



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**ANÁLISE TAXONÔMICA E MOLECULAR DE CESTODA  
NEMATOTAENIIDAE PARASITO DE INTESTINO DELGADO DE  
*Rhinella marina* (LINNAEUS, 1758) (AMPHIBIA: BUFONIDAE) DE  
BELÉM-PA**

FRANCISCO TIAGO DE VASCONCELOS MELO

Belém, Pará

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**ANÁLISE TAXONÔMICA E MOLECULAR DE CESTODA  
NEMATOTAENIIDAE PARASITO DE INTESTINO DELGADO DE  
*Rhinella marina* (LINNAEUS, 1758) (AMPHIBIA: BUFONIDAE) DE  
BELÉM-PA**

FRANCISCO TIAGO DE VASCONCELOS MELO

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Agentes  
Infecciosos e Parasitários da  
Universidade Federal do Pará, como  
requisito para a obtenção do grau de  
Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Jeannie Nascimento dos Santos

Belém, Pará

2010

Melo, Francisco Tiago de Vasconcelos

Análise Taxonômica e Molecular de Cestoda Parasito de Intestino Delgado de *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Amphibia: Bufonidae) de Belém-Pa, 126p, Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

1 Anfíbios 2. Cestoda 3. *Rhinella marina* 4. *Nematotaenidae*

**ANÁLISE TAXONÔMICA E MOLECULAR DE CESTODA  
NEMATOTAENIIDAE PARASITO DE INTESTINO DELGADO DE  
*Rhinella marina* (LINNAEUS, 1758) (AMPHIBIA: BUFONIDAE) DE  
BELÉM-PA**

FRANCISCO TIAGO DE VASCONCELOS MELO

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Agentes  
Infecciosos e Parasitários da  
Universidade Federal do Pará, como  
requisito para a obtenção do grau de  
Mestre.

Local e Data de Defesa: Belém (PA), 02 de Julho de 2010

Banca Examinadora:

---

Profª. Drª. Jeannie Nascimento dos Santos (Orientadora)  
Laboratório de Biologia Celular e Helmintologia - Instituto de Ciências Biológicas -  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Maurílio José Soares  
Laboratório de Biologia Celular - Instituto Carlos Chagas / FIOCRUZ – Curitiba-PR

---

Profª. Dra. Edilene Oliveira da Silva  
Laboratório de Parasitologia Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves  
Laboratório de Polimorfismo de DNA Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal  
do Pará

---

Prof. Dr. Adriano Penha Furtado (Suplente)  
Laboratório de Biologia Celular e Helmintologia - Instituto de Ciências Biológicas -  
Universidade Federal do Pará

Belém, Pará

*“A Natureza nunca nos engana; somos sempre  
nós que nos enganamos”*

*Jean Jaques Rousseau*

Dedico este trabalho a meus pais que sempre me ajudaram e a toda a minha família e amigos que sempre estiveram ao meu lado.

Dedico a Reinalda *in memoriam*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter feito com que eu estivesse aqui para a conclusão de mais uma etapa de minha vida.

Agradeço a minha família por ter me dado o incentivo, compreensão e amor

Especialmente a minha orientadora Profa. Dra. Jeannie Nascimento dos Santos pelo incentivo, simpatia, companheirismo, auxílio às atividades, e discussões sobre o trabalho e que além de ser Orientadora fez papel de Segunda Mãe (Mamã Científica).

Agradeço ao Prof. Edilson Matos e aos membros do Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo que nos ajudaram nas etapas de inclusão e corte dos blocos em parafina.

Ao Dr. Maurílio José Soares por ter ensinado a técnica de Reconstrução 3D de estruturas.

Ao Prof. Evonnildo Gonçalves por me ajudar com as técnicas de Biologia Molecular

A Prof. Edilene Oliveira e técnicos do Laboratório de Biologia Estrutural do ICB, que possibilitaram na realização dos cortes em HistoResina®.

Ao Prof. Otávio Mitio Ohashi que ajudou scanneando as figuras do para este trabalho.

Ao Laboratório Hertha Mayer pela realização das Eletromicrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Prof. Hilton Tulio Costi e técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Museu Paraense Emílio Goeldi.

Ao Prof. Adriano Penha Furtado que sempre esteve ajudando nas coletas, técnicas de biologia molecular, fotografias e processamento do material.

A Elaine Giese pelos momentos de descontração, sorvetes, saídas para lanches, caronas, cinemas, teatros, festas, aniversários, conversas, papos, carinho, incentivo e ajuda.

Ao Prof. Antônio Carlos Rosário Vallinoto pela disponibilidade do Laboratório de Virologia para realização de técnicas de biologia molecular dos helmintos colhidos.

Aos todos os membros do Laboratório de Biologia Celular e Helminologia Prof Dra. Reinalda Marisa Lanfredi.

Ao PROCAD que possibilitou a realização deste projeto com auxílio financeiro.

A CAPES pelo auxílio com a bolsa.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho e que por ventura não foram citados, fica aqui os meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

|           |                                                                                          |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>  | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                        | <b>1</b>  |
| 1.1       | O HOSPEDEIRO <i>RHINELLA MARINA</i>                                                      | 1         |
| 1.2       | PARASITOS DO ANFÍBIO <i>RHINELLA MARINA</i>                                              | 7         |
| 1.3       | HELMINTOS DE <i>RHINELLA MARINA</i>                                                      | 8         |
| 1.4       | CESTODA                                                                                  | 9         |
| 1.4.1     | <i>Morfologia Geral dos Cestoda</i>                                                      | 9         |
| 1.4.1.1   | Caracteres anatômicos                                                                    | 9         |
| 1.4.1.2   | Escólice                                                                                 | 10        |
| 1.4.1.3   | Estróbilo                                                                                | 13        |
| 1.4.1.4   | Tegumento                                                                                | 14        |
| 1.4.1.5   | Microtríquias                                                                            | 15        |
| 1.4.1.6   | Sistema Nervoso                                                                          | 17        |
| 1.4.1.7   | Sistema muscular                                                                         | 17        |
| 1.4.1.8   | Sistema Excretor                                                                         | 17        |
| 1.4.1.9   | Sistema Reprodutor                                                                       | 18        |
| 1.4.1.10  | Ovos                                                                                     | 20        |
| 1.4.2     | <i>Ciclo de vida</i>                                                                     | 22        |
| 1.4.3     | <i>Taxonomia de Cestodas</i>                                                             | 23        |
| 1.4.4     | Ordem Pseudophyllidea                                                                    | 25        |
| 1.4.5     | Ordem Cyclophyllidea                                                                     | 25        |
| 1.5       | <i>A Família Nematotaeniidae</i>                                                         | 27        |
| 1.5.1     | Caracteres Taxonômicos da Família Nematotaeniidae                                        | 29        |
| 1.6       | ESTUDOS DE BIOLOGIA MOLECULAR DE CESTODA                                                 | 30        |
| 1.7       | CESTODA DE ANFÍBIOS E ZOONOSES                                                           | 30        |
| 1.9       | OBJETIVOS                                                                                | 35        |
| 1.9.1     | <i>Objetivo Geral:</i>                                                                   | 35        |
| 1.9.2     | <i>Objetivos Específicos:</i>                                                            | 35        |
| <b>2.</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                               | <b>36</b> |
| 2.1       | OBTENÇÃO DE HOSPEDEIROS E AMOSTRAS DE PARASITOS:                                         | 36        |
| 2.2       | MICROSCOPIA DE LUZ                                                                       | 39        |
| 2.3       | PROCESSAMENTO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA                                                   | 40        |
| 2.3.1     | <i>Método de Processamento e Inclusão em Parafina</i>                                    | 41        |
| 2.3.2     | <i>Método de Inclusão em Histo-resina<sup>®</sup></i>                                    | 42        |
| 2.4       | ANÁLISE POR CONTRASTE POR INTERFERÊNCIA DIFERENCIAL (DIC) E RECONSTRUÇÃO TRI-DIMENSIONAL | 43        |
| 2.5       | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA                                                      | 44        |
| <b>3.</b> | <b>RESULTADOS</b>                                                                        | <b>47</b> |
| 3.1       | ANÁLISES POR MICROSCOPIA DE LUZ                                                          | 50        |

|                                                                              |            |
|------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2 ANÁLISE DAS SECÇÕES SERIADAS DE HELMINTOS INCLUÍDOS EM HISTORESINA ..... | 62         |
| 3.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....               | 70         |
| <b>4. DISCUSSÃO .....</b>                                                    | <b>84</b>  |
| 4.1 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA O ESTUDO DE CESTÓIDES .....                 | 92         |
| <b>5. CONCLUSÕES .....</b>                                                   | <b>96</b>  |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                   | <b>97</b>  |
| <b>7. ANEXO I.....</b>                                                       | <b>105</b> |
| <b>8. ANEXOS II.....</b>                                                     | <b>107</b> |
| <b>9. ANEXOS III .....</b>                                                   | <b>109</b> |
| <b>10. ANEXO IV .....</b>                                                    | <b>112</b> |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figuras</b>                                                                                                                                                                                                      | <b>Pág.</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Figura 1:</b> Diversidade de espécies de anfíbios distribuída mundialmente                                                                                                                                       | <b>01</b>   |
| <b>Figura 2:</b> Mapa da distribuição geográficas de representantes da Família Bufonidae                                                                                                                            | <b>02</b>   |
| <b>Figura 3:</b> <i>Rhinella marina</i> , representante da Família Bufonidae                                                                                                                                        | <b>04</b>   |
| <b>Figura 4:</b> Mapa da distribuição geográfica do anfíbio <i>Rhinella marina</i>                                                                                                                                  | <b>05</b>   |
| <b>Figura 5:</b> Morfologia externa de um cestóide                                                                                                                                                                  | <b>10</b>   |
| <b>Figura 6:</b> Principais tipos de escólices e estruturas fixadoras encontradas em cestoda                                                                                                                        | <b>11</b>   |
| <b>Figura 7:</b> Morfologia dos órgãos de fixação encontrados em cestóides                                                                                                                                          | <b>12</b>   |
| <b>Figura 8:</b> Desenho Esquemático do Tegumento de Cestoda                                                                                                                                                        | <b>15</b>   |
| <b>Figura 9:</b> Representação do Tegumento dos Cestoda                                                                                                                                                             | <b>16</b>   |
| <b>Figura 10:</b> Disposição dos canais excretores no corpo dos cestoda                                                                                                                                             | <b>18</b>   |
| <b>Figura 11:</b> Proglote Maduro mostrando as estruturas sexuais do parasito                                                                                                                                       | <b>20</b>   |
| <b>Figura 12:</b> Representação dos tipos de oncosferas de cestoda                                                                                                                                                  | <b>21</b>   |
| <b>Figura 13:</b> Representação Esquemática das seis formas larvais dos cestoda.                                                                                                                                    | <b>23</b>   |
| <b>Figura 14:</b> Características gerais dos cestóides da Família Nematotaeniidae.                                                                                                                                  | <b>28</b>   |
| <b>Figura 15:</b> Ciclo de vida de helmintos do Gênero <i>Spirometra</i> .                                                                                                                                          | <b>32</b>   |
| <b>Figura 16:</b> Imagem de satélite das regiões de coleta dos hospedeiro                                                                                                                                           | <b>36</b>   |
| <b>Figura 17:</b> Área de Coleta dos hospedeiros, no entorno do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, no Guamá.                                                                         | <b>37</b>   |
| <b>Figura 18 :</b> Etapas para o procedimento de necrópsia do Hospedeiro.                                                                                                                                           | <b>38</b>   |
| <b>Figura 19:</b> Estereomicroscopia dos Aspectos anatômicos observados por estereomicroscopia de Cestoda parasita de intestino delgado de <i>Rhinella marina</i> de Belém-PA.                                      | <b>49</b>   |
| <b>Figura 20:</b> Microscopia de Luz de campo claro e por <i>Diferential Interference Contrast</i> (DIC) do cestóide de <i>R. marina</i> de Belém- PA, fixados por compressão, corados e clarificados para análise. | <b>54</b>   |
| <b>Figura 21:</b> Microscopia de Luz de diferentes regiões do estróbilo de cestóide de <i>R. marina</i> com destaque para proglotes pré-grávidos e grávidos.                                                        | <b>56</b>   |

|                                                                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 22:</b> Microscopia de Luz dos aspectos gerais do corpo e proglotes de cestóide de <i>R. marina</i> , vistos por desenhos em profundidade obtidos por câmara clara. | <b>58</b> |
| <b>Figura 23:</b> Microscopia de Luz de secções transversais de proglotes maduros incluídos em Parafina.                                                                      | <b>60</b> |
| <b>Figura 24:</b> Detalhes em microscopia de luz de secções transversais de proglotes maduros incluídos em Historesina®.                                                      | <b>65</b> |
| <b>Figura 25:</b> Secções Longitudinais de proglotes maduros incluídos em Historesina®.                                                                                       | <b>67</b> |
| <b>Figura 26:</b> Imagens da reconstrução tri-dimensional do estróbilo do cestóide parasito de intestino delgado de <i>R. marina</i> de Belém, Pará.                          | <b>69</b> |
| <b>Figura 27:</b> Microscopia Eletrônica de Varredura do escólice do cestóide parasito de intestino delgado de <i>R. marina</i> de Belém-PA.                                  | <b>72</b> |
| <b>Figura 28:</b> Microscopia Eletrônica de Varredura de parte do estróbilo do cestóide de intestino delgado de <i>R. marina</i> de Belém-PA.                                 | <b>74</b> |
| <b>Figura 29:</b> Detalhes ultraestruturais de proglotes maduros e cirros.                                                                                                    | <b>76</b> |
| <b>Figura 30:</b> Microscopia Eletrônica de Varredura da porção final do estróbilo do cestóide.                                                                               | <b>78</b> |
| <b>Figura 31:</b> Visualização dos produtos da PCR dos dois pares de primers 2880 e B e CES1 e CES2 submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%.                          | <b>79</b> |
| <b>Figura 32:</b> Sequência nucleotídica de 1253pb da população de cestoda encontrada nos dois bairros de Belém.                                                              | <b>81</b> |
| <b>Figura 33:</b> Alinhamento final das seqüências utilizadas para a construção da árvore filogenética                                                                        | <b>82</b> |
| <b>Figura 34:</b> Árvore filogenética de 10 seqüências de cestoda realizada pelo método da Máxima Parcimônia usando um <i>Bootstrap</i> de 1.000 réplicas.                    | <b>83</b> |

## Resumo

Os anfíbios da espécie *Rhinella marina* também conhecidos como Sapo-Cururu e possuem distribuição mundial. Possuem hábitos noturnos, e devido a sua alimentação bem diversificada vivem em diferentes habitats. Assim podem estar parasitados com uma variedade de helmintos. Dentre os helmintos, os cestodas são o objeto de estudo deste trabalho. Os membros da Família Nematotaenidae são comumente encontrados parasitando o intestino delgado de anfíbios e répteis. O presente trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar morfológicamente e molecularmente um cestoda parasito de *R. marina* da cidade de Belém-PA. Para isso vinte hospedeiros foram capturados em domicílios da região metropolitana de Belém-PA e, após necropsia, os cestoda foram retirados do intestino delgado, alguns exemplares foram fixados em A.F.A, alguns fixados em Glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato, e outros em álcool absoluto para serem processados para diferentes técnicas. Parte da amostra foi desidratada em uma série etanólica, corados com Carmin<sup>®</sup>, clarificados com Salicilato de Metila<sup>®</sup>. Alguns exemplares foram desidratados e incluídos em parafina para realização de cortes transversais e longitudinais. Os exemplares fixados em glutaraldeído foram desidratados e incluídos em Historesina<sup>®</sup>. Os cestoda também foram processados para microscopia Eletrônica de Varredura. A identificação foi realizada por meio de desenhos realizados no microscópio Olympus BX 41 com câmara clara, fotografias feitas em microscópio MEDILUX, com sistema de captura de imagem e MEV. Os Cortes histológicos longitudinais foram fotografados e com o Software RECONSTRUCT<sup>™</sup> foi realizada a reconstrução tridimensional do corpo do parasito. Helmintos fixados em álcool absoluto foram submetidos a extração de DNA, amplificação gênica pela técnica de PCR e seqüenciamento de nucleotídeos. Os cestoda possuem um corpo cilíndrico, filiforme e indistintamente segmentado, exceto na porção posterior. Escólice com quatro ventosas sem rostéolo ou órgão apical, os proglotes grávidos apresentam duas cápsulas piriformes, que se fundem na base, contendo os ovos. A partir das observações por microscopia eletrônica e luz dos cestoda encontrados no intestino delgado de *R. marina*, observou-se que estes cestoda pertencem à Família Nematotaeniidae, no entanto os outros caracteres morfológicos e moleculares por nós encontrados não encaixam este cestóide em nenhum gênero desta Família.

Palavras chaves: Anfíbios, Cestoda, *Rhinella marina*, *Nematotaenidae*

## ABSTRACT

The amphibians of the species *Rhinella marina* known also as Giant Toad and have cosmopolitan distribution. Posses nocturnes habits, due of variety of feeding they can live in different habitats. Then, they can have many kinds of helminthes parasites. Among the helminthes, the cestodas are the target of study of this work. The members of Nematotaeniidae Family are commonly found in small intestine of reptilian and amphibians. The frequent auto-infestation would justify the high taxes of parasitism in one host. The present study has the objective to identify and to characterize the Cestoda of *Rhinella marina* from Belém-PA. Twenty hosts were captured in homes of the metropolitan area of Belém-PA and, after necropsy the Cestoda were isolated of intestine, and some specimens were fixed in A.F.A (Glacial Acid Acetic 2%, Formaldehyde 3% and 95 % of Etanol 70° GL), and some worms fixed in 2% Glutaraldehyde in Cacodilate buffer 0,1m P.h 7,4, to process in different techniques. One part of the samples was dehydrated in Etanol Series, and stained with Carmim<sup>®</sup>, and clarified with Metil Salicilate<sup>®</sup>. Some specimens were dehydrated and included in Paraffin for accomplishment of longitudinal and tranverse cuts. The worms fixed in Glutaraldehyde were dehydrated and included in Historesin<sup>®</sup>. Some Cestoda were processed for Scanning Electron Microscopy (SEM). An indentification was accomplished throught drawings in Olympus BX 41 microscope equipped with camera lucida, pictures were taken in a MEDILUX microscope, with image captures system and in MEV JEOL 5310. Histological sections were photographed and 3D reconstruction was made in RECONSTRUCT<sup>™</sup> software. The cestoid possess a cylindrical body, filiform and with difficult segmentation, except in the final portion of the strobila. Escolex with four suckers without hooks or apical organ, the pregnant proglotis presents two piriform capsules, funded in the basis and containing one or more eggs. The observations in SEM and light microscopy of the cestoda founded in small intestine of *R.marina* from Belém-PA, we observed that these Cestoda belong to Nematotaeniidae Family, meanwhile the other morphologic characters observed did not permit us to classify this helminth in any Gender of this Family.

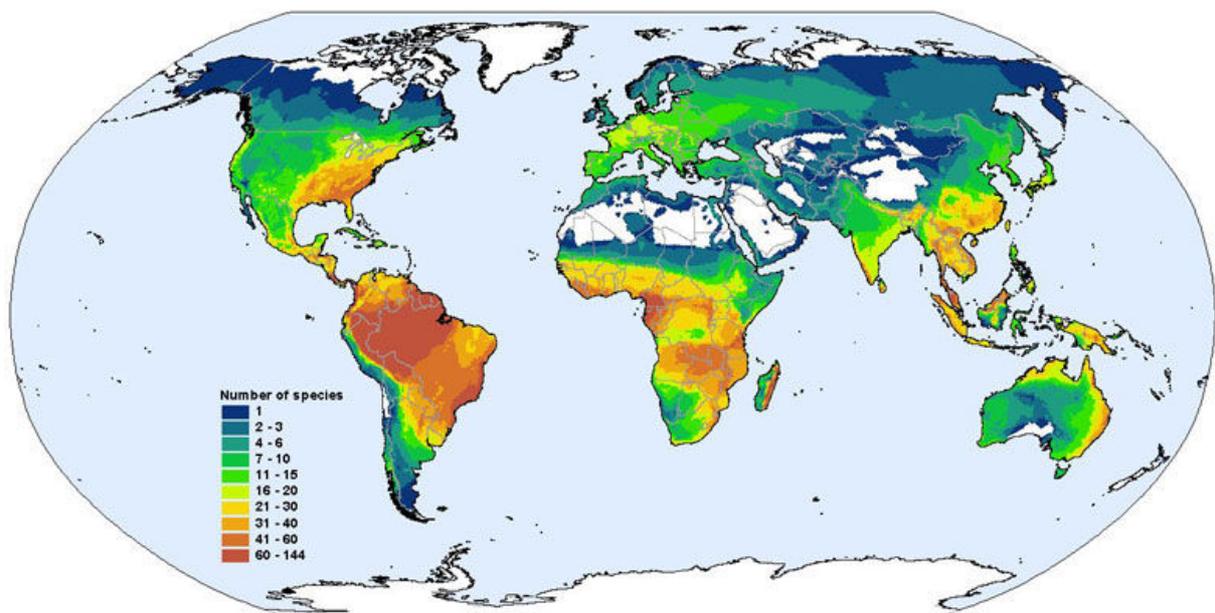
Key-words: Amphibians, Cestoda, *Rhinella marina*, Nematotaeniidae

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O HOSPEDEIRO *Rhinella marina*

Os anfíbios se distinguem de outros vertebrados por possuírem a pele úmida, sem escamas e ausência de garras verdadeiras. Apesar de serem conhecidos por passar metade da vida no solo, e outra na água, um grande número destes não segue este padrão, podendo ter um habitat bem diferenciado (Young et al., 2004).

O *Global Amphibian Assessment* (<http://www.globalamphibians.org>, acessado em 05/05/2010), órgão responsável por catalogar as espécies de anfíbios, em 2005 registrou mais de 5.918 espécies no mundo (Fig. 1) e estima-se que a cada ano sejam descritas 50 novas espécies.

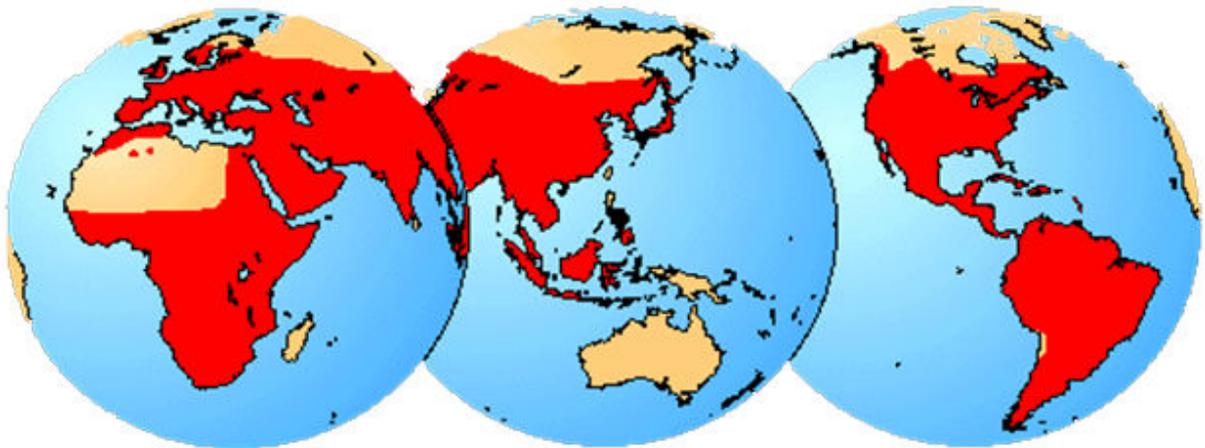


**Figura 1:** Diversidade de espécies de anfíbios distribuída mundialmente. Fonte: *Global Amphibians Assessment* (<http://www.globalamphibians.org>, acessado em 05/05/2010).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH) ([www.sbherpetologia.org.br/](http://www.sbherpetologia.org.br/) acessado em 05/05/2010), no Brasil, até Maio de 2010 foram registradas 875 espécies de anfíbios dentre 849 Anuros, um Caudata e 25 Gymnophionas, que estão distribuídos em 13 Famílias e 98 gêneros. Tornando-o líder mundial em diversidade de espécies, seguido por Colômbia com 698 e Equador com 447 espécies.

