality in South American fur seal pups (*Arctophoca australis gracilis*) at Guafo Island, southern Chile (2004–2008). **Marine Mammal Science**, v. 29, n. 1, p. 36-47, 2013.

SEPÚLVEDA, M. A.; SEGUEL, M.; ALVARADO-RYBAK, M.; MUÑOZ-ZANZI, C.; TAMAYO, R. Postmortem Findings in Four South American Sea Lions (*Otaria byronia*) from an Urban Colony. **Journal of Wildlife Disease**, v. 51, p. 279–282, 2015.

SIEBERT, U.; WOHLSEIN, P.; LEHNERT, K.; BAUMGARTNER, W. Pathological findings in harbour seals (*Phoca vitulina*): 1996-2005. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 1, p. 47-58, 2007.

STROUD, R. K.; DAILEY, M. D. Parasites and associated pathology observed in pinnipeds stranded along the Oregon coast. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, p. 292–298, 1978.

SUKHDEO, M. V. K. **Parasites and behaviour**. Parasitology 109 (S1). Cambridge University Press, 1994. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/par-volume-109-supplement-1-cover-and-front-atter/BDA7D7894A9B6020B27D9C5896F1D09E>

SWEENEY, J. C. Clinical consideration of parasitic and noninfectious diseases. *In*: FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine**. Ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company, 1986. p. 785–789.

SWEENEY, J. C.; GILMARTIN, W. G. Survey of diseases in free-living California sea lions. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 10, p. 370–376, 1974.

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, p. 4673-4680, 1994.

TRAVASSOS, L. Nematoda. *In*: TRAVASSOS, L. **Introdução a Helminologia**. Brazilian Journal of Biology, p. 33-62, 1950.

WILLIAMS, K. M.; FESSLER, M. K.; BLOOMFIELD, R. A.; SANDKE, W. D.; MALEKSHAHI, C. R.; KEROACK, C. D.; DUIGNANB, P. J.; TORQUATO, S. D.; WILLIAMS, S. A. A novel quantitative real-time PCR diagnostic assay for fecal and nasal swab detection of an otariid lungworm, *Parafilaroides decorus*. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 12, p. 85-92, 2020.