Dentre os anfíbios registrados mundialmente destaca-se a Família Bufonidae (Gray, 1825) composta por 35 gêneros e 485 espécies (Fig. 2), podendo ser encontrados de forma nativa, tanto em regiões tropicais quanto temperadas, com exceção de Madagascar e Oceania (<http://www.amphibiaweb.org>).

De 875 espécies de anfíbios encontradas no Brasil, 61 são representantes da Família Bufonidae e, destes, existem dois representantes dos gêneros *Atelopus*, *Frostius*, *Oreophrynella* e *Rhaebo*, 8 do gênero *Dendrophryniscus*, 14 do gênero *Melanophryniscus* e 31 são de anfíbios do gênero *Rhinella* (SBH, [www.sbherpetologia.org.br/](http://www.sbherpetologia.org.br/)).



**Figura 2:** Mapa da distribuição geográficas de representantes da Família Bufonidae. A área de ocupação de anfíbios Bufonidae está marcada em vermelho ( <http://tolweb.org>).

A taxonomia de *R. marina* foi recentemente alterada. Assim, inicialmente era classificada da seguinte maneira, segundo NCBI Taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>):

**Reino:** Animalia

**Filo:** Chordata

**Classe:** Amphibia

**Ordem:** Anura

**Família:** Bufonidae

**Gênero:** *Bufo*

**Espécie:** *Bufo marinus*

Apesar de *R. marina* ter sido alocada no gênero *Bufo*, uma recente re-análise da filogenia de anfíbios, baseada em dados morfológicos e moleculares, elevou alguns táxons dentro deste grupo, gerando assim uma nova organização no grupo *Chaunus marinus* (Frost et al., 2006).

Chaparro et al. (2007), a partir dos estudos de Frost et al. (2006), observaram que o gênero *Chaunus* Wagler, 1828 estava relacionado com os representantes do grupo *Rhinella*, e propuseram que este nome fosse adotado para os grupos de espécies de sapos da América do Sul que inicialmente pertenciam ao gênero *Bufo*; com exceção do gênero *Rhaebo* e *Nannophryne*, tornando *Rhinella marina* a nova combinação da nomenclatura do anfíbio, já aceita pelo Centro Norte Americano de Herpetologia (<http://www.cnah.org/>).

O Sapo-cururu, *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) é um anfíbio muito conhecido e comumente encontrado no Brasil (Fig. 3). São animais de grande porte, possuem protuberância acima dos olhos até o focinho, uma grande glândula paratóide atrás de cada olho, ausência de dentes e membrana interdigital nas patas dianteiras, pele seca e verrugosa,

as pupilas são horizontais e as íris douradas. Não apresenta pálpebra inferior, mas uma membrana nictitante (Frost et al., 2006).



**Figura 3:** *Rhinella marina*, representante da Família Bufonidae (<http://wikipedia.org.br>).

Segundo Zug & Zug (1979) e Lanoo (2005) apresentam dimorfismo sexual quanto à coloração e ao tamanho dos animais. As fêmeas são, em geral, maiores e de cor sépia ou marrom, enquanto que os machos são menores e mais claros, de cor amarelo-pardo. Os machos coaxam para atrair a fêmea, abraça a fêmea pela cintura, que então deposita os ovos que são recobertos com esperma. Em cada postura uma fêmea coloca de 8.000 a 35.000 ovos.

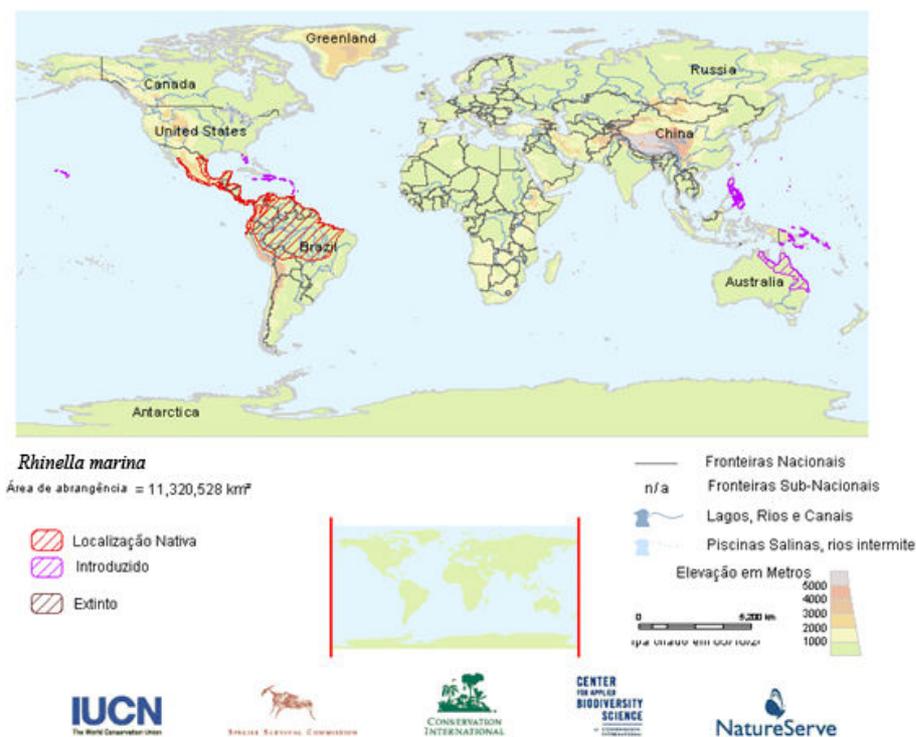
O Sapo-Cururu possui habitat terrestre, necessitando de pequenas coleções de água para reprodução, mas ocupam desde áreas de plantações, florestas, árvores, lagos, jardins, áreas urbanas, canais e rios (*Invasive Species Specialist Group* - <http://www.issg.org/>). Possuem hábitos noturnos, enquanto durante o dia permanecem escondidos sob rochas ou em

buracos no solo de jardins, para protegerem-se da exposição direta à luz solar (Zug & Zug, 1979; Lanoo, 2005).

A alimentação normal destes anfíbios é composta de pequenos vertebrados (aves e mamíferos), invertebrados (besouros, formigas e centopéias) e vegetais; sendo uma das poucas espécies onívoras de sapos. Adicionalmente, podem comer, além do citado, restos orgânicos, ração para cães e lixo doméstico (Zug & Zug, 1979; Brandt & Mazzotti, 2002).

Esta espécie é encontrada naturalmente na América Central, América do Sul e Sul do Texas (América do Norte), tendo sido introduzidos em muitas regiões tropicais, para o controle de pragas na agricultura (Zug & Zug, 1979; Ragoo & Omahmaharaj, 2003).

Assim, a partir da década de 90, o homem auxiliou a dispersão desta espécie de tal forma que, hoje, podem ser encontrados em várias regiões do planeta (Barton, 1997; 1999), como pode ser observado na Figura 4.



**Figura 4:** Mapa da distribuição geográfica do anfíbio *Rhinella marina*. Adaptado de <http://www.globalamphibians.org>. (Acessado em 05/05/2010).

Ao fazer um histórico da dispersão de *R. marina* no mundo Lannoo (2005) cita um caso muito conhecido na literatura sobre a introdução e disseminação deste anfíbio na Austrália, local onde não haviam registros da presença do animal. Em 1935, 101 exemplares coletados no Hawai foram levados para o continente australiano e, em um curto período de tempo, o número populacional aumentou drasticamente a uma taxa de ocupação de 25 - 30 km/ano. O autor ainda explica que as prováveis causas para a rápida dispersão do anfíbio foram as condições climáticas favoráveis e a resistência do animal. Atualmente eles vivem entre 500.000 – 785.000 km<sup>2</sup> do continente australiano.

Greenlees et al. (2007), estudando a introdução de anfíbios da espécie *Rhinella marina* na Oceania, observaram que trata-se de uma espécie extremamente invasiva, de habitat rural, urbano e peridomiciliares. Em virtude de seu poder de predação – alimentando-se até mesmo de outros anfíbios – tornou-se um grande competidor com as espécies locais, causando um declínio das populações nativas, se espalhando com facilidade devido a seu porte, rápida reprodução e mecanismos de defesa, pois são altamente tóxicos. Portanto, podem ocasionar sérios problemas na diminuição da fauna nativa, o que acarretará em impactos ambientais como o desequilíbrio ecológico. Atualmente sabe-se que existem mais exemplares de *R. marina* na Austrália do que na própria América do Sul (Greenlees et al., 2007).

Nos Estados Unidos este animal também foi responsável pela diminuição das populações de anfíbios nativos, sendo que no Hawai o número de indivíduos cresceu de 148 para mais de 100.000 em apenas dois anos (Lannoo, 2005).

## 1.2 PARASITOS DO ANFÍBIO *Rhinella marina*

Uma variedade de microorganismos dentre bactérias, fungos, protozoários e helmintos, tem sido identificados no hospedeiro *Rhinella marina*, no entanto, o número de agentes infecciosos ainda é pequeno (Speare, 1990).

De acordo com o Amphibians Disease (<http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/ampdis.htm>), existem sete grupos de vírus que podem infectar anfíbios e apenas três deles, infectam *Rhinella marina*: o Guatapo Vírus Tipo 6 (GV6), Vírus eritrocítico de anfíbios e o Ranavírus Guatopo.

Estes anfíbios apresentam rotineiramente infecções bacterianas como conseqüências comuns de ferimentos traumáticos em condições ambientais desfavoráveis, ou como infecções secundárias causadas por outros patógenos, como fungos e vírus, e assim como em outros vertebrados a maioria destes microorganismos infectantes é composta por bactérias Gram-negativas (Densmore & Green, 2007).

Speare (1990), registra a septicemia como a principal doença bacteriana que, possivelmente, pode causar morte em anfíbios silvestres. O mesmo autor cita também outras doenças bacterianas de *R. marina* como a Salmonelose, Leptospirose e infecções causadas por *Chlamydia*.

Densmore & Green (2007) ao fazerem uma revisão sobre doenças de anfíbios cita que as infecções fúngicas são muito comuns em vertebrados inferiores, particularmente nos que vivem em ambientes aquáticos, devido as condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento destas infecções.

Speare (1990) também lista os principais fungos isolados em *R. marina* da Amazônia composto por espécies dos gêneros *Basidiobolus*, *Candida*, *Exopiala*, *Fonsecaea*,

*Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Trichiosporon*, sendo que algumas espécies deste gênero são consideradas potencialmente patogênicas até mesmo ao homem.

Segundo o sítio Amphibians Diseases (<http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/ampdis.htm>) um amplo espectro de protozoários pode ser encontrado em anfíbios, no entanto, a maioria aparentemente é comensal do sistema digestivo. Nesta mesma publicação estão listados com 49 espécies de protozoários parasitos de diversos órgãos *R. marina*.

Este anfíbio também possui uma grande variedade de helmintos, muitos nativos das Américas do Sul e Central, mas alguns foram adquiridos em seu novo habitat, uma vez que *R. marina* foi inserido em outras localidades; possibilitando assim, que parasitos de anuros destes locais colonizados se adaptassem ao novo hospedeiro (Dubey & Shine, 2008).

### 1.3 HELMINTOS DE *Rhinella marina*

Como observado, a localização geográfica diversificada destes anfíbios induz o parasitismo por uma variedade de helmintos. Como exemplo disso, um estudo sobre parasitos de *R. marina*, desenvolvido por Barton (1997), mostrou 75 espécies de helmintos neste hospedeiro. Esta helmintofauna seria composta por várias espécies distribuídas em: 36 nematóides, 29 digenéticos, três cestodas, dois acantocéfalos e um monogenético. Comparativamente, Barton (1997) ressalta que *R. marina* da América do Sul possuem 59 espécies descritas de helmintos sendo 28 nematóides, 25 digenéticos, quatro cestodas, um monogenético e um acantocéfalo.

Desde a publicação dessa revisão feita por Barton (1997), novas espécies de helmintos vêm sido descritas, como pode ser observado nos trabalhos de Espinoza-Jiménez et al (2007), Espínola-Novelo & Guillén-Hernández (2008) e Santos et al. (2008). Encontrando

uma helmintofauna composta por 53 nematóides, 41 digenéticos, oito cestoda, seis acantocéfalos, e um monogenéticos.

Dentre os inúmeros helmintos que infectam *R. marina*, o foco deste trabalho está em exemplares de um representante da classe cestoda.

#### 1.4 CESTODA

Dentre os metazoários, o grupo cestoda possui características morfológicas peculiares: a ausência de tubo digestivo e o corpo achatado dorso-ventralmente, semelhante a uma fita e hermafroditismo em sua maioria (Yamaguti, 1959; Bownman & Lynn, 1995; Smyth, 1995).

As formas adultas destes parasitos normalmente são encontradas no tubo digestivo de todas as classes de vertebrados e, ocasionalmente, nos ductos biliares e pancreáticos, pois são órgãos que podem oferecer maior disponibilidade de nutrientes (Yamaguti, 1959; Schmidt & Larrys, 1996).

As formas larvais de cestoda, por outro lado, podem ser encontradas em vários órgãos de hospedeiros vertebrados e invertebrados, embora existam sítios preferenciais de parasitismo (Bownman & Lynn, 1995; Smyth, 1995).

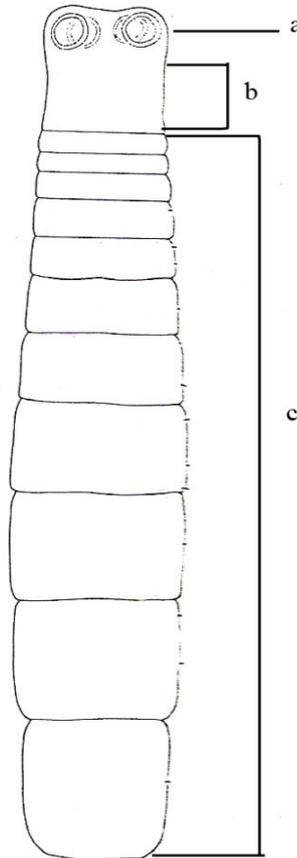
##### **1.4.1 Morfologia Geral dos Cestoda**

###### **1.4.1.1 Caracteres anatômicos**

A maioria das características anatômicas externas e internas são importantes para a classificação taxonômica dos cestodas.

Estes parasitos são divididos em três regiões principais: o escólice, onde são localizados os órgãos de fixação; seguido por uma região não segmentada e indiferenciada, conhecida por “pescoço” e que pode ser curto ou longo dependendo da espécie; uma região

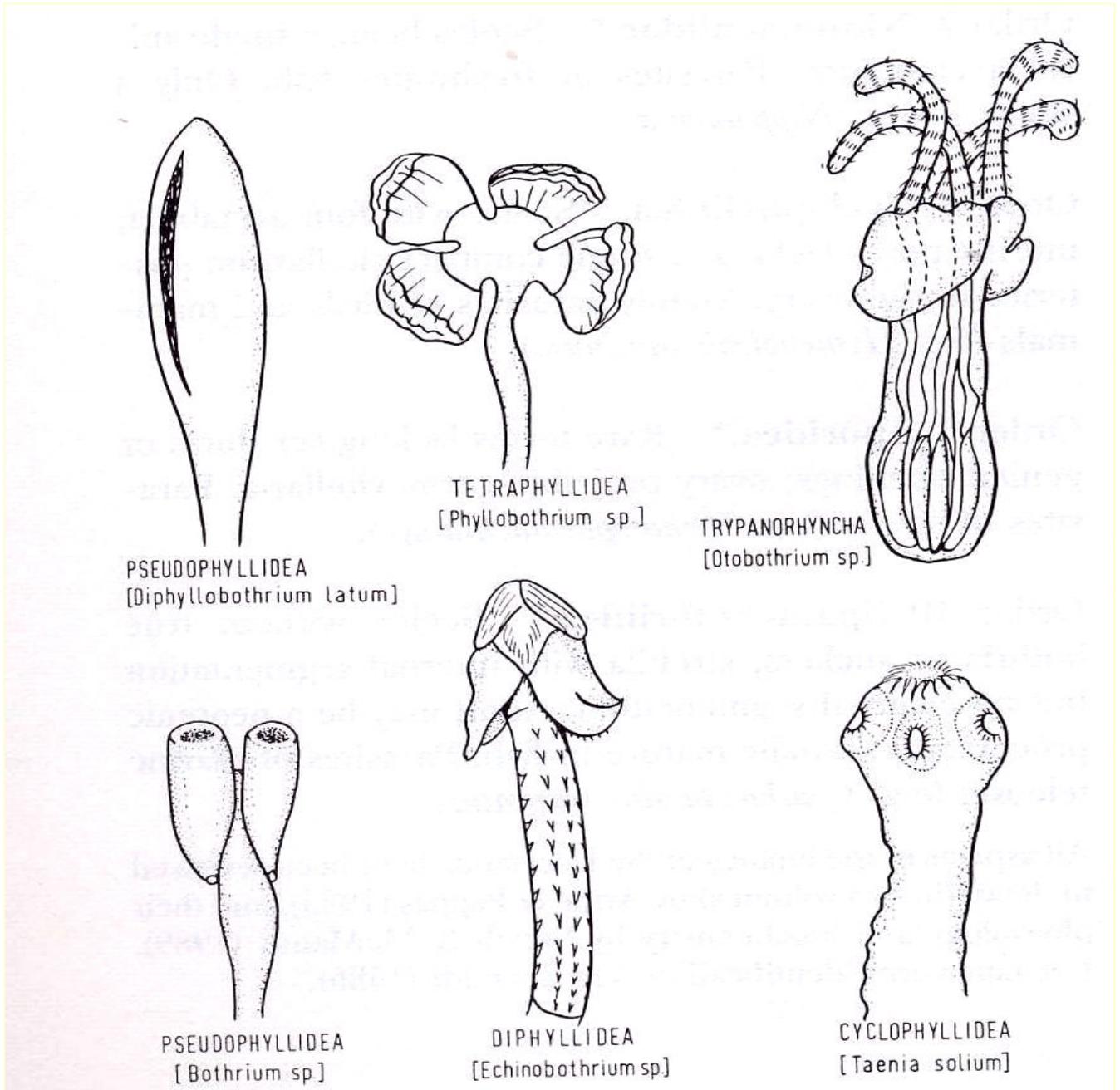
composta por vários segmentos, ou proglotes, denominada de estróbilo (Fig. 5) (Bownman & Lynn, 1995, Smyth, 1995; Schmidt & Larrys, 1996; Rey, 2008).



**Figura 5:** Morfologia externa de um cestóide. Escólice (a), a região do pescoço (b) e o estróbilo (c). Figura adaptada Smyth, 1995

#### 1.4.1.2 Escólice

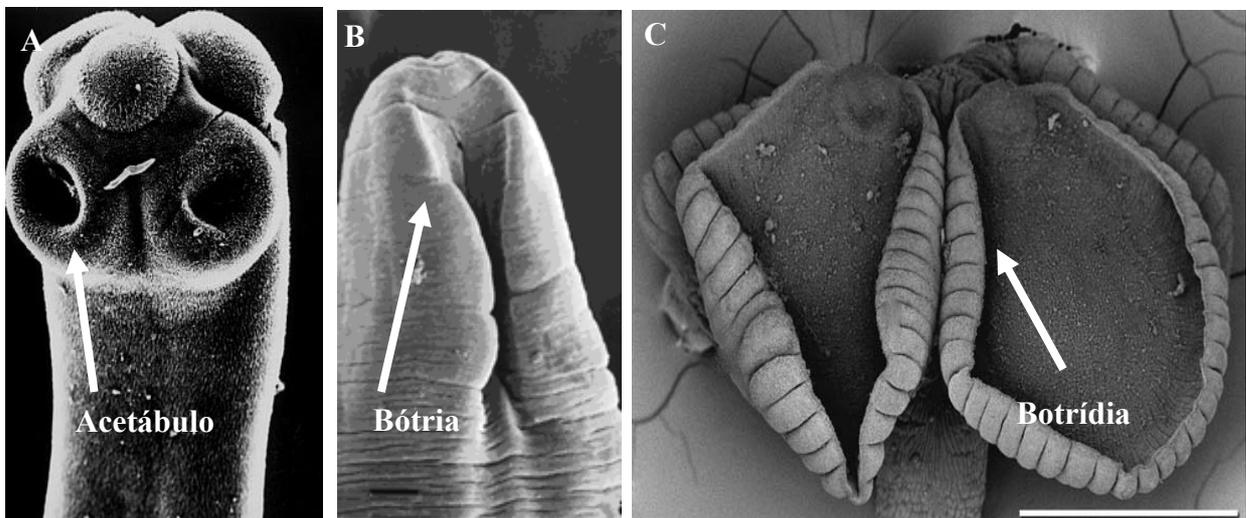
A maioria dos cestoda possui uma “cabeça” ou escólice, localizada na porção anterior do corpo do helminto, e pode ser dotada de uma variedade de estruturas e órgãos, como ventosas, fendas, ganchos, espinhos, glândulas, tentáculos ou uma combinação destes, que auxiliam na manutenção do parasito no órgão parasitado; no entanto, o escólice também pode se apresentar desprovido de estruturas, ou seja, simples (Fig. 6) (Smyth, 1995).



**Figura 6:** Principais tipos de escólices e estruturas fixadoras encontradas em cestoda. (Smith, 1997).

Segundo Smyth (1995) e Schmidt & Larrys, (1996), os órgãos de fixação podem ser de três tipos (Fig. 7):

- **Acetábulos (ventosas):** tipicamente encontradas na ordem Cyclophyllidea, conhecidos como os verdadeiros órgãos de fixação, muito semelhantes as estruturas de fixação dos trematodas digenéticos, podendo ter morfologia externa circular a oval, dotadas de uma forte parede muscular.
- **Bótrias:** são finas fendas com pouca parede muscular, normalmente encontrados nas laterais do corpo do helminto, podendo se tornar um eficiente órgão de fixação e normalmente são encontradas na Ordem Pseudophyllidea.
- **Botrídias:** estruturas musculares, típicas da Ordem Tetracystida, que se projetam do escólice e possuem morfologia semelhante a folhas, com margens finas e flexíveis, podendo ser extremamente maleáveis, móveis ou sésseis.



**Figura 7:** Morfologia dos órgãos de fixação encontrados paras cestodas por Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Escólice de *Silurotaenia siluri*, evidenciando um órgão de fixação deste parasito, o acetábulo (seta). Barra = 100  $\mu\text{m}$  (Scholz et al., 1998). B) Visão lateral de escólice de uma larva plerocercóide de *Diphyllobotrium* spp, mostrando a região das bótrias (seta). Barra = 61  $\mu\text{m}$  (Torres et al., 2000). C) Escólice do cestóide *Orectolobicestus tyleri* parasito de tubarões, com órgão de fixação em forma de botrídias (seta). Barra = 200  $\mu\text{m}$ . (Ruhnke et. al., 2006).

Em relação aos órgãos acessórios de fixação, os cestoda muitas vezes possuem ganchos protéicos, arranjados em um ou mais círculos na porção anterior das ventosas, sustentadas por uma rede muscular interna, formando uma área protusa no ápice do escólice, chamada de rostéolo. A presença, ausência e forma do rostéolo, bem como o arranjo de ganchos, são de grande valor taxonômico (Schmidt & Larrys, 1996).

#### **1.4.1.3 Estróbilo**

O estróbilo é uma estrutura única dentre os metazoários, consistindo de uma seqüência linear de segmentos preenchidos por grupos de órgãos reprodutores de ambos os sexos, chamadas de “genitália”, estes segmentos são denominados proglotes (Smyth, 1995; Rey, 2008).

Os proglotes são externamente delimitados por constrições, e isso fez com que estes parasitos fossem chamados de segmentados. No entanto, não há separação entre tecidos como o tegumento e a musculatura que formam compartimentos entre os proglotes (Schmidt & Larrys, 1996).

Com o crescimento do helminto, novos proglotes devem ser formados e diferenciados, em um processo conhecido como estrobilização, durante o qual, cada segmento vai se diferenciando na porção inicial, “empurrando” o proglote posterior e, nesse processo, os mais posteriores vão se tornando sexualmente maduros (Smyth, 1995).

Com o dobramento do verme ou pareamento entre indivíduos, os proglotes maduros podem então fecundar um proglote vizinho, se autofecundar, ou em alguns casos, fecundar proglotes de outro helminto; após a fecundação, inicia-se a produção de ovos, que irão preencher o útero; este segmento repleto de ovos bem desenvolvidos é chamado então de proglote grávido (Schmidt & Larrys, 1996).

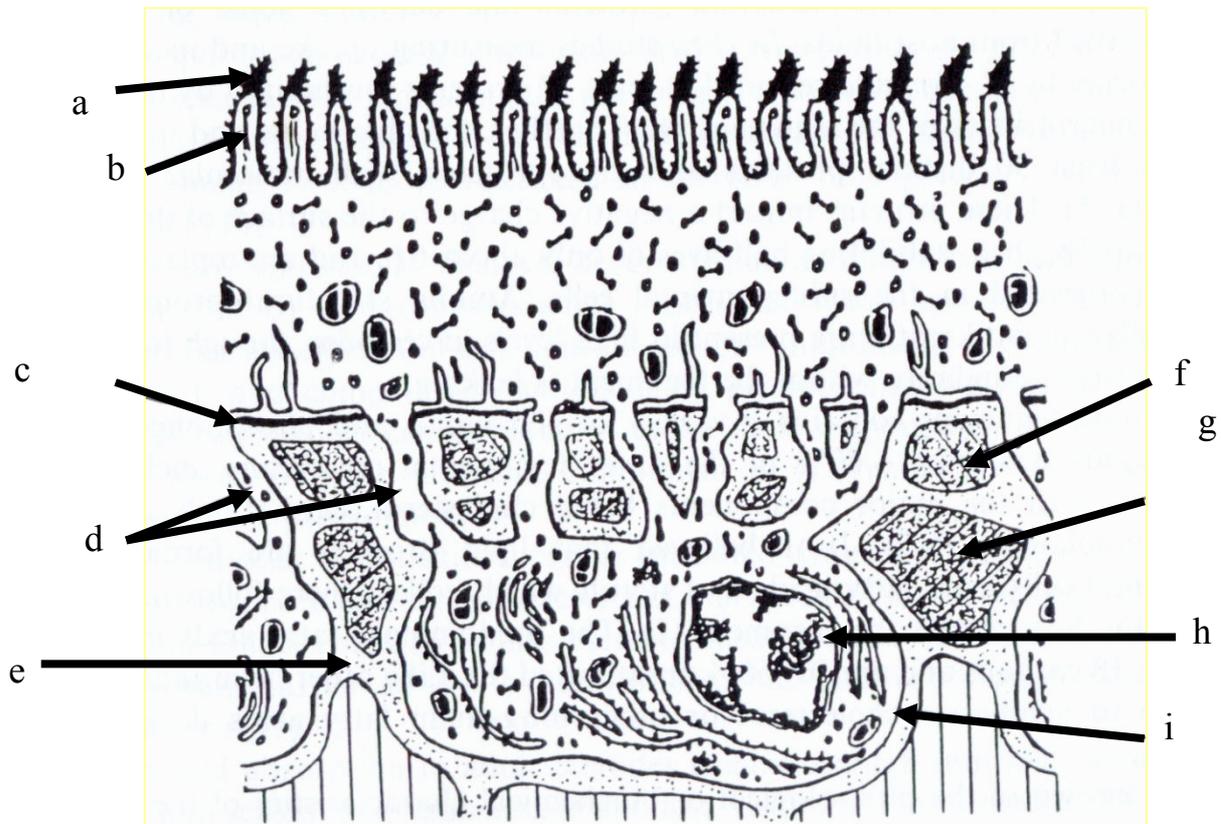
Quando o segmento grávido se encontra na porção mais posterior do estróbilo, ele se destaca sendo liberado no intestino e eliminado através das fezes, um processo chamado de apólise. Em algumas espécies os ovos são liberados do proglote grávido através de um poro uterino, como observado em *Diphylobotrium* spp. (Schmidt & Larrys, 1996).

#### **1.4.1.4 Tegumento**

Durante algum tempo a estrutura de revestimento externo de cestodas e trematodas foi denominada “cutícula”; porém, após muitos estudos ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão, notou-se que se trata de um tecido vivo, metabolicamente ativo e portanto, mais propriamente denominado de tegumento (Tyler & Tyler, 1997; Jones, 1998; Halton, 2004).

Nos cestoda o tegumento consiste de uma camada sincicial externa, formada por extensões citoplasmáticas (citoplasma distal) provindas de uma camada nucleada mais profunda ou interna contendo as células do tegumento ou cítons (citoplasma perinuclear) (Fig. 8) (Smyth, 1995; Schmidt & Larrys, 1996; Halton, 2004).

A estrutura do tegumento dos cestoda é muito semelhante a dos trematóide monogénéticos e digenéticos; contudo, a única e principal diferença entre eles é a presença (nos cestoda) de minúsculas vilosidades chamadas de microtríquias (Schmidt & Larrys, 1996; Tyler & Tyler, 1997; Halton, 2004).

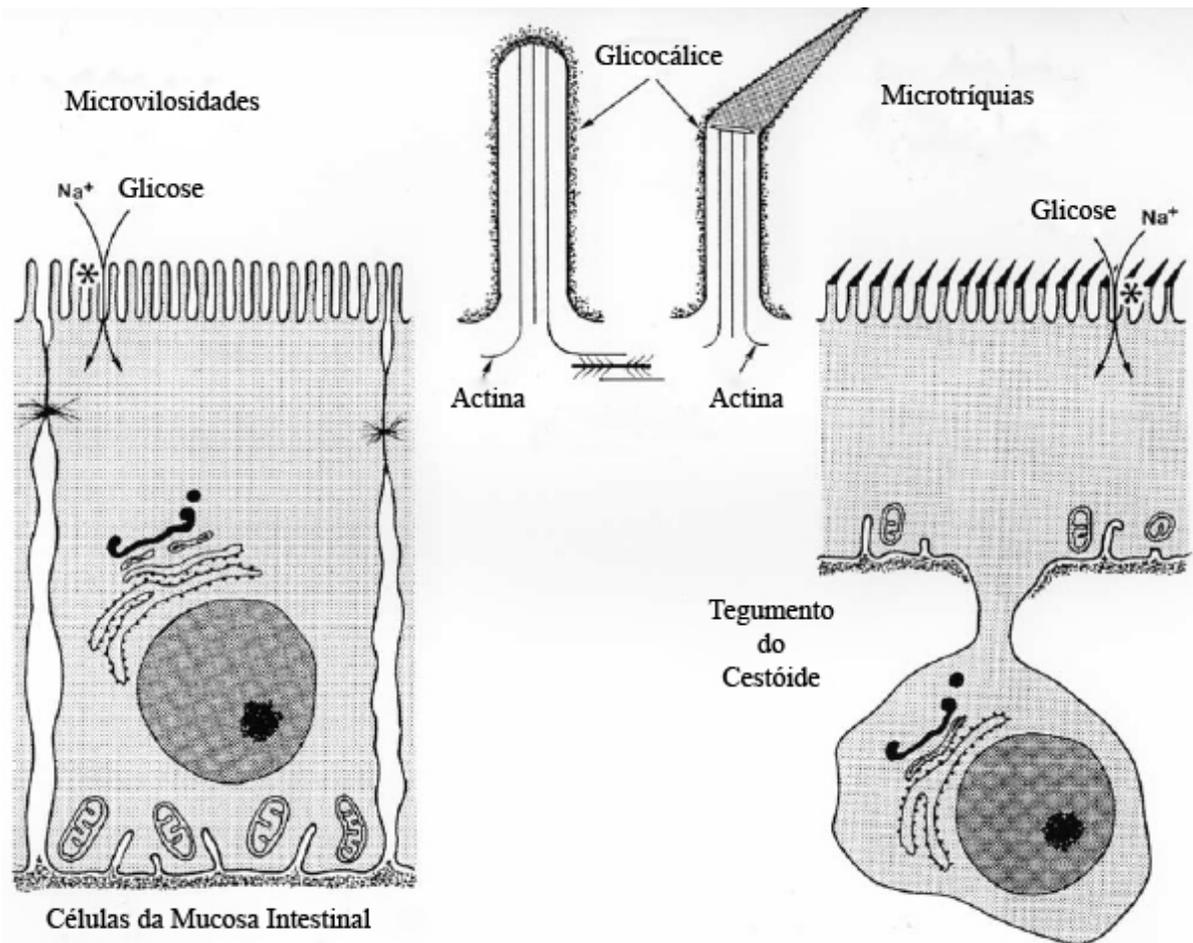


**Figura 8:** Desenho Esquemático do Tegumento de Cestoda. Estrutura sincicial do tegumento de cestoda mostrando o glicocálice (a) que recobre o tegumento, as microtríquias (b), a lâmina basal (c), canais citoplasmáticos (d), células musculares (e), músculos circulares (f), músculos longitudinais (g), núcleo (h), citon (i). Retirada de Smyth (1995).

#### 1.4.1.5 Microtríquias

A principal adaptação para absorção em membranas biológicas é a amplificação da área de superfície de contato através de dobras ou extensões (Smyth, 1995). No intestino humano a “borda em escova” formada pelas microvilosidades amplia 25-30 vezes a superfície de contato, auxiliando assim a absorção de nutrientes da alimentação. Nos cestoda, as microtríquias são estruturas adaptadas com função similar, além de auxiliar a fixação do parasito na mucosa do hospedeiro (Fig. 9) (Halton, 1997; 2004).

A variação da morfologia das microtríquias tem grande valor taxonômico. São organizadas por uma complexa rede de citoesqueleto e revestem a superfície de quase todas as regiões do tegumento de cestodas adultos (Smyth, 1995; Jones, 1998; Palm, 2000; Halton, 2004).



**Figura 9:** Representação do Tegumento dos Cestoda mostrando a similaridade da função das microtríquias com a função das microvilosidades de células intestinais em mamíferos Fonte: Halton, 2004.

Externamente, as microtríquias expressam um glicocálice composto por mucopolissacarídeos e glicoproteínas, tal qual na maioria das células de epitélios absortivos. Este glicocálice influencia na interação do helminto com o hospedeiro e o protege contra enzimas do hospedeiro (Schmidt & Larrys, 1996).

#### **1.4.1.6 Sistema Nervoso**

O centro nervoso dos cestodas está localizado no escólice, com uma complexa rede de gânglios, comissuras e inervações motoras e sensoriais que irão depender do número e complexidade de outras estruturas do escólice (Smith, 1995; Halton et. al., 1998).

Nervos longitudinais estendem-se ao longo do parasito sendo conectados por comissuras intra-proglotes. Nervos menores ramificam-se dos nervos longitudinais inervando a musculatura. Os órgãos reprodutores também são ricamente inervados; enquanto os poros genitais possuem mais terminações nervosas do que qualquer outra região do estróbilo (Smyth, 1995; Schmidt & Larrys, 1996).

#### **1.4.1.7 Sistema muscular**

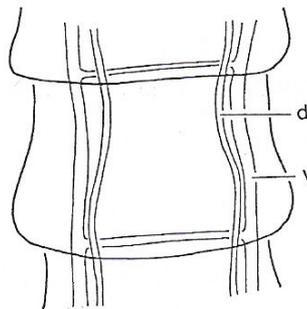
Os cestodas são dotados de um sistema muscular longitudinal, circular e transversal (Smyth, 1995). A musculatura do escólice é complexa, possibilitando uma extensa mobilidade do órgão. O estróbilo apresenta fibras musculares corticais, e uma densa rede muscular na área do parênquima central, normalmente composta de fibras livres. As células ou fibras musculares podem estar dispostas no dorso, no ventre, ou até mesmo dorso-ventralmente, sendo que os padrões de distribuição são muito variáveis (Smyth, 1995; Schmidt & Larrys, 1996; Mair et al. 1998)

#### **1.4.1.8 Sistema Excretor**

O sistema excretor destes parasitos é composto essencialmente por protonefrídios similares aos de trematodas, sendo que as células flama são as unidades excretoras (Schmidt & Larrys, 1996).

Os canais excretores principais percorrem a extensão do estróbilo do escólice para a porção posterior final; estes apresentam-se normalmente em dois pares, dorsolaterais ou dorsoventrais, um em cada lado (Fig. 10). Em alguns casos os canais podem ter um arranjo

mais arrojado, formando uma rede de canais excretores e estes desembocam em uma “bexiga excretora” com um único poro para o meio externo (Smyth, 1995).



**Figura 10:** Disposição dos canais excretores no corpo dos cestoda. Canais dorsais (d). Canais ventrais (v) (Adaptado de Smyth, 1995).

Os principais produtos finais do metabolismo energético de cestoda, cadeia de ácidos orgânicos, são provavelmente excretados através do tegumento (Schmidt & Larrys, 1996).

#### 1.4.1.9 Sistema Reprodutor

Com exceção dos membros do gênero *Dioecocestus*, Família Cyclophyllidea, que são dióicos e dimórficos, os cestoda são monóicos, seguindo o padrão dos platelmintos (Smyth, 1995). Existe uma variação enorme no arranjo estrutural e na distribuição dos órgãos reprodutores em cestodas; usualmente, cada proglote possui um grupo completo de sistema reprodutor masculino e feminino, compondo a “*genitália*”, mas alguns parasitos possuem dois conjuntos de estruturas reprodutoras por segmento e estas variações são importantes para a classificação taxonômica (Schmidt & Larrys, 1996).

Quando o sistema reprodutor amadurece, o esperma é transferido ao oócito, sendo então fecundado (Smyth, 1995). Geralmente o sistema reprodutor masculino amadurece primeiro, produzindo espermatozóides que são armazenados enquanto não há maturação dos ovários, mecanismo chamado de protandria ou androgonia; no entanto, em algumas espécies o ovário amadurece primeiro, ocorrendo assim a protogonia (Schmidt & Larrys, 1996).

O átrio genital é comum para ambas as gônadas, abrindo-se externamente em um gonoporo que pode ser lateral ou central, podendo ser duplo lateral ou central, em algumas espécies o sistema reprodutor é duplo (Yamaguti, 1959).

O sistema reprodutor masculino é composto de testículos, que podem ser pequenos e dispersos ou grande e bem delimitados. De número variável, possuem vasos eferentes, que se unem em um vaso deferente, possuindo vesícula seminal (Yamaguti, 1959).

Os vasos deferentes desembocam na bolsa do cirro, uma estrutura com revestimento muscular onde se encontram os órgãos terminais do sistema reprodutor masculino, como o órgão copulador, denominado de cirro. O cirro é uma estrutura muscular, evaginada durante a cópula, podendo ser dotada de espinhos ou microtríquias (Yamaguti, 1959; Levron, 2008).

Os poros reprodutores normalmente se abrem em uma mesma câmara, o átrio genital, que pode ser simples ou equipado com espinhos, microtríquias, estiletos, glândulas, ou outros acessórios, e o poro do cirro se abre na margem da superfície do tegumento (Bownman & Lynn, 1995; Schmidt & Larrys, 1996).

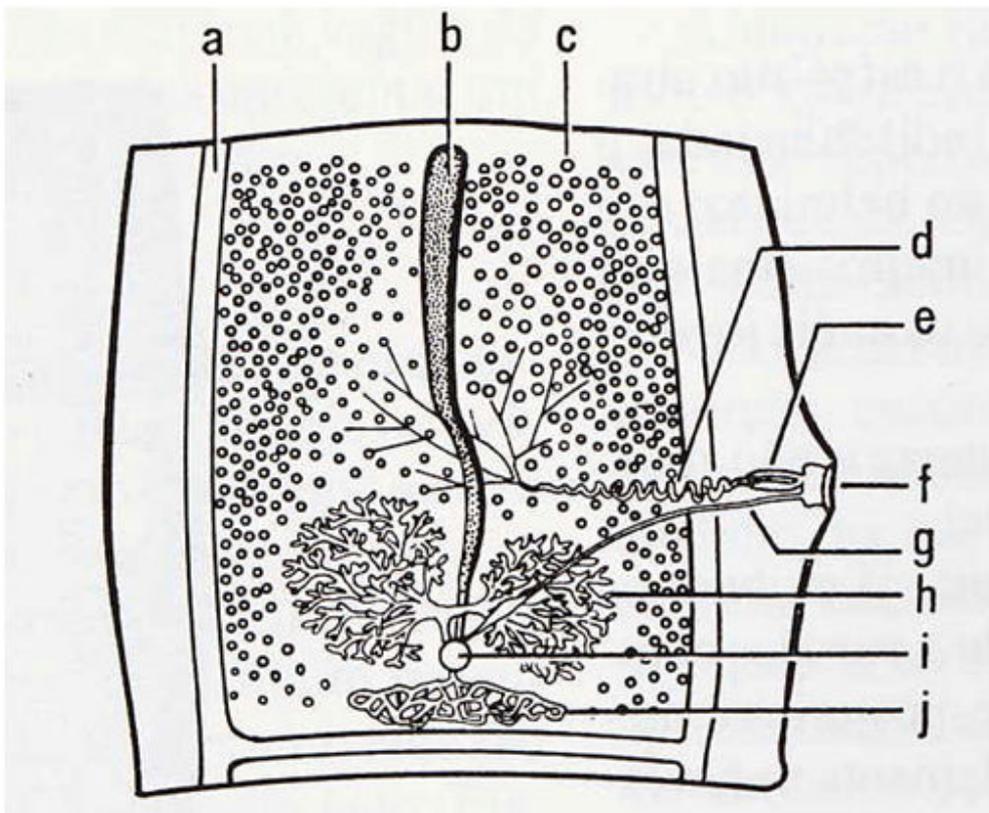
O sistema reprodutor feminino consiste de ovários e suas estruturas acessórias. Os ovários podem ser compactos, lobulados ou simples, alongados de tamanho, largura e localização, dependendo do gênero, normalmente ventral e posterior ao útero (Bownman & Lynn, 1995; Smyth, 1995).

A glândula de vitelo, normalmente próxima ao ovário, irá contribuir para a formação da camada protetora do embrião, podendo ser uma estrutura única e compacta ou com vários padrões (Yamaguti, 1959; Bownman & Lynn, 1995; Smyth, 1995; Schmidt & Larrys, 1996).

O útero também possui morfologia variada, dependendo da espécie, mas consiste de uma estrutura de paredes delgadas; eventualmente, pode se dividir em cápsulas de ovos, ou

“degenerar” ao transferir seus ovos a estruturas conhecidas por órgãos para-uterinos, que se desenvolvem ligados ao útero (Yamaguti, 1959).

Estes formam cápsulas de paredes finas que albergam os ovos e inicialmente encontram-se na medula, mas pode ser preenchido com ovos e eventualmente ocupar todo o proglote enquanto os outros órgãos vão involuindo (Yamaguti, 1959; Jones, 1987; Swiderski, 1997). A Figura 11 representa um esquema geral do sistema reprodutor de cestodas.



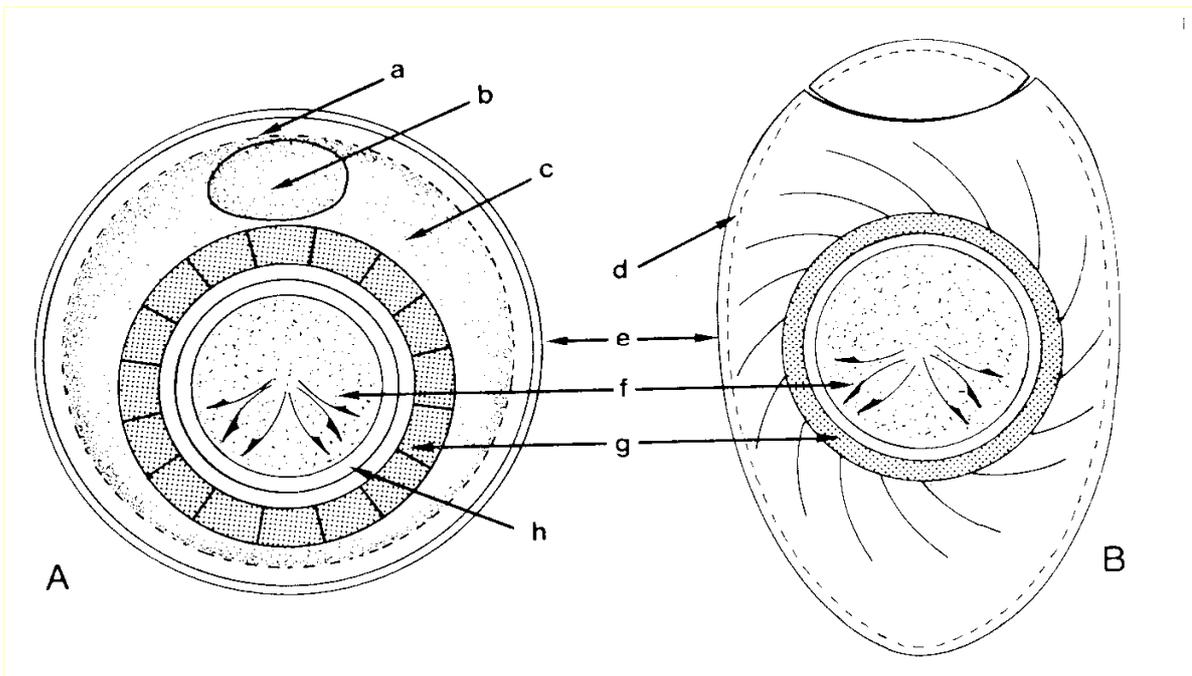
**Figura 11:** Proglote Maduro mostrando as estruturas sexuais do parasito. (a) canais excretores; (b) útero; (c) testículo; (d) vaso deferente; (e) bolsa do cirro (f) poro genital; (g) vagina; (h) ovário; (i) vesícula seminal; (j) folículos vitelínicos. Adaptado de Rey (2008).

#### 1.4.1.10 Ovos

Os ovos variam em estrutura de acordo com o grupo de cestoda do qual está se tratando, podendo se assemelhar com os de trematodas, com ou sem opérculo, e em outros

grupos pode consistir de duas ou três membranas; o envelope externo e a membrana do embrióforo e da oncosfera; a membrana mais interna pode assumir morfologia variada. (Bownman & Lynn, 1995; Schmidt & Larrys, 1996).

Os embriões (oncosfera) podem conter três pares de ganchos, por isso são chamados de embriões hexacantos, mas podem não estar presentes em algumas espécies, assim como podem ter uma membrana ciliada denominada de coracídio (Fig. 12) (Yamaguti, 1959).



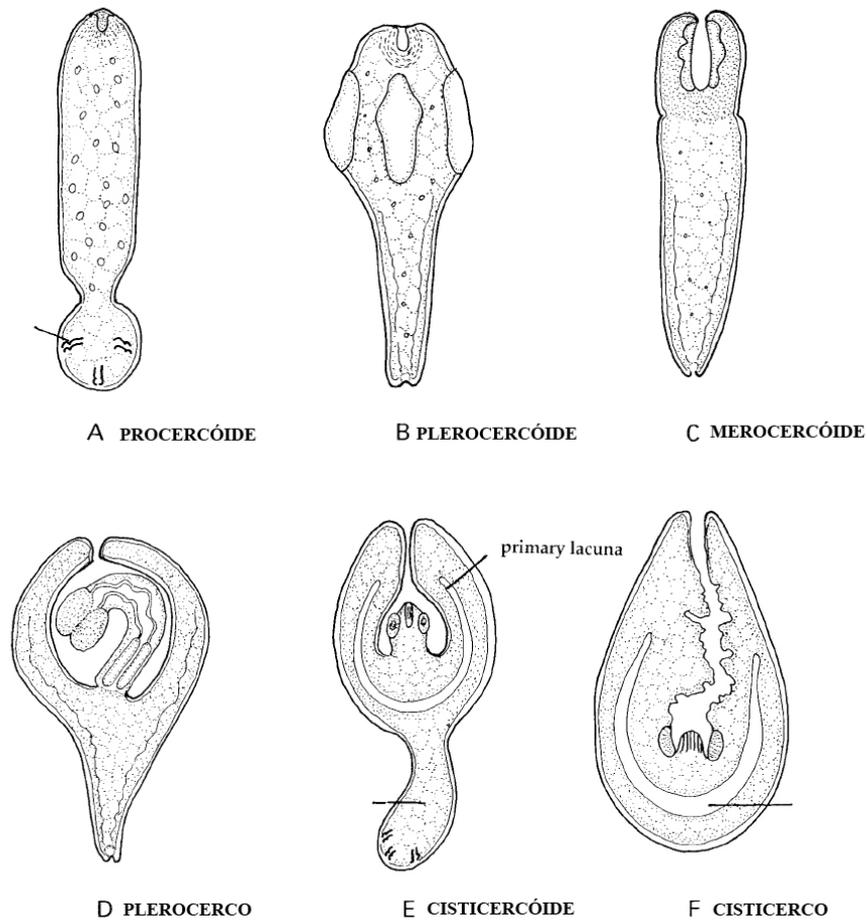
**Figura 12:** Representação dos tipos de oncosferas de cestoda. A) Embrião hexacanto e B) um embrião com coracídio. (a) casca externa, (b) célula de vitelo, (c), envoltório externo, (d) massa vitelínica, (e) cápsula, (f) oncosfera, (g) embrióforo, (h) massa da oncosfera Fonte: Smyth (1995).

### 1.4.2 Ciclo de vida

A maioria dos cestoda necessita de um hospedeiro intermediário para completar o seu ciclo de vida, entretanto pouco se sabe do ciclo destes parasitos; em todo caso, a infecção do hospedeiro intermediário e definitivo ocorre por via oral (Yamaguti, 1959).

Nesses, ocorrem as seguintes etapas: no hospedeiro definitivo após a embriogênese, o ovo resulta na larva, a oncosfera, que é liberada no meio ambiente através das fezes. No hospedeiro intermediário após a ingestão e eclosão da larva no trato digestivo, esta penetra através da mucosa para uma região intestinal; logo após, passa por metamorfose para a forma juvenil (metacestóide) geralmente dotada de escólice. O desenvolvimento do juvenil em forma adulta ocorre tanto no intestino do hospedeiro definitivo, quanto do hospedeiro intermediário, quando o último é ingerido pelo primeiro (Schmidt & Larrys, 1996).

A nomenclatura dos estágios ou formas larvais é controversa e o termo metacestóide normalmente é utilizado para nomear todas as formas larvais de acordo com Schmidt & Larrys (1996). Contudo, Chervy (2002) ao fazer uma revisão sobre a nomenclatura das formas larvais de cestodas, propôs uma terminologia baseada em características morfológicas de acordo com vários autores classificando-as em procercóide, plerocercóide, merocercóide, plerocercóide, cisticercóide e cisticercóide (Fig. 13), sendo que estes dois últimos grupos possuem morfologia muito variada e por isso cada infra-grupo larval recebeu um nome baseado no sufixo do grupo principal.



**Figura 13:** Representação Esquemática das seis formas larvais dos cestoda. Adaptado de Chervy (2008).

### 1.4.3 Taxonomia de Cestodas

A sistemática de cestoda sempre foi muito difícil devido a fragilidade do corpo do helminto (que não possui cutícula protetora e sustentação esquelética) e devido a dificuldade de coleta e obtenção de exemplares, pois normalmente estão localizados no intestino delgado de seus hospedeiros (Mariaux, 1995). Assim, aspectos como o número de hospedeiros, distribuição geográfica, variação intra-específica, número de espécies e definições de taxas de incidência; ainda torna o estudo muito obscuro para muitos grupos (Mariaux, 1995).

Dentro da Classe Cestoda a sub-classe Cestodaria, é composta de helmintos que não são divididos em segmentos, com apenas um grupo de estruturas reprodutoras e escólice imperceptível, e a sub-classe Eucestoda, mais conhecida, estudada e a única que possui maior número de helmintos de interesse médico-veterinário (Smyth,1995; Schmidt & Larrys, 1996).

A sub-classe Eucestoda é então caracterizada por possuir o corpo distintamente dividido em segmentos ou proglotes, um único grupo de sistema reprodutor masculino e feminino por segmento, escólice geralmente presente e larva com embrião hexacanto (Smyth, 1995).

De acordo como NCBI Taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>) os Eucestodas são classificados nas seguintes ordens:

- **Ordens**
  - Caryophyllidae
  - Cathetocephalidea
  - Cyclophyllidea
  - Diphyllidea
  - Haplobothriidea
  - Lecanicephalidea
  - Litobothriidea
  - Nippotaeniidea
  - Proteocephalidea
  - Pseudophyllidea
  - Spathebothriidea
  - Tetrabothriidea
  - Tetraphyllidea
  - Trypanorhyncha

De acordo com Smyth (1995) a maioria dos cestodas parasita animais silvestres, alguns grupos infectam animais domésticos e humanos, possuindo então um interesse em particular. Estes pertencem às Ordens Pseudophyllidea e Cyclophyllidea.

Recentemente Kutcha et al (2008), através de análises morfológicas, biológicas, somadas com dados moleculares e filogenéticos, propuseram a supressão da Ordem

Pseudophyllidea e a criação de duas novas Ordens, a Ordem Botriocephalidea e Diphylobothridea.

#### **1.4.4 Ordem Pseudophyllidea**

A Ordem Pseudophyllidea é um dos principais grupos de cestodas e consiste principalmente de parasitos de peixes, apresentando alguns gêneros parasitando anfíbios, répteis, aves ou mamíferos (Kutcha et al., 2008).

Possuem escólice com duas bótrias longitudinais, que podem ser rasas ou profundas, formando tubos laterais, proglotes curtos e largos, que não se destacam do estróbilo; que usualmente é composto por muitos segmentos podendo chegar a 30 metros de comprimento (Smyth, 1995; Rey, 2008).

As formas larvais procercóides são encontradas em crustáceos, plerocercóides e adultas principalmente em peixes, podendo parasitar anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Yamaguti, 1959).

A Família mais importante nesta Ordem é a Diphylobothridae, com a espécie *Diphylobothrium latum*, causando a Difilobotríase humana; e gênero *Spirometra*, encontra-se agentes causadores da esparganose, como principais parasitos de interesse médico-veterinário (Schmidt & Larrys, 1996; Raether & Hänel, 2003).

Contudo vale ressaltar que de acordo com Yamaguti (1959) foram descritos helmintos das Famílias Cephalochalmydidae e Botriocephalidae parasitando anfíbios.

#### **1.4.5 Ordem Cyclophyllidea**

A Ordem Cyclophyllidea é composta de helmintos que possuem o escólice dotado de quatro ventosas acetabulares, com ou sem rostéolo, o qual pode ser armado de ganchos; parênquima dividido em duas regiões bem distintas, a região cortical e medular, pescoço, e

geralmente uma segmentação bem distinta (Yamaguti, 1959; Bownman & Lynn, 1995; Smyth, 1995).

Os proglotes são normalmente mais largos do que longos, cada um contendo um grupo de órgãos reprodutores, as vezes dois, que compreendem uma glândula vitelógena compacta, ovários simples ou duplos, medulares. Os testículos em número variado, útero de morfologia variada, podendo ser divididos em cápsulas de ovos e as vezes substituídos por órgãos paruterinos, ovos delicados ou com uma rígida camada protetora. Os adultos normalmente parasitas de anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Yamaguti, 1959; Smyth, 1995; Rey, 2008).

• **Famílias:**

- Amabiliidae
- Anoplocephalidae
- Catenotaeniidae
- Davaineidae
- Dilepididae
- Dipylidiidae
- Hymenolepididae
- Mesocestoididae
- Metadilepididae
- **Nematotaeniidae**
- Paruterinidae
- Taeniidae

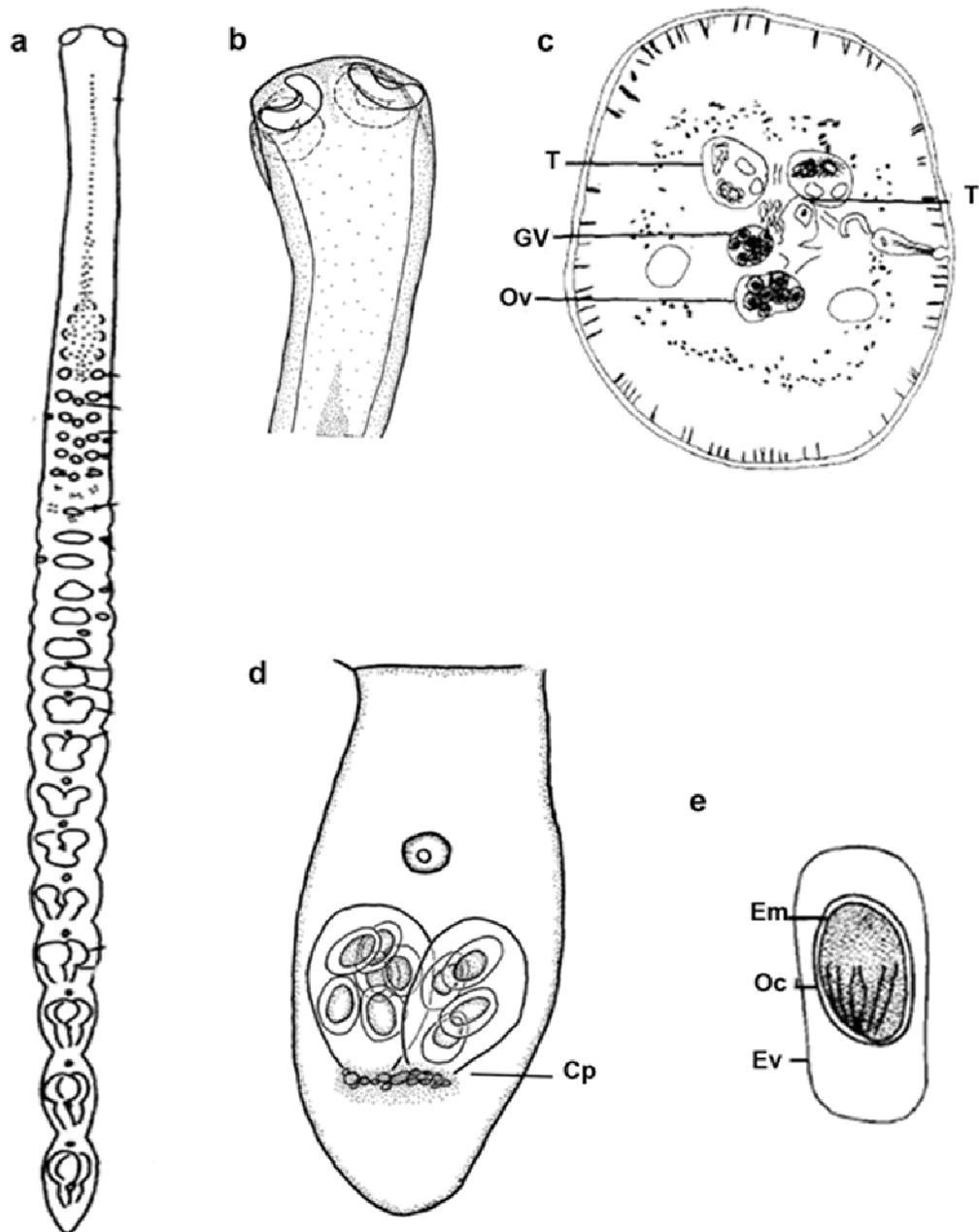
As Famílias de interesse médico-veterinário são: Taeniidae, Hymenolepididae, Dilepididae, Davaineidae e Anoplocephalidae (Smyth, 1995; García et al., 2003; Raether & Hänel, 2003; Rey, 2008).

Em anfíbios, a única Família representativa para esta ordem é a Nematotaeniidae, sendo que indivíduos desta já foram encontrados parasitando *R. marina* e outros anfíbios Bufonidae (Yamaguti, 1959; Stumpf, 1982; Barton, 1997).

### **1.5 A Família Nematotaeniidae**

A Família Nematotaeniidae Lühe, 1910; é composta por parasitos de intestino delgado de anfíbios e répteis, sendo transmitidos por ingestão das proglótides grávidas sem necessidade de passar por hospedeiro intermediário. A auto-infecção é freqüente, podendo-se encontrar hospedeiros com uma grande carga parasitária (Prudhoe, & Bray, 1982).

Estes helmintos possuem escólice simples, sem armação de ganchos, dotados de quatro ventosas e sem órgão apical. Seu estróbilo cilíndrico possui segmentação pouco distinta na porção anterior, apresentando poros genitais laterais alternados irregularmente, poucos testículos, ovário e vitelária compactos (Fig 14) (Douglas, 1958; Yamaguti, 1959; Prudhoe, & Bray, 1982; Stumpf, 1982; Jones, 1987).



**Figura 14:** Características gerais dos cestóides da Família Nematotaeniidae. (a) Visão geral do corpo do parasito que apresenta segmentação distinta apenas na porção posterior; (b) escólice dotado de quatro acetábulos simples sem órgão apical ou espinhos. (c) Os proglotes maduros apresentam poucos testículos (T), um ovário (Ov) e glândula de vitelo (Gv) e a bolsa do cirro (Bc); (d) os proglotes gravídicos tem morfologia elipsóide e apresentam cápsulas paruterinas (Cp) que albergam os ovos; (e) os ovos apresentam três camadas: o envelope externo (Ev), a oncosfera (Oc) e o embrióforo (Em). Fonte: Douglas, 1958.

Os parasitos desta Família Nematotaeniidae foram agrupados anteriormente nas seguintes famílias: Teniidae, Ludwig (1886), Hymenolepididae Ransom (1909) e Lopez-Neyra (1944) e Dilepididae Furmann (1907)

No entanto Lühe em 1910 criou uma nova Família para incluir indivíduos que possuem órgãos paruterinos caracterizados por uma região parenquimatosa localizada na região antero-posterior, ou posterior ao útero, que, durante o desenvolvimento dos proglotes transformam-se gradativamente em cápsulas, denominadas cápsulas paruterinas, que conferem proteção aos ovos, enquanto o útero vai involuindo (Yamaguti, 1959; Stumpf, 1982; Swidersky, 1997).

Segundo Douglas (1958) a Família Nematotaeniidae incluía quatro gêneros: *Nematotaenia* Lühe, 1899; *Cylindrotaenia* Jewell, 1916; *Distoichometra* Dickey, 1921 e *Baerietta* Hsü, 1935.

Contudo, Jones (1987) após uma análise de várias revisões realizadas na Família Nematotaeniidae, observou que alguns exemplares do gênero *Baerietta* pertenciam ao gênero *Cylindrotaenia* e outras espécies pertenceriam a um novo gênero proposto pelo autor. Seguindo esta classificação proposta por Jones (1987) foram descritas 18 espécies na Família Nematotaeniidae, distribuídas em 4 gêneros: *Cylindrotaenia*, *Distoichometra*, *Nematotaenia* e *Bitegmen*.

### **1.5.1 Caracteres Taxonômicos da Família Nematotaeniidae**

Os caracteres utilizados para a distinção dos helmintos pertencentes a esta Família normalmente são: o tamanho do parasito, a morfologia do escólice, ventosas e pescoço, forma dos segmentos nos mais diferentes estágios de desenvolvimento, genitália terminal, as gônadas, o desenvolvimento dos órgãos paruterinos, assim como morfologia dos segmentos pré-grávidos e grávidos (Yamaguti, 1959; Jones, 1987).

Porém, existem muitas dificuldades na taxonomia destes parasitos, pois consistem de helmintos pequenos, com caracteres morfológicos difíceis de identificar e observar; os autores que descreveram os indivíduos desta Família utilizaram caracteres taxonômicos variados e muitos destes não são úteis na classificação (Puga & Franjola, 1983; Jones, 1987).

#### 1.6 ESTUDOS DE BIOLOGIA MOLECULAR DE CESTODA

A sistemática de cestoda sempre foi difícil devido a uma série de razões. Dentre as principais dificuldades destacam-se a pouca acessibilidade do material (normalmente é encontrado apenas um exemplar do parasito por hospedeiro); a fragilidade destes organismos, as descrições pouco detalhadas ou incompletas das espécies, assim como informações conflitantes dentre os autores (Mariaux, 1996; 1998; Campos et al 1998).

Portanto, com a utilização de novas ferramentas e com a obtenção de dados ultraestruturais, de ontogenia e cariotípicos, somam-se técnicas para facilitar e auxiliar na sistemática destes parasitos (Mariaux, 1996).

Assim, os estudos por biologia molecular estão se tornando de grande utilidade na sistemática de cestodas e a aplicação efetiva desta técnica poderá elucidar muitos problemas. Esta ferramenta vem sendo amplamente utilizada desde a década de 90 se tornando um importante elemento em algumas descrições (Mariaux, 1996)

#### 1.7 CESTODA DE ANFÍBIOS E ZOONOSES

O termo Zoonose é comumente utilizado para parasitoses ou doenças de animais que se transmitem eventualmente ao homem (Rey, 2008).

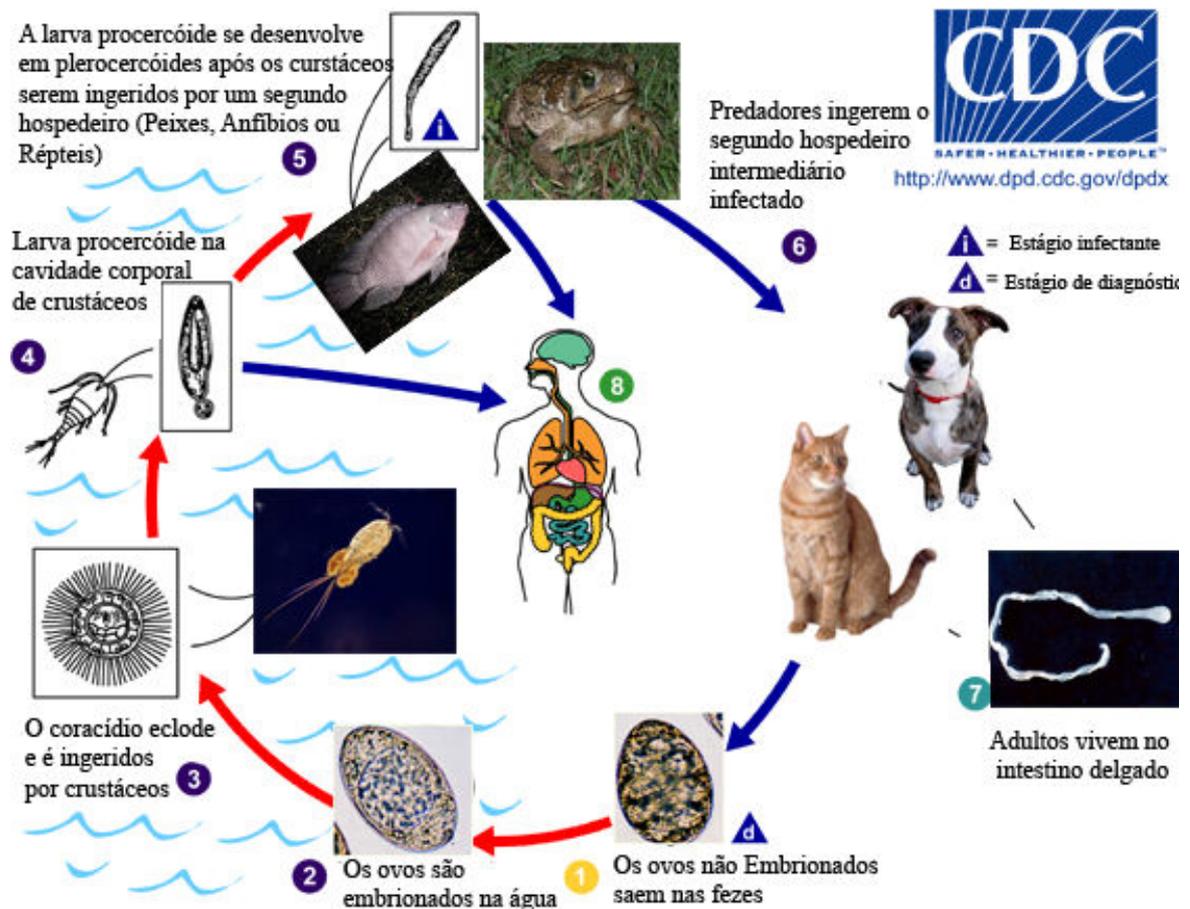
A maioria das infecções por cestodas em humanos envolvem os parasitos específicos do homem. Entretanto, exposições a cestodas de animais podem ocasionar infecções esporádicas, especialmente com espécies de animais domésticos, como o *Dypilidium*

*caninum*, de animais que dividam o mesmo ambiente que humanos, ou ainda que fazem parte da dieta alimentar como carnes de animais silvestres e pescados (Macpherson, 2005; Craig & Ito, 2007).

Dentre as zoonoses conhecidas causadas por cestoda, a esparganose humana é a única registrada até agora que pode ser transmitida por anfíbios (Min, 1990; Schmidt & Larrys, 1996).

A esparganose humana é causada pela larva plerocercóide de helmintos do gênero *Spirometra*, sendo que as possíveis rotas de infecção são: a ingestão de carne crua ou mal cozida de anfíbios, cobras, aves e até mesmo mamíferos como suínos. Também pode ser adquirida pela ingestão de água não tratada contaminada com copépodes infectados com a larva procercóide (Min, 1990; Schmidt & Larrys, 1996; Sim et al, 2002).

O ciclo biológico (Fig. 15) é heteróxico, no qual o primeiro hospedeiro intermediário é representado por um microcrustáceo copépode e o segundo por vertebrados como peixes, répteis, anfíbios e acidentalmente o homem; os espécimes adultos se localizam no intestino delgado de canídeos e felídeos, seus hospedeiros definitivos (Sim et al, 2002).



**Figura 15:** Ciclo de vida de helmintos do Gênero *Spirometra*. Os adultos habitam o intestino Delgado de cães e gatos (7). Os ovos são liberados nas fezes (1) e são embrionados no ambiente aquático (2). O coracídio eclode (3) é ingerido por copépodes. Neste, o coracídio se desenvolve em larva procercóide (4). Após isso um segundo hospedeiro intermediário (Peixes, Anfíbios e Répteis) ingerem estes copépodes infectados, adquirem a larva procercóide. A larva procercóide se desenvolve em plerocercóide no segundo hospedeiro intermediário (5). O ciclo se completa quando um predador (cão ou gato) come um segundo hospedeiro intermediário infectado (6). Os humanos não são hospedeiros definitivos adequados para *Spirometra* spp., mas servem como hospedeiros paratênicos ou segundo hospedeiros intermediários, que ao ingerirem água contaminada com copépodes infectados ou ao consumir carne crua ou mal cozida do segundo hospedeiro intermediário ou paratênico (8) desenvolvem a esparganose. A larva pode viver cerca de 20 anos no organismo humano. (Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov> acessado em 05/05/2010).

Quando as larvas são ingeridas acidentalmente pelo homem, migram do estômago e transformam-se em larvas plerocercóides, normalmente ocupando o tecido subcutâneo na parede abdominal e tórax, podendo atingir região ocular, seios, sistema nervoso central, cavidade oral, sistema urogenital e causar sérias conseqüências (Min, 1990; Schmidt & Larrys, 1996; Choo et al, 2000; Sim et al, 2002; Yoon et al, 2004; Yang et al, 2007).

Os relatos de casos desta zoonose, mostram distribuição mundial, no entanto é considerada endêmica na China, Japão, Taiwan, Korea, Vietnam, Tailândia e outros países do sudeste asiático (Sim et al., 2002). Nos países asiáticos a principal fonte de contaminação é a carne de ofídios (59,8% das infecções) seguida pela ingestão de água contaminada (14,7%) e ingestão de carne de anfíbios infectados (12,7%) (Min, 1990; Sim et al, 2002). Segundo Min (1990) ao serem examinados 348 anuros capturados na Korea, 71,5% estavam infectados com larvas plerocercóides, no entanto cita que alguns autores já encontraram prevalência de 96,7% em algumas localidades do país.

O período de incubação da doença varia dependendo da quantidade de larvas ingeridas; contudo, podem existir outros fatores que influenciem neste período de incubação, podendo ser de dez dias a 20 anos. Em geral, o diagnóstico é realizado após a remoção cirúrgica e confirmação por identificação da larva, ou por exame histopatológico; em alguns casos auxiliados por achados radiológicos e tomografia computadorizada (Min, 1990; Choo et al, 2000; Raether & Hänel, 2003; Yoon et al , 2004).

Alguns cestoda parasitos de anfíbios são considerados causadores zoonoses, como no caso de *Spirometra* sp. (Min, 1990); portanto, estudos taxonômicos das espécies parasitas de *Rhinella marina*, se fazem necessários para auxiliar no estudo da Biologia e do potencial

zoonótico que estas espécies possam oferecer; já que este anfíbio possui hábitos peridomiciliares, tendo assim um estreito contato com a espécie humana (Lannoo, 2005).

Dentre os parasitos em geral, os helmintos da Família Nematotaeniidae são pouco conhecidos e os caracteres morfológicos utilizados para a descrição de novas espécies ainda são muito diversificado (Puga & Franjola, 1983; Jones 1987). Portanto, estudos morfológicos, taxonômicos e moleculares possibilitarão melhor entendimento desse Cestoda, adicionando-se dados a literatura e biodiversidade amazônica.

## 1.9 OBJETIVOS

### 1.9.1 Objetivo Geral:

O presente trabalho tem como objetivo realizar a descrição taxonômica de cestoda intestinais de *Rhinella marina* de Belém-PA.

### 1.9.2 Objetivos Específicos:

- Descrever os aspectos morfológicos de cestodas intestinais, utilizando técnicas de microscopia de luz de rotina para estudo de helmintos, histologia e descrição estrutural com uso de câmara clara.
- Descrever os aspectos morfológicos da topografia de superfície de cestodas intestinais, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura.
- Descrição de aspectos morfológicos de órgãos internos dos cestodas através da utilização de técnicas de reconstrução tridimensional
- Descrever as características moleculares e filogenéticas, utilizando técnicas de reação em cadeia da polimerase e seqüenciamento gênico de cestodas parasitos de *R. marina*.
- Realizar uma comparação das metodologias utilizadas para o estudo de cestodas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DE HOSPEDEIROS E AMOSTRAS DE PARASITOS:

Durante o período de Janeiro de 2009 a Dezembro de 2009 foram coletados e necropsiados no Laboratório de Biologia Celular e Helminologia- ICB – UFPA, 20 exemplares de *Rhinella marina* provenientes dos bairros do Coqueiro e Guamá (Fig. 16 e 17),. Os anfíbios foram levados ao Laboratório de Biologia Celular e Helminologia (LBCH) entre 8 e 12 horas após a captura, anestesiados com Tiopental Sódico<sup>®</sup>, pesados em balança analítica FILIZOLA<sup>®</sup> e após necropsiados por sangria total.



**Figura 26:** Imagem de satélite das regiões de coleta dos hospedeiro. Adaptado de Google Maps acessado em 21/06/2009.



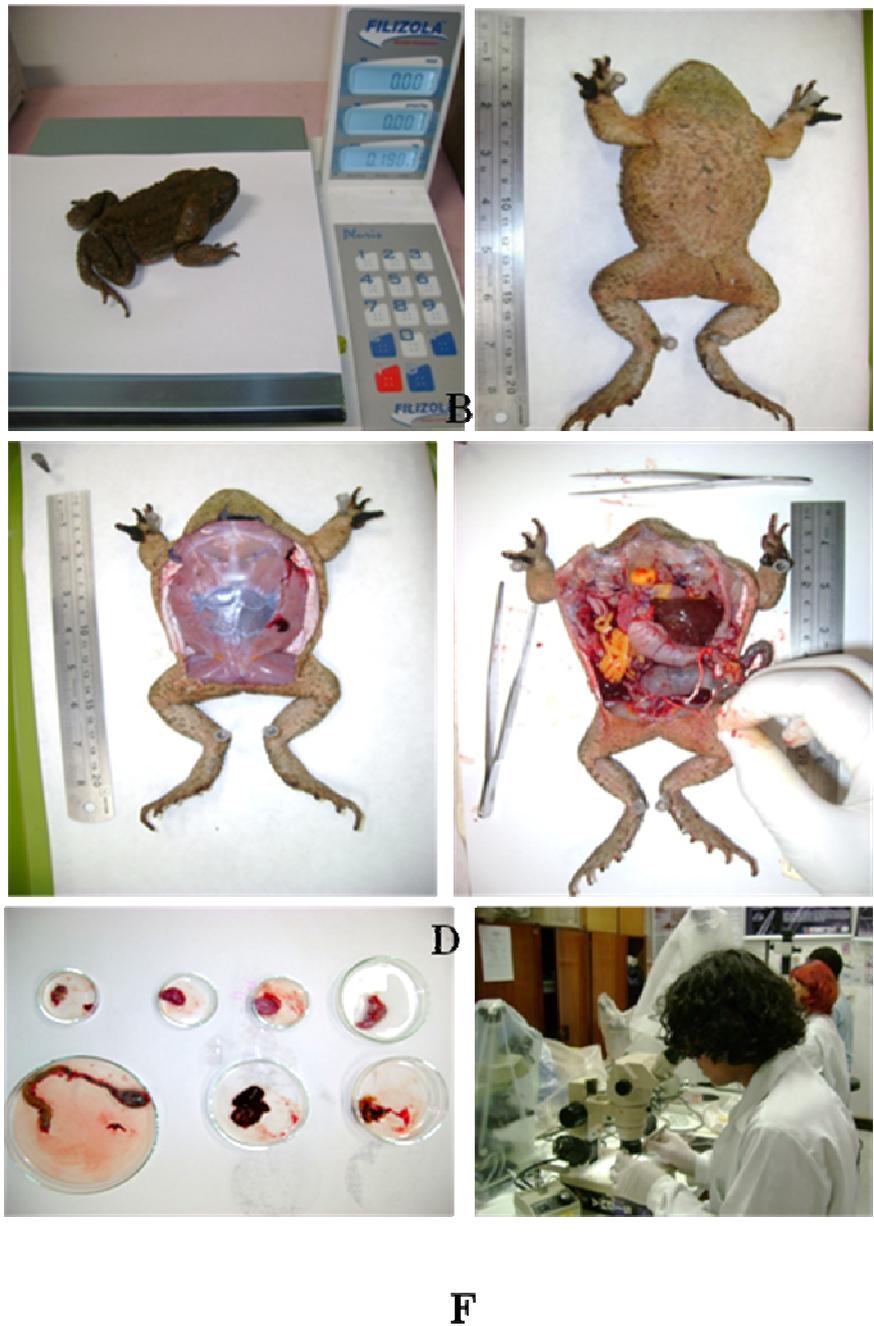
**Figura 17:** Área de Coleta dos hospedeiros, no entorno do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, no Guamá.

O sexo dos hospedeiros foi definido com a retirada de pequenos fragmentos da gônada e observação ao microscópio entre lâmina e lamínula, com solução salina para a análise dos gametas.

Durante a necropsia todos os órgãos internos foram dissecados, especialmente os segmentos do sistema digestivo foram isolados por barbantes antes de serem retirados e colocados em placas de Petri, individualizadas, contendo solução tampão fosfato salino a p.H 7,4 (PBS). Posteriormente todos os órgãos foram analisados minuciosamente em estereomicroscópio ZEISS objetivas de 1,6x e 4x para a busca de helmintos. Uma seqüência de etapas básicas para necropsia pode ser observado na Figura 18.

Este trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) e recebeu o parecer favorável para o seu desenvolvimento como consta no Anexo I.

18



**Figura 18 :** Etapas para o procedimento de necrópsia do Hospedeiro. (a) Após a captura, o animal é levado ao LBCH - ICE- UFFA, onde é anestesiado e pesado; (b-c) logo após as patas são fixadas em posição "anatômica", para abertura da cavidade peritoneal. (d) Em seguida a exposição dos órgãos internos, estes são isolados com barbantes e separados em placas de Petri contendo solução tampão PBS (e), para análise individual de cada órgão sob um estereomicroscópio (f).

Todos os parasitos encontrados foram coletados, separados de acordo com a classe a qual pertenciam (nematoda, cestoda, digenéticos e monogenéticos) em placas de Petri, limpos com auxílio de pincéis, lavados em PBS p.H 7,4 e fixados com solução fixadora de A.F.A (ácido acético glacial a 2%, formaldeído a 3% e 95% de etanol 70 GL) ou com Glutaraldeído 2,5% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M pH 7,2, durante 24 horas de acordo com a técnica de processamento e análise microscópica específica.

Dados referentes ao hospedeiro, assim como número de helmintos encontrados e a localização destes, foram registrados em uma ficha de necropsia apropriada, criada para o laboratório (Anexo II).

Dentre as várias classes encontradas, os cestodas foram medidos e logo após foram fixados com A.F.A frio em compressão para microscopia de luz e análise direta, enquanto que, para análise histológica e para microscopia eletrônica de varredura, foram fixados sem compressão, em Glutaraldeído 2,5% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH7.2 e A.F.A frio respectivamente.

## 2.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Os helmintos fixados comprimidos entre lâminas foram utilizados para análise direta ao microscópio de luz, sem passar por uma infiltração em resina. Após a fixação, os exemplares foram submetidos a uma desidratação série etanólica crescente consistindo nas seguintes etapas: Etanol 70%, Etanol 80%, Etanol 90%, Etanol 100% por 10 minutos em cada etapa.

Após a desidratação do material, as amostras foram coradas com Corante Carmim<sup>®</sup> durante 30 minutos. A diferenciação da coloração foi realizada com o Etanol clorídrico por

tempo variável, mediante acompanhamento ao microscópio. Após esta etapa procedeu-se a lavagem em Etanol 100% com posterior clarificação em Salicilato de Metila<sup>®</sup>.

Para a confecção de lâminas permanentes os parasitos foram então clarificados em Xileno<sup>®</sup> e montados com Entellan<sup>®</sup> entre lâmina e lamínula, para coleção a helmintológica segundo Moraes Neto et al. (1998).

A fim de se identificar os caracteres taxonômicos e realizar a morfometria dos exemplares, esses foram analisados em Microscópio Olympus BX 41 equipado com câmara clara (sem ajuste de Zoom) no LBCH – ICB – UFPA, para realização de desenhos em profundidade dos exemplares. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX41 com sistema de captura de imagens do Laboratório de Citogenética Humana – ICB – UFPA.

Os caracteres morfológico gerais foram mensurados nos exemplares comprimidos, corados, clarificados e montados diretamente entre lâmina e lamínula, considerando-se: diâmetro do escólice; diâmetro das ventosas; comprimento e largura de proglotes maduro; pré-grávido, grávido; complexos paruterinos; cápsulas paruterinas; ovos; bolsa do cirro; ovários e testículos; comprimento do cirro, comprimento dos ganchos do embrião e espessura do tegumento.

Excetuando-se o valor do comprimento total do verme, mensurado em centímetros, os demais dados foram calculados em micrômetros e todas as medidas foram tabuladas em Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>.

### 2.3 PROCESSAMENTO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Alguns exemplares de cestoda foram fixados sem compressão em Glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato 0,1 M p.H 7,2. Para isto foram selecionados e analisados em um estereomicroscópio, afim de se identificar regiões de proglotes maduros, que foram

processados para inclusão em dois tipos de resina: Parafina e Histoiresina<sup>®</sup>. Este processamento destinou-se à análise histológica das estruturas internas dos cestodas, com a finalidade de identificar parâmetros importantes para a determinação da espécie.

### **2.3.1 Método de Processamento e Inclusão em Parafina**

As amostras foram desidratadas em série etanólica crescente: Etanol 50%, Etanol 70%, Etanol 80%, Etanol 90% (30 minutos em cada etapa); mais três etapas de 30 minutos em Etanol Absoluto (Etanol 100%).

Nesta última etapa o material foi levado ao Laboratório de Pesquisa “Carlos Azevedo” (LPCA) do Instituto de Patologia Animal (ISPA) na Universidade Federal Rural da Amazônia, coordenado pelo Professor Dr. Edilson Matos, onde foi diafanizado em dois “banhos” de Xileno<sup>®</sup> por 30 minutos para posterior infiltração em parafina.

A etapa de infiltração em parafina consistiu da passagem das amostras em três “banhos” de infiltração em parafina líquida, em uma estufa a 60° C, por 30 minutos cada. A inclusão em blocos foi realizada com o auxílio da Estação de Inclusão em Parafina Microm EC 350, que consiste de duas mesas, uma contendo superfícies aquecidas que auxiliam na inclusão e outra para o resfriamento dos blocos, em formas de aço e suportes de acrílico.

Os blocos polimerizados foram cortados em micrótomo rotativo manual para realização de cortes transversais e longitudinais seriados de 5 - 10 µm dos proglotes maduros. Os cortes foram afixados em lâminas de microscopia, etiquetadas e levadas à estufa para secagem e aderência. As lâminas foram então desparafinizadas em uma bateria de Xileno II, Xileno I, Etanol 100%, Etanol 90%, Etanol 80%, Etanol 70% respectivamente em um tempo de 5 minutos em cada etapa.

Após rehidratação as lâminas foram coradas com Hematoxilina, por cinco minutos lavadas em água destilada, contra-coradas com Eosina por seis minutos, diferenciadas em Ácido acético e posteriormente, lavadas em água.

Logo após, seguiu-se a desidratação em bateria etanólica crescente iniciada em Etanol a 70% e finalizada em Xileno II, por cinco minutos em cada solução.

As lâminas coradas foram então montadas com Entellan<sup>®</sup> e analisadas ao microscópio Olympus BX 41, equipado com câmara clara (sem ajuste de zoom) para obtenção de desenhos das estruturas internas em microscópio Olympus BX41 com sistema de captura de imagem do Laboratório de Citogenética Humana –ICB – UFPA.

### **2.3.2 Método de Inclusão em Histoiresina<sup>®</sup>**

Algumas amostras de proglotes maduros não comprimidos passaram por uma desidratação em série etanólica crescente: Etanol 30 %, Etanol 50%, Etanol 70%, Etanol 80%, Etanol 90%, por 30 minutos em cada etapa; mais duas etapas de 15 minutos e uma de 30 minutos em Etanol 100%. Após a desidratação foi realizada a fase de infiltração em resina, utilizando Etanol-Histoiresina<sup>®</sup> em diferentes proporções: Etanol P.A.-Histoiresina<sup>®</sup> 3: 1, Etanol P.A. -Histoiresina<sup>®</sup> 2:1, Etanol P.A. -Histoiresina<sup>®</sup> 1:1 e Histoiresina<sup>®</sup> pura. Cada etapa de infiltração durou 24 horas.

Para inclusão, os fragmentos de helminto foram inseridos em placas de nove poços de molde de inclusão preenchidos com uma solução de Histoiresina<sup>®</sup>-Hardner em uma proporção 15:1. Após 2 horas de repouso em temperatura ambiente até o início da polimerização da resina, os moldes foram levados a uma estufa a 40°C por dois dias, para a finalização da polimerização.

Os blocos polimerizados foram então cortados em secções de 2-3 µm de espessura, com navalhas de vidro, em ultramicrótomo LEICA EM UC6 no Laboratório de Biologia

Estrutural – ICB – UFPA. Os cortes seriados foram capturados um a um e então colocados ordenada e sequencialmente, numa lâmina de microscopia; corados diretamente com Azul de Toluidina 1% levemente aquecido; lavadas em água corrente e observados em microscópio Olympus BX 41 equipado com câmara clara para realização de desenhos dos detalhes internos dos proglotes maduros. Imagens destes cortes também foram capturadas em microscópio Olympus BX41 com sistema de captura de imagens do Laboratório de Citogenética Humana – ICB – UFPA.

#### 2.4 ANÁLISE POR CONTRASTE POR INTERFERÊNCIA DIFERENCIAL (DIC) E RECONSTRUÇÃO TRI-DIMENSIONAL

Lâminas confeccionadas para análise direta de helmintos inteiros corados e montados com Entellan<sup>®</sup> foram fotografadas em diferentes planos focais em um Microscópio Nikon Eclipse E600 equipado com Contraste por Interferência Diferencial (DIC) pertencente ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ – PR. Após a captura das imagens, estas, foram analisadas e processadas no programa CombineZP<sup>®</sup> onde foram tratadas para realizar a sobreposição dos planos focais das imagens, possibilitando uma composição em profundidade para melhor observação de estruturas.

Para o estudo tri-dimensional das estruturas internas do parasito, todas as secções seriadas longitudinais de proglotes maduros dos helmintos incluídos em Histoiresina<sup>®</sup> foram fotografadas, ordenada e sequencialmente. Para isto, utilizou-se um microscópio Olympus BX 41 equipado com capturador de imagens do Laboratório de Citogenética Humana – ICB - UFPA.

Após a captura, as imagens foram alinhadas no programa RECONSTRUCT<sup>TM</sup><sup>®</sup> Versão 1.1.0.0 1996-2009, desenvolvido pelo *Institutes of Health and the Human Brain*

*Project.* Após reconstrução tri-dimensional das estruturas, alguns *frames* foram capturados para análise.

## 2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Exemplares de cestodas fixados sem compressão foram pós-fixados em OsO<sub>4</sub> a 1% por 2 horas. Em seguida o material foi lavado em tampão PBS a p.H 7,4, até a retirada do excesso de sais e pós-fixador. Posteriormente, a amostra foi submetida à desidratação em série crescente de Etanol a partir de Etanol 50%, até a secagem em Ponto Crítico de CO<sub>2</sub> no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Museu Paraense Emilio Goeldi.

Os helminto foram montados cuidadosamente em “stubs” (suportes metálicos de alumínio) e metalizado com uma camada de 5 Å de ouro.

Para análise utilizou-se ao Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 5310, ajustado a uma potência de 15 kV, do Laboratório de Ultraestrutura Celular “Herta Mayer” do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ, em colaboração com o Laboratório de Biologia de Helmintos “Otto Wucherer”.

Também se utilizou o Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 1450VP, ajustado com a mesma potência no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Museu Paraense Emilio Goeldi.

## 2.6 BIOLOGIA MOLECULAR

Alguns exemplares de cestodas foram fixados em etanol absoluto e armazenados em Freezer -20°C posteriormente submetido a extração de DNA pelo ChargeSwicth gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), que consiste na lise dos tecidos dos helmintos, seguido do acréscimo de Beads Magnéticas<sup>®</sup> que, por afinidade eletrostática, se ligam ao DNA extraído. O tubo contendo esta mistura é colocado em um

suporte contendo um ímã, que atrai as Beads Magnéticas<sup>®</sup> ligadas ao DNA para um lado do tubo, ficando livres os restos celulares que podem ser retirados do tubo com consecutivas etapas de lavagens, seguido da mudança de pH do meio, que provoca a mudança de carga das Beads Magnéticas<sup>®</sup>, que se desligam do DNA.

Após extração do DNA, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação parcial do 18S rDNA utilizando dois pares de *primers* 2880 (5' - CTGGTTGATCCTGCCAGTAG - 3') e B (5' - CCGCGGCTGCTGGCACCAGA-3'); CES1 (5'-CCAGCAGCCGCGGTA ACTCCA-3') e CES2 (5'-CCCCCGCCTGTCTCTTTTGAT-3'). Os protocolos foram baseados em Skerikova e Scholz. (2001). Estas técnicas foram realizados nos Laboratório de Virologia – ICB – UFPA e Laboratório de Polimorfismos de DNA – ICB - UFPA.

Para isso a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com 2 µL de DNA, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de dNTP, PCR *buffer* 1X (20 mM Tris – HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1 U de Taq polimerase e 10 µM de cada *primer*, em um volume final da reação de 20 µL.

Para os *primers* 2880 e B a PCR foi processada com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 seg), hibridização (60°C por 30 seg) e extensão (72°C por 30 seg), e uma etapa final de 72°C por sete minutos e para os *primers* CES1 e CES2 a temperatura de hibridização utilizada foi de 62°C. A visualização de bandas foi feita após eletroforese em gel de agarose 1,0 %, impregnado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta, utilizando Padrão de Pesos moleculares de 1000 pb.

O DNA amplificado foi submetido ao seqüenciamento automático. A metodologia utilizada é baseada na síntese bioquímica da cadeia de DNA através do método de Sanger e

Russell (1977) usando-se o kit da ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems, USA*) conforme instruções do fabricante. As fitas de DNA foram seqüenciadas com ambos os pares de *primer*, utilizando-se o equipamento de seqüenciamento automático ABI 310 DNA Sequencer (*Applied Biosystems, USA*). O alinhamento dos pares de bases foi realizado por meio do programa BIOEDIT versão 5.0.9.

Posteriormente essas seqüências foram submetidas ao *GenBank* com o número de acesso HM185494 (Anexo IV).

As seqüências foram analisadas pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* BLAST (Zhang et al 2000), com objetivo de comparar as seqüências obtidas no presente estudo com as demais disponíveis no *GenBank*.

### 3. RESULTADOS

Dos 20 anfíbios necropsiados todos estavam parasitados com pelo menos uma das classes de helminto e 60% dos animais encontravam-se infectados por cestodas da Família Nematotaeniidae. A intensidade parasitária dos cestodas variou de 5-150 helmintos por hospedeiro.

Os cestodas estavam presentes na porção inicial do intestino delgado dos anfíbios, aderidos entre as vilosidades intestinais como demonstrado na Figura 19 (c,d e) .

Pelo aspecto geral do corpo, inicialmente os parasitos foram confundidos com nematóides, uma vez que possuíam morfologia filiforme muito semelhante. No entanto, após observações mais aprofundadas de outras características como: a presença de ventosas, segmentação, ainda que quase indistinta, perceptível apenas na porção posterior do corpo desses helmintos e características evidenciadas por microscopia de luz, foi possível classificá-los então como um Cestoda.

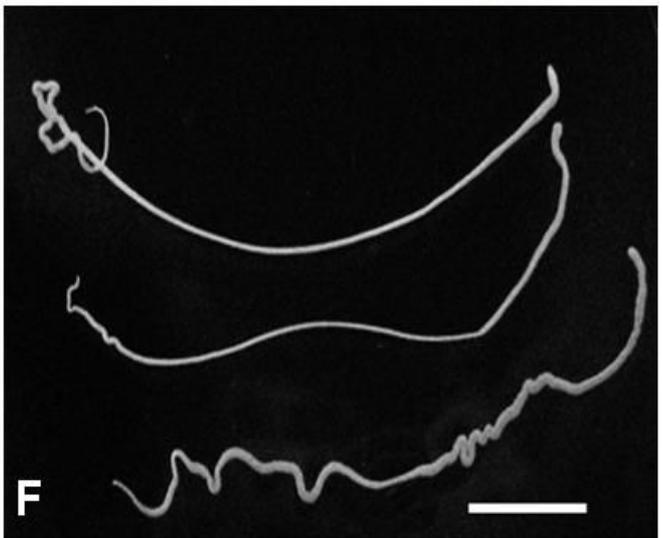
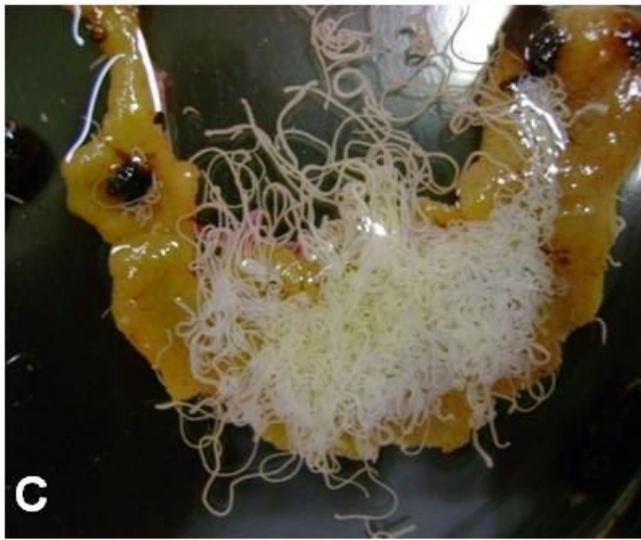
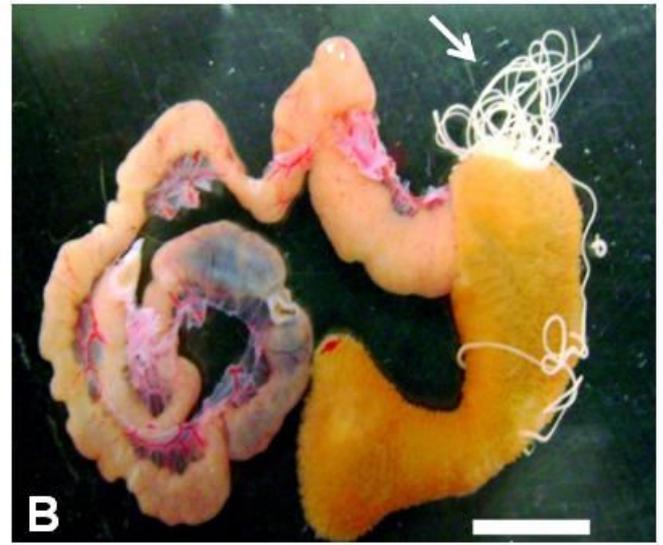
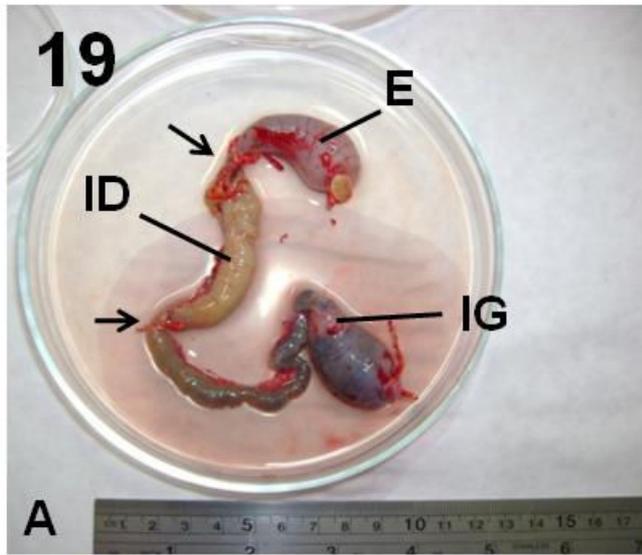
Os segmentos gravídicos são menores e se desprendem do corpo do helminto com muita facilidade, podendo ser encontrados ao longo do intestino delgado e intestino grosso do hospedeiro. Ao serem observados em estereomicroscópio estes proglotes tem morfologia e movimentação similar a trematodas, em virtude do tamanho e movimentação própria.

Em torno de 30 exemplares de cestodas foram comprimidos e preparados para análise por microscopia de luz e fotomicrografados (Figs. 20 e 21). Desses, dez foram selecionados para realizar os desenhos morfométricos (Fig. 22).

Para histologia, foi analisado amostras de proglotes maduros incluídos em parafina e Histoiresina<sup>®</sup> (Figs. 23 a 26). Em torno de 20 exemplares foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (Figs. 27 a 30).

**Figura 19: Aspectos anatômicos observados por estereomicroscopia de Cestoda parasita de intestino delgado de *Rhinella marina* de Belém-PA.**

- **Figura 19 a:** Segmento do tubo digestivo do hospedeiro evidenciando-se o estômago (E), o intestino delgado (ID) e o intestino grosso (IG); cada segmento está isolado por barbantes (setas), onde se observa uma área mais dilatada e esbranquiçada em virtude da presença de numerosos cestodas no intestino delgado.
- **Figura 19 b:** Intestino delgado do hospedeiro parcialmente aberto evidenciando o momento da saída ativa dos parasitos (seta). Barra = 1cm.
- **Figura 19 c:** Visão macroscópica de numerosos cestodas parasitos no intestino delgado após a abertura do órgão. Notar a dificuldade de discernir os cestodas individualmente.
- **Figura 19 d:** Detalhe do aglomerado de cestodas aderidos à mucosa. Aumento 10X.
- **Figura 19 e:** Fotografias em Estereomicroscópio mostrando detalhes do ponto de inserção de alguns parasitos na mucosa intestinal. Aumento 20X.
- **Figura 19 f:** Detalhes do comprimento total de três parasitos após terem sido retirados do intestino delgado do hospedeiro. Barra = 1cm.



### 3.1 ANÁLISES POR MICROSCOPIA DE LUZ

Todas as estruturas de interesse taxonômico foram medidas e os valores mensurados em micrômetros, sendo que no texto a seguir a citação da média é seguida pelo desvio padrão ( $\pm$ ) e os valores menores e maiores são apresentados entre parênteses. Os valores obtidos por espécime podem ser visualizados na Tabela 2.

O comprimento médio do corpo foi de 7 cm ( $n= 20$ ); o escólice simples com diâmetro médio de  $541,46 \mu\text{m} \pm 100,06$  ( $411,40 - 611,53 \mu\text{m}$ ) dotado de quatro ventosas acetabulares com comprimento médio de  $151,09 \mu\text{m} \pm 16,30$  ( $134,79 - 167,40 \mu\text{m}$ ) e largura média de  $110,93 \mu\text{m} \pm 6,81$  ( $134,79 - 167,40 \mu\text{m}$ ) e “pescoço” longo. O escólice é desprovidos de órgão apical e rostéolo (Figs. 20 a-b, 22 a). Possui o estróbilo cilíndrico, com segmentação bem visível apenas nas porções dos proglotes pré-grávidos e grávidos (Figs. 21 a; c-f; 22 b-g;).

A porção inicial do estróbilo apresenta os proglotes imaturos, nos quais a segmentação é muito indistinta, assim como os primórdios de aparelhos reprodutores (Figs. 20 c; 22 b).

Os proglotes maduros são mais largos do que longos, apresentam comprimento médio de  $38,66 \mu\text{m} \pm 2,98$  ( $35,68 - 41,64 \mu\text{m}$ ) e largura média de  $333,83 \mu\text{m} \pm 10,14$  ( $323,69 - 343,97 \mu\text{m}$ ) e a distinção entre estes segmentos maduros é pouco definida (Figs 19 c-f). Os proglotes maduros possuem estruturas sexuais bem desenvolvidas, dotados de dois poros genitais, um em cada lateral (Figs. 20 d-f).

Através dos cortes transversais seriados de amostras processadas para inclusão em parafina e Historesina<sup>®</sup>, e desenhos de reconstrução de órgãos internos por câmara clara, foi possível observar a presença de dois aparelhos reprodutores por proglote maduro (Figs 21i;

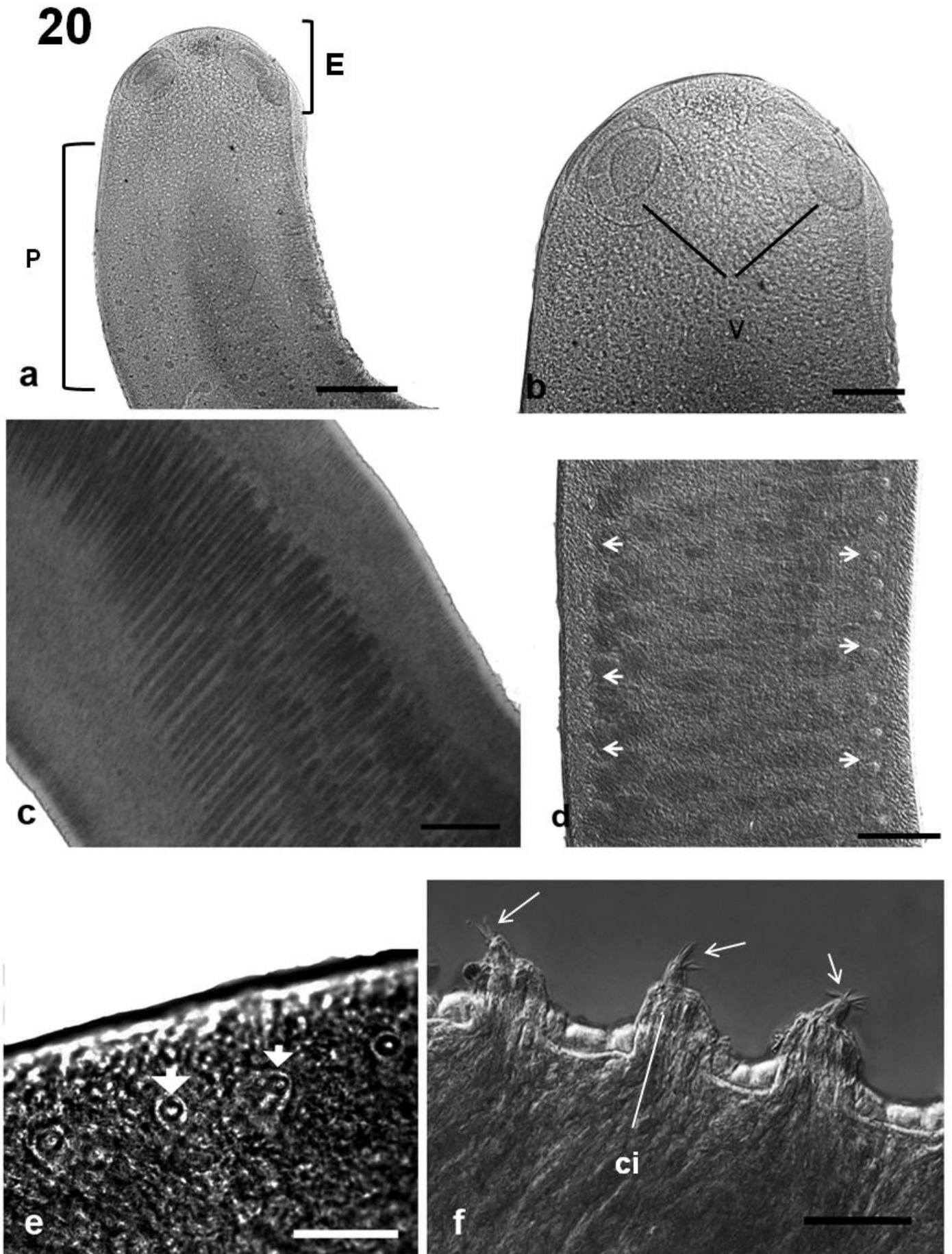
22c; 23 a-c; 24 a-b; 25 a-b). Observou-se dois testículos medulares, variando de esféricos a ovais com comprimento médio de  $88,11 \mu\text{m} \pm 27,15$  ( $60,96 - 115,27 \mu\text{m}$ ) e largura média de  $31,52 \mu\text{m} \pm 4,16$  ( $27,35 - 35,68 \mu\text{m}$ ); dois ovários com comprimento médio  $48,23 \mu\text{m} \pm 4,56$  ( $43,67 - 52,79 \mu\text{m}$ ) e largura  $38,47 \mu\text{m} \pm 6,29$  ( $32,17 - 44,77 \mu\text{m}$ ). Também são observadas duas glândulas vitelógenas de diâmetro médio de  $30,38 \mu\text{m} \pm 4,73$  ( $25,64 - 35,11 \mu\text{m}$ ) (Figs. 22c. 22i; 23 a-b); sendo uma estrutura para cada grupo de aparelhos reprodutores. Os canais excretores estão localizados na porção ventral e possuem o diâmetro de  $19,45 \mu\text{m} \pm 3,63$  ( $15,82 - 23,08 \mu\text{m}$ ) (Figs. 22c-i; 23 a-c). O tegumento destes proglotes possui espessura média de  $17,06 \mu\text{m} \pm 3,36$  ( $13,69 - 20,42 \mu\text{m}$ ).

Tabela 1: Dados morfométricos de 10 espécimes de Cestoda parasito de intestino delgado de *R.marina* de Belém - PA. Todos os valores se encontram em micrômetros.

| Parâmetros Medidos                        | Ind 01 | Ind 02 | Ind 03 | Ind 04 | Ind 05 | Ind 06 | Ind 07 | Ind 08 | Ind 09 | Ind 10 | Média  | Desvio Padrão |
|-------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|
| <b>VENTOSA (Largura)</b>                  | 112,07 | 122,00 | 109,67 | 105,67 | 114,00 | 101,33 | 99,33  | 113,00 | 113,33 | 119,00 | 110,94 | 6,81          |
| <b>VENTOSA (Comprimento)</b>              | 157,67 | 159,67 | 126,67 | 139,00 | 150,00 | 128,67 | 157,67 | 183,00 | 144,00 | 164,67 | 151,10 | 16,31         |
| <b>ESCOLICE (Diâmetro)</b>                | 496,00 | 509,33 | 400,00 | 406,67 | 476,00 | 586,67 | 618,67 | 373,33 | 706,67 | 541,33 | 511,47 | 100,07        |
| <b>PROGLOTE MADURO (Largura)</b>          | 344,00 | 333,00 | 322,66 | 322,66 | 354,00 | 346,00 | 333,33 | 328,00 | 326,66 | 328,00 | 333,83 | 10,14         |
| <b>PROGLOTE MADURO (Comprimento)</b>      | 41,33  | 33,33  | 38,66  | 37,33  | 41,33  | 36,00  | 38,66  | 36,00  | 40,00  | 44,00  | 38,66  | 2,98          |
| <b>PROGLOTE PRÉ-GRÁVIDO (Largura)</b>     | 857,89 | 842,10 | 868,42 | 842,10 | 889,47 | 868,42 | 789,47 | 789,42 | 892,10 | 894,73 | 853,41 | 36,63         |
| <b>PROGLOTE PRÉ-GRÁVIDO (Comprimento)</b> | 98,73  | 78,94  | 81,57  | 76,13  | 86,50  | 84,20  | 84,20  | 76,62  | 64,42  | 76,31  | 80,76  | 8,42          |
| <b>PROGLOTE GRÁVIDO (Largura)</b>         | 217,53 | 169,48 | 388,96 | 200,00 | 230,52 | 238,31 | 242,86 | 227,92 | 256,49 | 347,40 | 251,95 | 63,16         |
| <b>PROGLOTE GRAVIDO (Comprimento)</b>     | 216,88 | 374,68 | 201,30 | 225,32 | 348,05 | 345,45 | 240,26 | 239,61 | 213,64 | 191,56 | 259,67 | 65,08         |
| <b>ÓRGÃO PARUTERINO (Largura)</b>         | 34,21  | 31,00  | 31,00  | 47,36  | 31,00  | 28,31  | 36,84  | 30,05  | 31,00  | 42,10  | 34,29  | 5,79          |
| <b>ÓRGÃO PARUTERINO (Comprimento)</b>     | 65,78  | 105,26 | 68,42  | 100,00 | 100,00 | 110,52 | 110,52 | 100,00 | 110,52 | 89,47  | 96,05  | 15,76         |
| <b>CÁPSULA PARUTERINA (Largura)</b>       | 71,43  | 62,66  | 61,04  | 50,32  | 70,45  | 64,94  | 57,79  | 56,49  | 74,68  | 60,06  | 62,99  | 7,14          |
| <b>CÁPSULA PARUTERINA (Comprimento)</b>   | 77,92  | 72,98  | 67,53  | 51,95  | 77,92  | 60,71  | 59,74  | 70,13  | 73,05  | 60,06  | 67,20  | 8,29          |
| <b>CANAIS EXCRETORES (Diâmetro)</b>       | 13,30  | 16,00  | 17,30  | 26,60  | 21,33  | 21,33  | 21,33  | 16,00  | 20,00  | 21,33  | 19,45  | 3,63          |
| <b>TEGUMENTO (Espessura)</b>              | 18,66  | 13,33  | 13,33  | 20,00  | 14,66  | 13,33  | 24,00  | 18,66  | 16,00  | 18,66  | 17,06  | 3,36          |
| <b>BOLSA DO CIRRO (Largura)</b>           | 18,94  | 17,89  | 18,42  | 19,47  | 18,42  | 16,84  | 15,78  | 17,36  | 17,89  | 18,94  | 18,00  | 1,05          |
| <b>BOLSA DO CIRRO (Comprimento)</b>       | 39,47  | 42,10  | 40,00  | 38,42  | 40,52  | 36,84  | 39,47  | 41,57  | 41,05  | 41,05  | 40,05  | 1,50          |
| <b>CIRRO (Comprimento)</b>                | 15,78  | 15,68  | 16,05  | 18,15  | 15,52  | 15,52  | 16,31  | 18,15  | 17,10  | 17,10  | 16,54  | 0,97          |
| <b>TESTÍCULOS (Largura)</b>               | 29,20  | 29,80  | 34,40  | 30,50  | 31,80  | 38,90  | 27,20  | 29,20  | 25,90  | 38,30  | 31,52  | 4,17          |
| <b>TESTÍCULOS (Comprimento)</b>           | 90,90  | 97,40  | 94,10  | 88,90  | 90,97  | 116,00 | 103,80 | 90,90  | 84,40  | 103,80 | 88,12  | 27,15         |
| <b>OVÁRIO (Largura)</b>                   | 43,50  | 33,10  | 32,40  | 50,00  | 37,66  | 32,46  | 42,00  | 30,51  | 46,10  | 37,01  | 38,47  | 6,30          |
| <b>OVÁRIO (Comprimento)</b>               | 55,19  | 46,10  | 38,90  | 49,35  | 48,70  | 48,70  | 51,94  | 50,64  | 51,94  | 40,90  | 48,24  | 4,56          |
| <b>GLÂNDULAS VITELÓGENAS (Diâmetro)</b>   | 29,20  | 37,60  | 25,90  | 24,00  | 29,20  | 28,90  | 32,40  | 25,30  | 38,90  | 32,40  | 30,38  | 4,74          |
| <b>ONCOSFERA (Largura)</b>                | 11,84  | 10,26  | 11,84  | 10,52  | 10,52  | 11,84  | 11,86  | 12,36  | 11,81  | 13,41  | 11,63  | 0,91          |
| <b>ONCOSFERA (Comprimento)</b>            | 18,68  | 16,31  | 18,15  | 15,52  | 18,94  | 16,31  | 18,75  | 17,36  | 18,15  | 17,10  | 17,53  | 1,13          |
| <b>EMBRIÓFORO (Largura)</b>               | 13,15  | 11,84  | 15,52  | 12,89  | 13,42  | 13,68  | 12,36  | 13,15  | 13,15  | 18,15  | 13,73  | 1,73          |
| <b>EMBRIÓFORO (Comprimento)</b>           | 21,57  | 20,26  | 19,47  | 18,42  | 22,36  | 1,73   | 21,84  | 21,84  | 18,42  | 22,36  | 18,83  | 5,88          |
| <b>ENVELOPE EXTERNO (Largura)</b>         | 15,78  | 18,42  | 16,31  | 13,94  | 18,68  | 14,74  | 18,15  | 16,84  | 14,47  | 17,13  | 16,45  | 1,61          |
| <b>ENVELOPE EXTERNO (Comprimento)</b>     | 31,57  | 27,63  | 26,57  | 29,21  | 33,94  | 34,47  | 33,94  | 26,31  | 26,31  | 31,57  | 30,15  | 3,18          |
| <b>GANCHOS</b>                            | 8,94   | 9,89   | 7,63   | 6,57   | 8,84   | 8,05   | 7,52   | 6,57   | 6,57   | 7,89   | 7,85   | 1,07          |

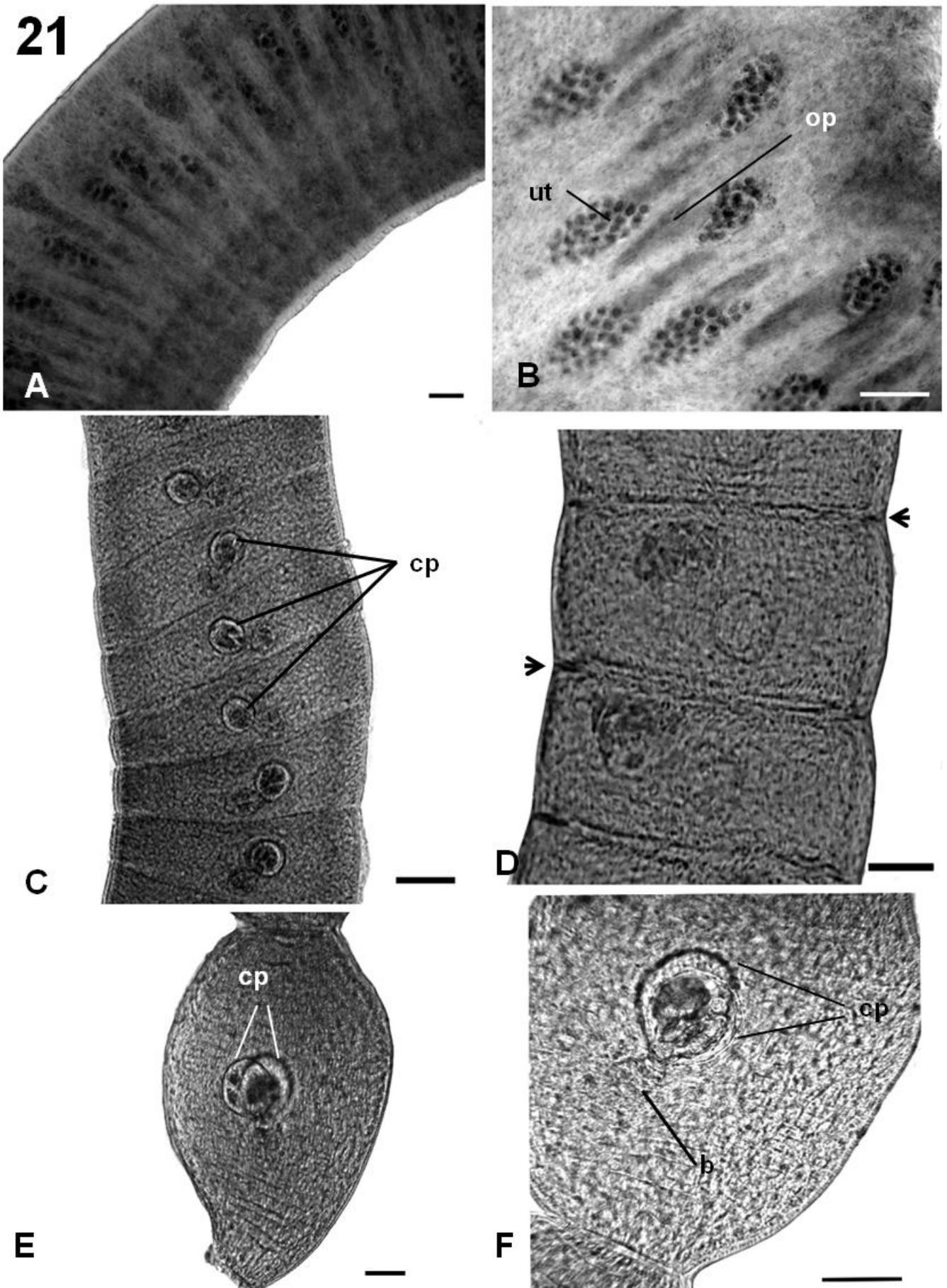
**Figura 20: Microscopia de Luz de campo claro e por Contraste por Interferência Diferencial (DIC) do cestoda de *R. marina* de Belém- PA, fixados por compressão, corados e clarificados para análise.**

- **Figura 20 a:** Visão geral do escólice (E) e pescoço (P) do cestóide. Notar as quatro ventosas e a ausência de órgão apical e pescoço longo e sem sub-divisões. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 20 b:** Detalhes das ventosas (V) simples sem espinhos do escólice do cestóide. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 20 c:** Visão dorso-ventral do estróbilo na região dos proglotes imaturos, nos quais não é possível observar os órgãos internos bem formados. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 20 d:** Imagem por DIC, após tratamento com o programa *CombineZp* da visão dorso-ventral do estróbilo na região dos proglotes maduros, onde se observam os poros genitais (**cabeça de seta**). Notar a difícil distinção das estruturas internas. Barra = 30  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 20 e:** Visão latero-lateral do proglote maduro, onde observa apenas os poros genitais (**cabeça de seta**). Barra = 30  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 20 f:** Detalhe em DIC das laterais do proglote evidenciando a região onde são observados alguns cirros evertidos (Ci). Destaque para a morfologia dos cirros que apresentam espinhos (**setas**) na porção terminal. Barra = 30  $\mu\text{m}$ .



**Figura 21: Microscopia de Luz de diferentes regiões do estróbilo de cestoda de *R. marina* com destaque para proglotes pré-grávidos e grávidos.**

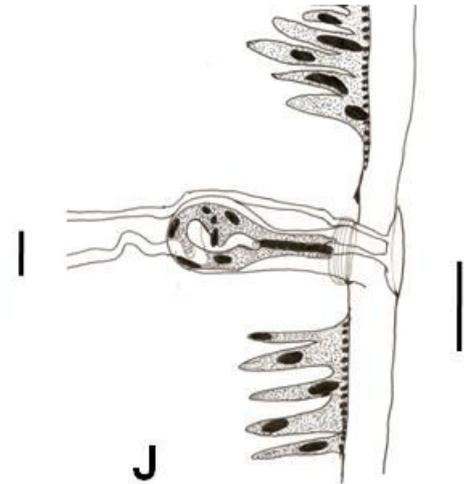
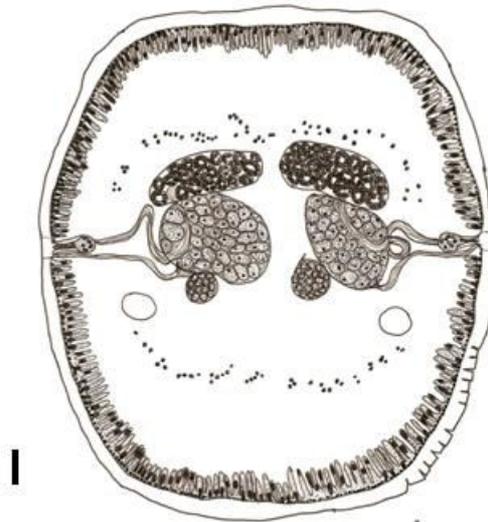
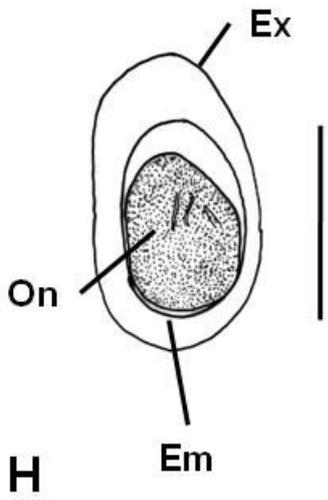
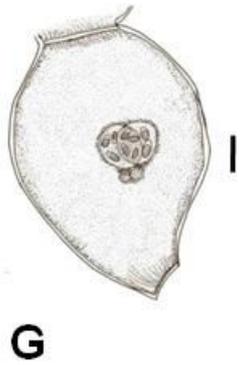
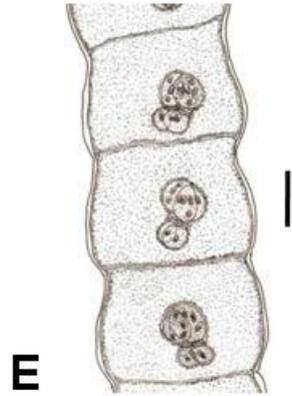
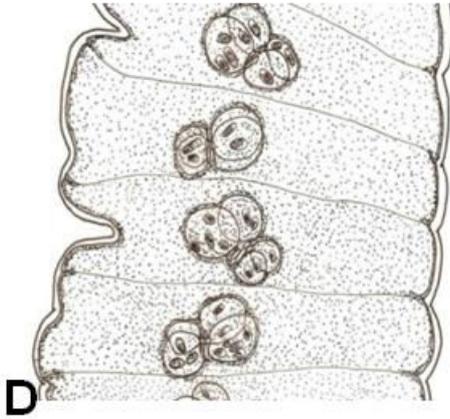
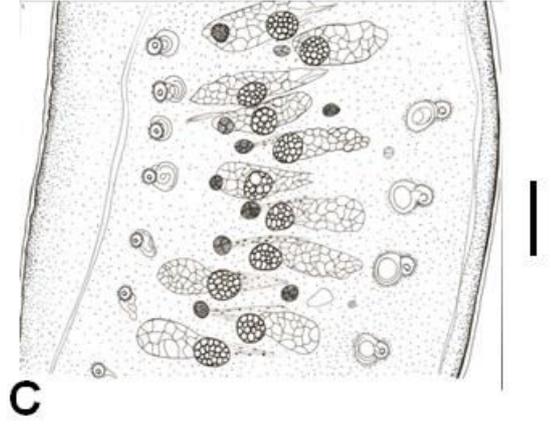
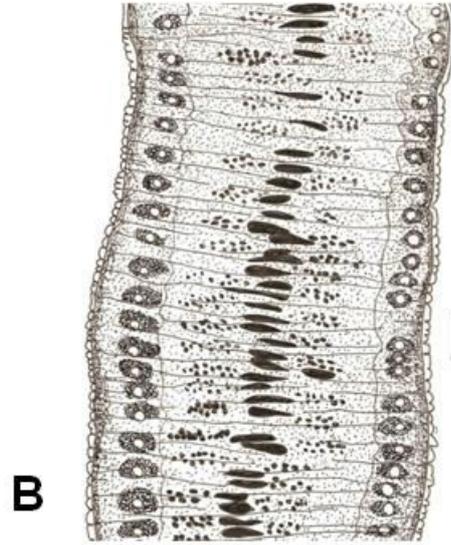
- **Figura 21 a:** Proglotes pré-grávidos. Note que ainda apresenta difícil definição dos limites entre os proglotes. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 21 b:** Visão dorso-ventral de proglotes pré-grávidos, com detalhes do útero (**Ut**) repleto de ovos e dos órgãos paruterinos (**op**) bem desenvolvidos. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 21 c:** Visão dorso-ventral de proglotes pré-grávidos em um estágio mais avançado no qual pode se observar a formação das cápsulas paruterinas (**cp**) e a segmentação entre os proglotes. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 21 d:** Detalhes ampliados dos limites entre os proglotes pré-grávidos (**cabças de setas**). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 21 e:** Visão dorso-ventral de um proglote grávido. Notar a formação das duas cápsulas paruterinas (**cp**). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 21 f:** Detalhe da visão dorso-ventral de um proglote grávido em estágio avançado, no qual se observa a sobreposição de duas cápsulas paruterinas (**cp**) preenchidas com ovos e os bulbos (**b**). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 22: Microscopia de Luz dos aspectos gerais do corpo e proglotes de cestoda de *R. marina*, vistos por desenhos em profundidade obtidos por câmara clara.**

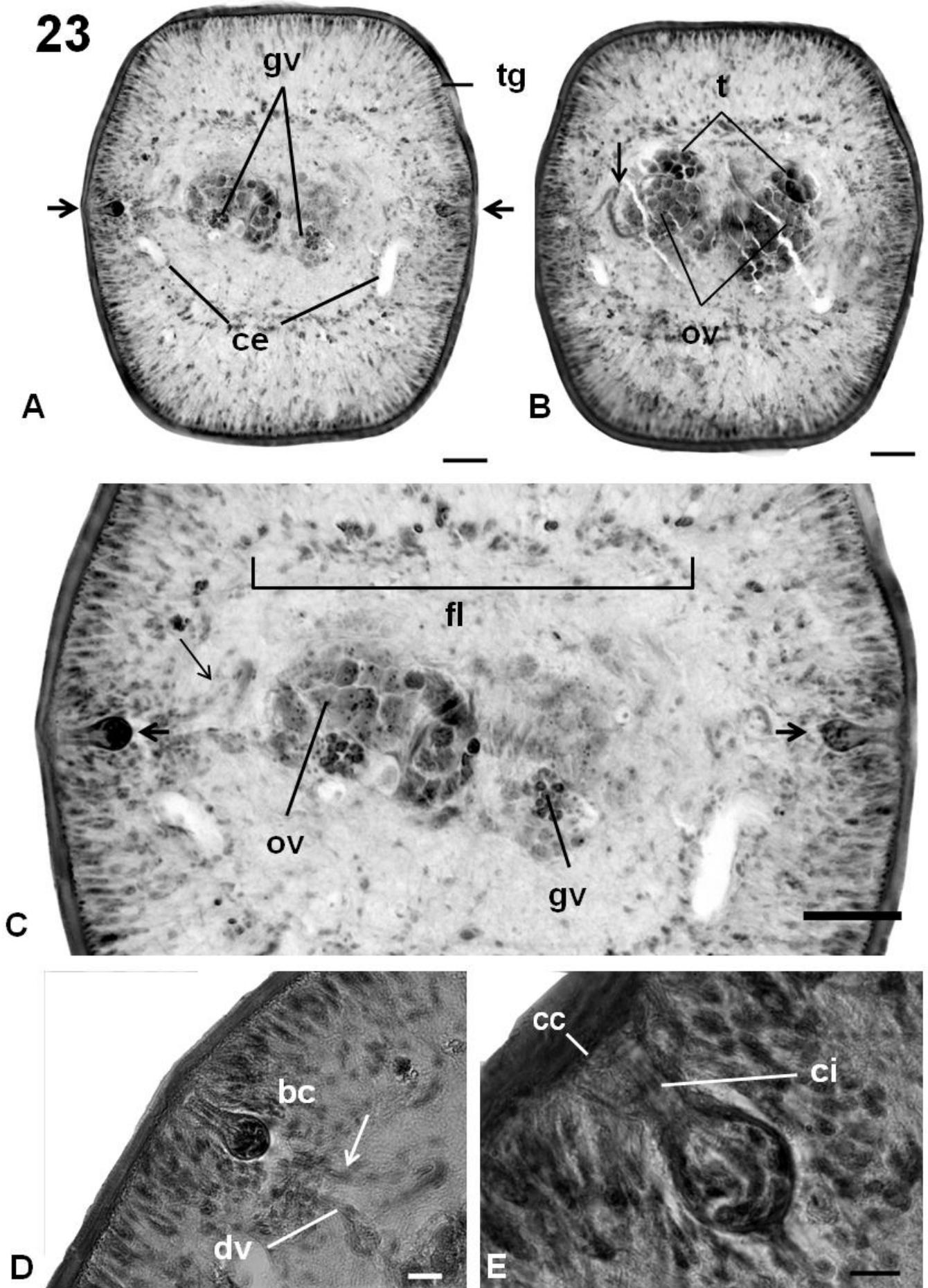
- **Figura 22 a:** Visão dorso-ventral do escólice simples e pescoço. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 22 b:** Visão dorso-ventral dos proglotes imaturos. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 22 c:** Visão dorso-ventral dos proglotes maduros. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 22 d-e:** Visão dorso-ventral de proglotes pré-grávidos, em dois níveis de amadurecimento, com seqüência mostrando o desenvolvimento de cápsulas paruterinas assim como, a evidenciação dos limites entre os proglotes e o encurtamento de sua largura. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 22 f-g:** Extremidade posterior do cestóide evidenciando proglotes grávidos completamente formados. Barras: f = 100  $\mu\text{m}$  e g = 50  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 22 h:** Detalhe do ovo, destacando o envelope externo (**ex**), embrióforo (**em**) e oncosfera (**on**). Barra = 30  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 22 i:** Reconstrução do conjunto de órgãos reprodutores a partir de cortes histológicos transversais de proglotes maduros. Note também a disposição dos músculos longitudinais e canais excretores Barra = 50  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 22 j:** Reconstrução da estrutura da bolsa do cirro contendo internamente o cirro; mostrando também átrio genital, canal deferente e o canal vaginal. Reconstrução feita a partir a partir de cortes transversais de proglotes maduros. Barra = 30  $\mu\text{m}$

22



**Figura 23: Microscopia de Luz de secções transversais de proglotes maduros incluídos em Parafina.**

- **Figura 23 a:** Secção transversal do proglote maduro no qual se observa as glândulas vitelogênicas (**gv**), o tegumento (**tg**), os canais excretores (**ce**) e as duas bolsas dos cirros (**setas**). Barra = 100 $\mu$ m.
- **Figura 23 b:** Em outro nível de profundidade de proglote maduro incluído em parafina. Notar a presença de dois ovários (**ov**), dois testículos (**t**). Barra = 100 $\mu$ m.
- **Figura 23 c:** Detalhe de uma secção transversal na região medular e com visão de duas bolsas do cirro (**setas curtas**), na qual podem ser observadas as fibras musculares longitudinais (**fl**), os ovários (**ov**), Glândula vitelínica (**gv**), e o canal deferente próximo a bolsa do cirro (**seta longa**). Barra = 100 $\mu$ m.
- **Figura 23 d:** Detalhe da região cortical de um corte transversal de proglote maduro, no qual se observa em detalhes a morfologia da bolsa do cirro (**bc**), e dos canais deferentes podem ser observados (**seta**) e o ducto vitelínico (**dv**). Barra = 50 $\mu$ m
- **Figura 23 e:** Detalhes da bolsa do cirro evidenciando sua estrutura piriforme de paredes delgadas, com o canal deferente formando uma volta internamente na região medular antes de se tornar cirro (**Ci**) e finalizando em um canal copulador (**cc**). Barra = 30 $\mu$ m.



Os canais deferentes formam duas circunvoluções e desembocam na bolsa do cirro (Figs. 22 i; 23 b-d; 24 a). Cada proglote é dotado de duas bolsas do cirro com paredes delgadas medindo em comprimento  $40,04 \mu\text{m} \pm 1,49$  (38,55 - 41,54  $\mu\text{m}$ ) e largura de  $17,99 \mu\text{m} \pm 1,04$  (16,94 - 19,04  $\mu\text{m}$ ) (Figs. 22 i - j; 23 a; 23 c; 24 a). Após duas voltas, cada canal deferente se une a um cirro, dotado de espinhos em sua extremidade apical. Os cirros possuem tamanho médio de  $16,53 \mu\text{m} \pm 0,9$  (15,56 - 17,51  $\mu\text{m}$ ) (Figs. 20 f; 22 i-j; 23 a-e; 24 a-e).

Os proglotes pré-grávidos são mais largos que longos com o comprimento de  $80,76 \mu\text{m} \pm 8,41$  (72,34 - 89,18  $\mu\text{m}$ ) e largura  $853,412 \mu\text{m} \pm 36,62$  (816,78 - 890,03  $\mu\text{m}$ ). Apresentam útero com ovos, órgãos paruterinos bem desenvolvidos medindo em comprimento  $96,04 \mu\text{m} \pm 15,75$  (80,29 - 111,80  $\mu\text{m}$ ) e largura  $34,28 \mu\text{m} \pm 5,79$  (28,49 - 40,07  $\mu\text{m}$ ) (Figs. 21 a-f; 22 d-g). Durante o desenvolvimento e formação dos ovos, nota-se que o útero vai sendo preenchido e ovos migrando para os órgãos paruterinos (Fig. 18 - f; 19 d - g). Após a migração os proglotes adquirem aspecto característico de proglotes grávidicos (Figs. 21 e - f; 22 d-h).

Os proglotes grávidicos apresentam segmentação bem distinta, formato elipsóides, sendo mais compridos do que largos, apresentando comprimento de  $377,33 \mu\text{m} \pm 40,60$  (336,73 - 417, 94  $\mu\text{m}$ ) e largura de  $200,12 \mu\text{m} \pm 23,72$  (176,40 - 223,85  $\mu\text{m}$ ). Observa-se uma média de 15 - 19 ovos por proglote (Fig 18 e - f; 20 f - g; 21 f).

Quando analisados dorso-ventralmente, esses proglotes apresentam em seu interior duas cápsulas paruterinas paralelas medindo  $68,60 \mu\text{m} \pm 3,83$  (64,76 - 72,44  $\mu\text{m}$ ) de comprimento e  $69,74 \mu\text{m} \pm 3,88$  (65,85 - 73,62  $\mu\text{m}$ ) de largura, com uma média de 7-9 ovos para cada cápsula. Dois bulbos de  $57,39 \mu\text{m} \pm 7,07$  (50,32 - 64,47  $\mu\text{m}$ ) de comprimento e  $55,32 \mu\text{m} \pm 5,21$  (50,11 - 60,53  $\mu\text{m}$ ) são formados por involução uterina. Estes bulbos normalmente apresentam em média três ovos durante o desenvolvimento do proglote,

encontrando-se vazio no mais avançado estágio de maturação (Figs. 21 c; 22 d-e). Observamos gradativa involução das demais estruturas internas que não estão presentes nos proglotes grávidos.

Os ovos possuem um envelope externo de comprimento  $30,15 \mu\text{m} \pm 3,17$  (26,97 - 33,32  $\mu\text{m}$ ) e largura  $16,44 \mu\text{m} \pm 1,61$  (14,83 - 18,05  $\mu\text{m}$ ). O embrióforo possui comprimento médio de  $18,82 \mu\text{m} \pm 5,88$  (12,94 - 24,70  $\mu\text{m}$ ) e largura  $13,73 \mu\text{m} \pm 1,73$  (11,99 - 15,46  $\mu\text{m}$ ). A oncosfera destes ovos possui comprimento médio de  $17,52 \mu\text{m} \pm 1,13$  (16,39 - 18,65  $\mu\text{m}$ ) e largura de  $11,62 \mu\text{m} \pm 0,90$  (10,71 - 12,53  $\mu\text{m}$ ) e os ganchos da oncosfera medem  $7,85 \mu\text{m} \pm 1,07$  (6,78 - 8,92  $\mu\text{m}$ ) de comprimento (Fig. 22h).

### 3.2 ANÁLISE DAS SECÇÕES SERIADAS DE HELMINTOS INCLUÍDOS EM HISTORESINA

A análise dos cortes seriados transversais e longitudinais dos proglotes maduros incluídos em Historesina<sup>®</sup> nos possibilitou observar as estruturas internas do cestóide, onde se observou a presença de dois grupos de estruturas reprodutoras. Cada grupo está constituído por dois testículos um ovário uma glândula de vitelo

Secções transversais de proglotes evidenciaram uma rede de ductos que saem dos testículos se unem medialmente formando um canal deferente que gera duas circunvoluções na região medular antes de desembocar na bolsa do cirro. Uma vez no interior da bolsa, o canal deferente forma uma alça que se encontra com o cirro (Fig. 24 a-e).

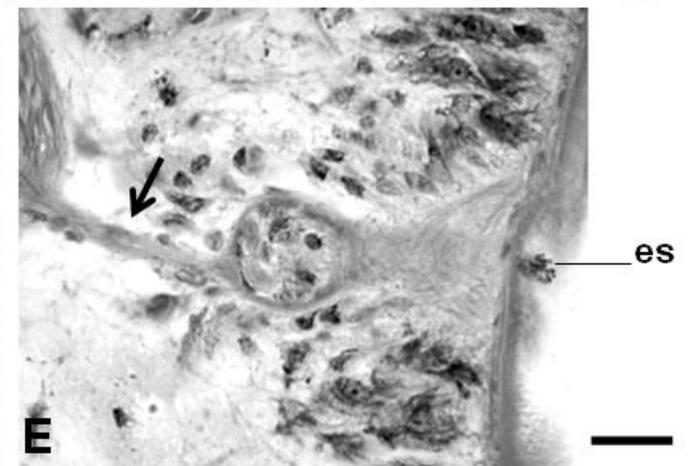
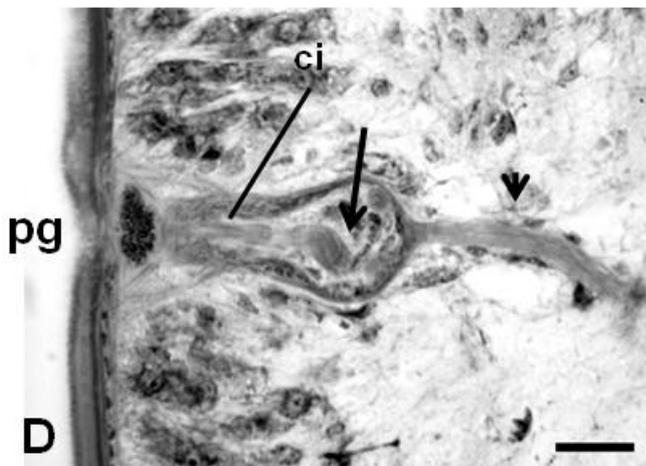
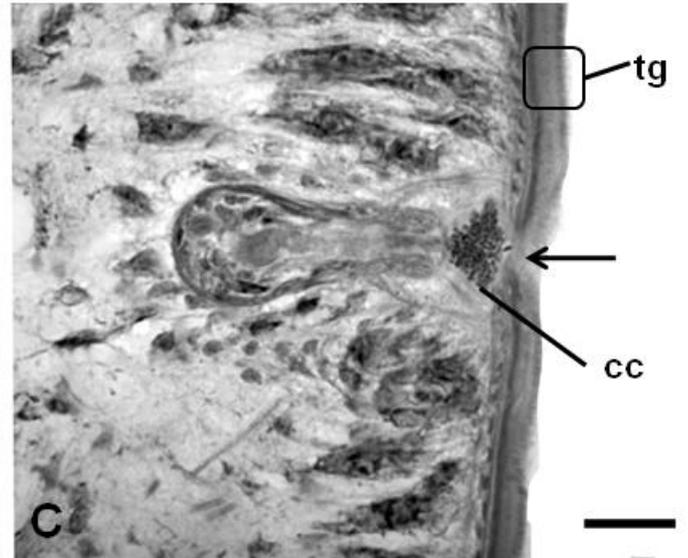
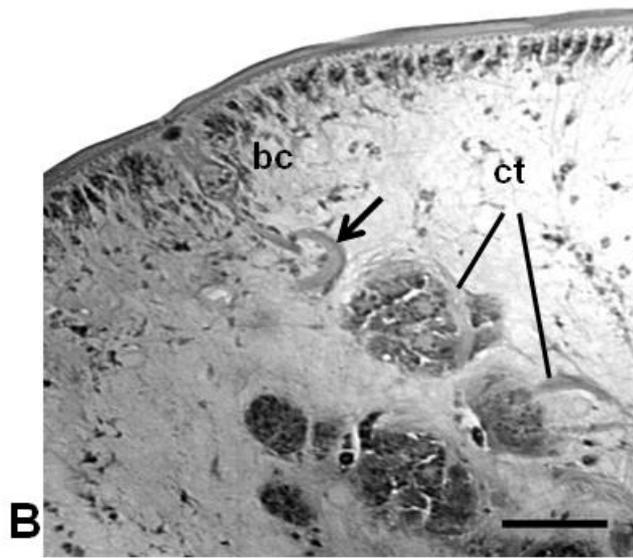
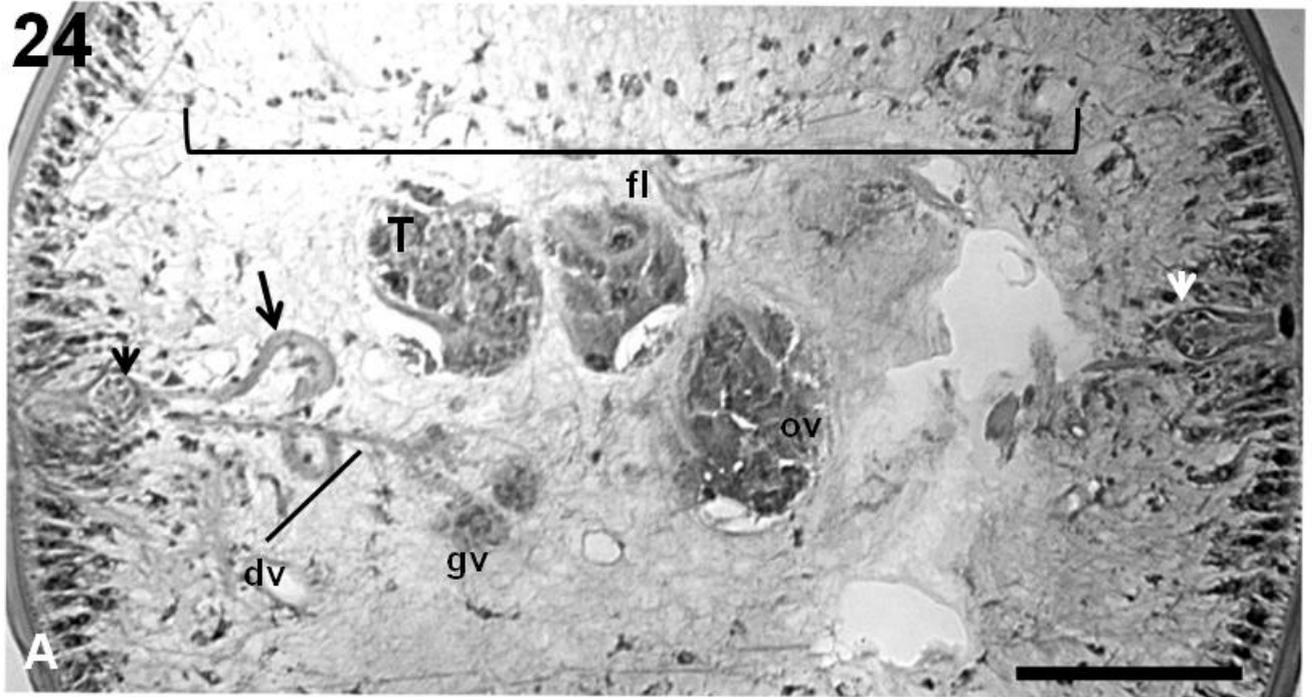
Secções transversais e longitudinais de proglotes maduros incluídos em Historesina<sup>®</sup> possibilitaram a melhor visualização de dois grupos de estruturas reprodutoras e duas bolsas do cirro por proglote. Por esta técnica é possível observar que o oviducto sai do ovário dorsalmente desembocando no canal copulador (Figs 24 a-b). Os ductos vitelínicos se unem com os ductos ovarianos medialmente formando um canal único o qual percorre a região

medular, alcançando dorso-lateralmente a bolsa do cirro e desembocando no canal copulador finalizando em um átrio genital (Figs. 23d; 24 a-e). As secções em Histoiresina<sup>®</sup> evidenciaram um tegumento de espessura variando entre 15- 24  $\mu\text{m}$  (Figs.23 e 24).

Em algumas secções foi possível observar que o canal copulador se apresentava preenchido por estruturas celulares puntiformes densamente coradas (Figs. 24 a-e), que em alguns momentos preenchiam parte do ducto feminino, aparentando serem espermatozóides (Figs.24 c - e; 25 c - d).

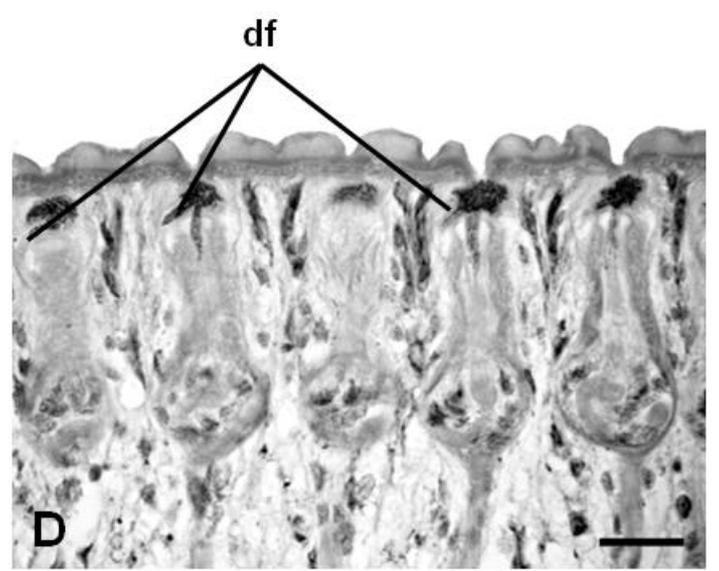
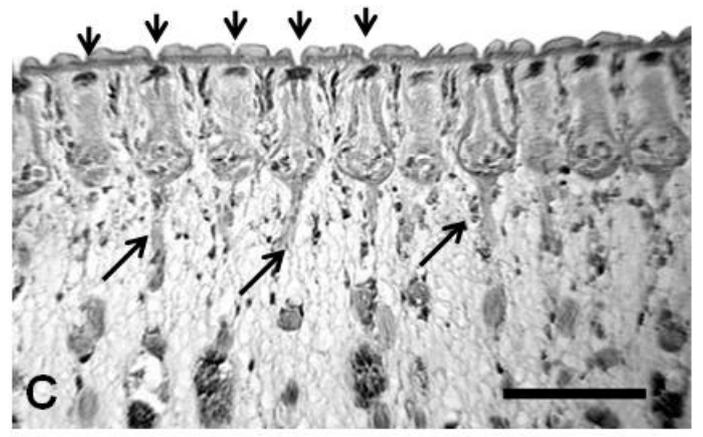
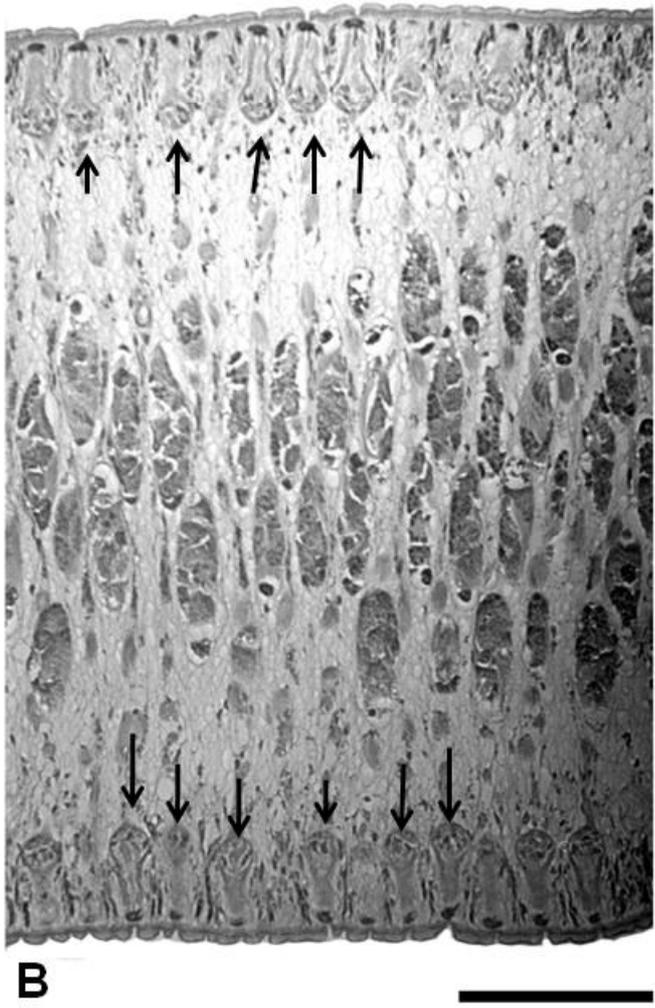
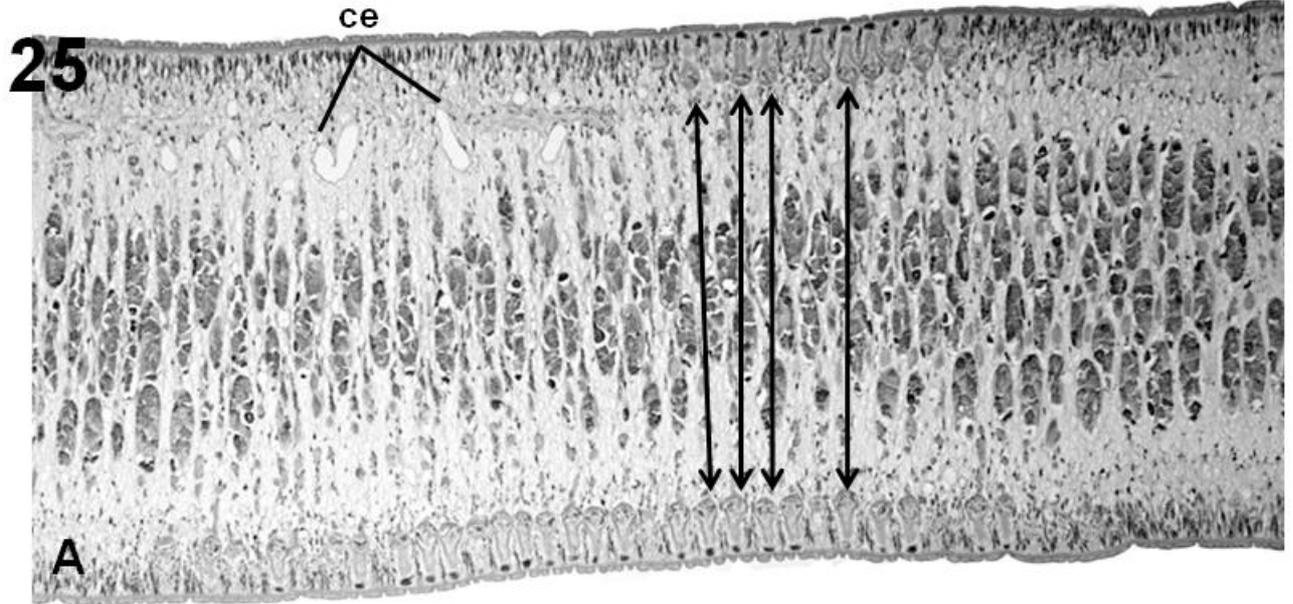
**Figura 24: Detalhes em microscopia de luz de secções transversais de proglotes maduros incluídos em Historesina<sup>®</sup>.**

- **Figura 24a:** Detalhe da região medular e cortical de proglote maduro, onde se evidenciam as duas bolsas do cirro (**cabeça de seta**) em cada lateral do proglote, as fibras musculares longitudinais (**fl**); o canal deferente (**seta**) na região medular finalizando na bolsa do cirro, e na região inferior os ductos vitelínicos (**Dv**). t = testículo, ov = ovário, gv = Glândula Vitelogênica. Barra = 100 µm
- **Figura 24 b:** Detalhe da região cortical de um corte transversal de proglote maduro, onde se observa a bolsa do cirro (**bc**); a disposição e localização da rede de canais testiculares (**Ct**) além dos canais deferentes (**seta**). Barra = 100 µm
- **Figura 24 c:** Detalhes da bolsa do cirro e sua abertura, na sua superfície do tegumento espesso e preservado. Observe o canal copulador (**cc**) preenchido com estruturas celulares puntiformes de intensa basofilia, semelhantes a espermatozóides. Seta indica o átrio genital. Barra = 30 µm.
- **Figura 24 d:** Detalhes da bolsa do cirro e com sua abertura externa e o canal deferente (**cabeça de seta**) na base. Observe uma circunvolução interna (**seta**) deste canal antes de se fundir ao cirro (**ci**), o qual desemboca no canal copulador e finaliza no Poro Genital (**pg**), Barra = 30 µm.
- **Figura 24 e:** Detalhes da abertura da bolsa do cirro em outro nível, no qual pode ser observada a estrutura fibrosa do canal deferente (**seta**). Observe ainda, que na região de abertura do átrio genital ocorre saída das estruturas basofílicas sugestivas de serem espermatozoides (**es**). Barra = 30 µm.



**Figura 25: Secções longitudinais de proglotes maduros incluídos em Historesina®.**

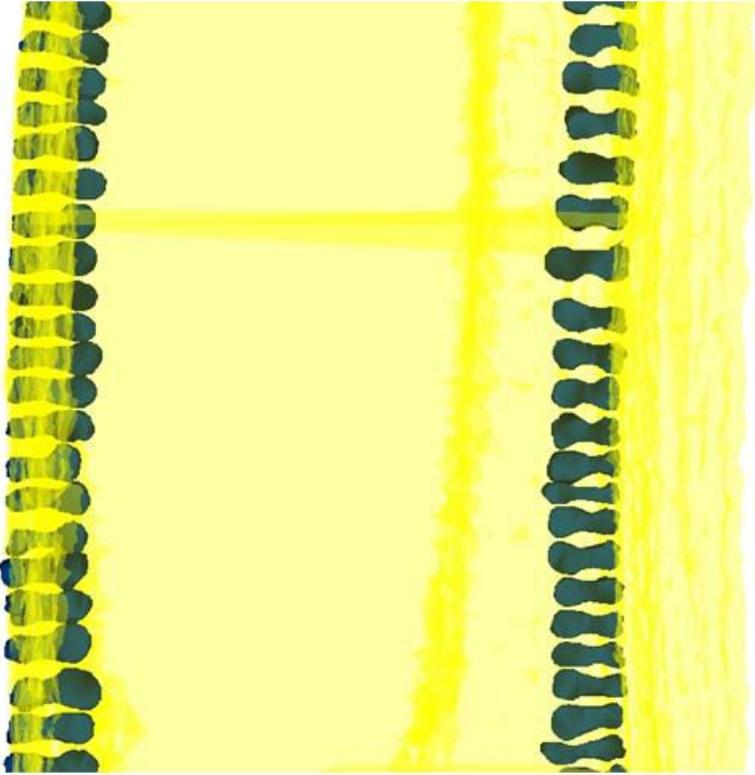
- **Figura 25 a:** Visão geral de parte do estróbilo do parasito onde é possível observar a morfologia dos canais excretorios (**ce**); as estruturas reprodutivas dispostas na região medular e as sequências de várias bolsas do cirro em disposição paralela(**setas duplas**) nas laterais dos proglotes . Barra = 100  $\mu$ m.
- **Figura 25 b:** Detalhe ampliado da região do estróbilo onde podem ser observadas bolsas do cirro em curto espaço entre si na lateral do estróbilo e equidistantes na lateral oposta do estróbilo (**setas**). Barra = 100  $\mu$ m.
- **Figura 25c:** Detalhe da região cortical de uma das laterais do estróbilo evidenciando a abertura dos poros genitais (**cabeças de setas**), as bolsas do cirro enfileiradas, além de canais deferentes desembocando nessas estruturas setas longas. Barra = 100  $\mu$ m.
- **Figura 25 d:** Detalhes das bolsas dos cirros onde pode ser observado o canal copulador preenchido por estruturas celulares puntiformes densamente basofílicas preenchendo em alguns momentos parte do ducto feminino (**df**). Barra = 30  $\mu$ m.



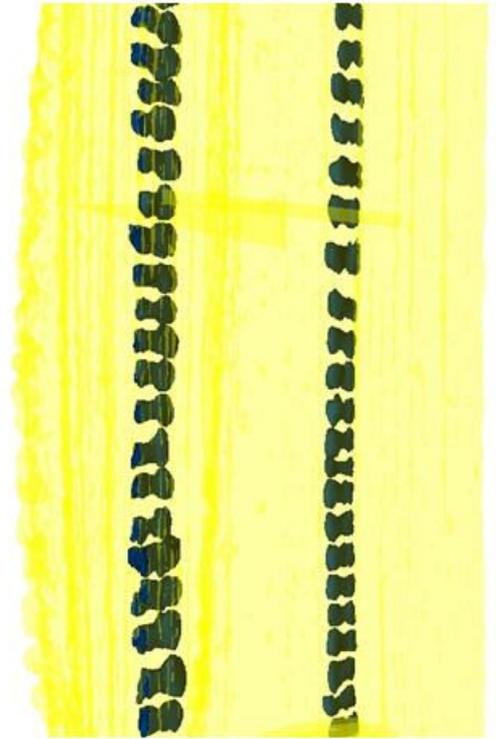
**Figura 26: Reconstrução tri-dimensional da disposição das bolsas do cirro a partir da somatória de 116 secções seriadas longitudinais de um segmento do estróbilo de cestoda parasito de intestino delgado de *R. marina* de Belém, Pará.**

- **Figura 26 a:** Visão dorso-ventral de parte do estróbilo demonstrando o posicionamento equidistante das bolsas do cirro enfileiradas em cada margem lateral do estróbilo e de duas bolsas do cirro em disposição oposta por proglote. Análise de imagens obtidas a partir de objetiva de 10X.
- **Figura 26 b:** Visão em ângulo latero-lateral a partir de pequena rotação levógira do estróbilo, onde também se observa o padrão de equidistância entre as bolsas dos cirros.
- **Figura 26 c:** Visão superior em eixo transversal do estróbilo onde se observa internamente o posicionamento das duas fileiras laterais de bolsas do cirro.

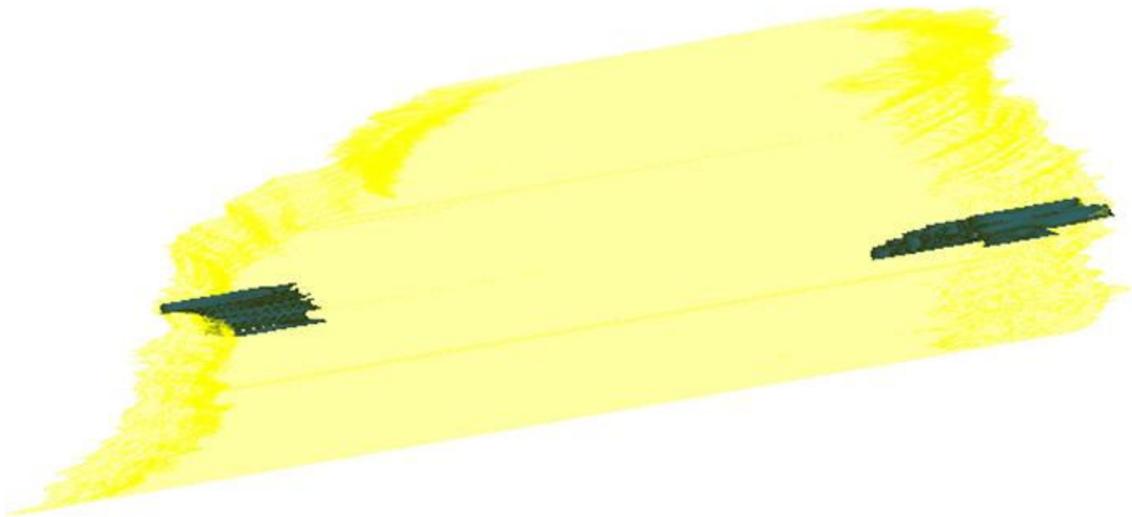
26



A



B



C

### 3.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise por microscopia eletrônica evidenciou a ultraestrutura do escólice em dois momentos: relaxado (Fig. 27 a) e contraído (Fig. 27 b). Nota-se a ausência de órgão apical, ventosas simples interna e externamente com ausência de estruturas de fixação acessórias, como espinhos (Figs. 27 a - d). As microtríquias apresentam aspecto filiforme e são curtas em toda a de superfície das diferentes regiões do escólice (Figs. 27 e - f).

A ausência de segmentação distinta entre os proglotes imaturos também foi observada por MEV.

Ao longo do estróbilo percebe-se pela superfície externa, o desenvolvimento dos proglotes, onde a segmentação vai se tornando mais evidente (Figs. 28 a - e); até se tornar bastante distinta nas porções mais extremas do parasito (Figs. 28 e; 30 a - d).

A morfologia das microtríquias é semelhante nesses proglotes. As microtríquias possuem aspecto delicado, similares a pequenos filipódios (Figs. 28 f-g).

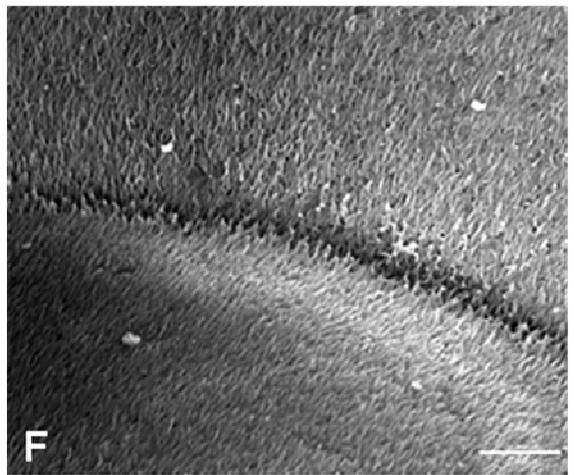
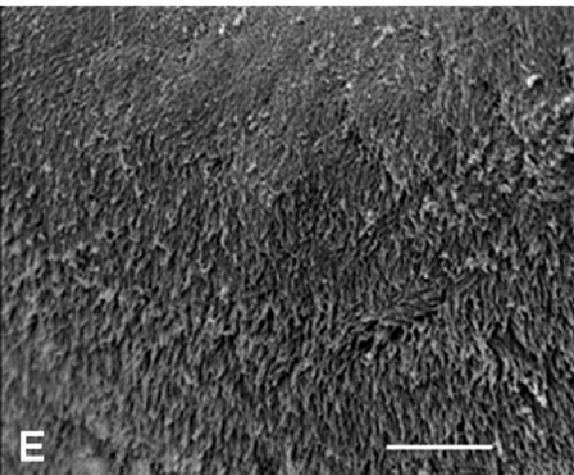
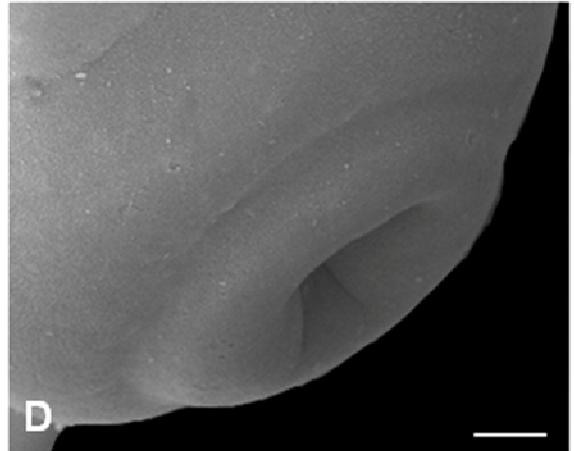
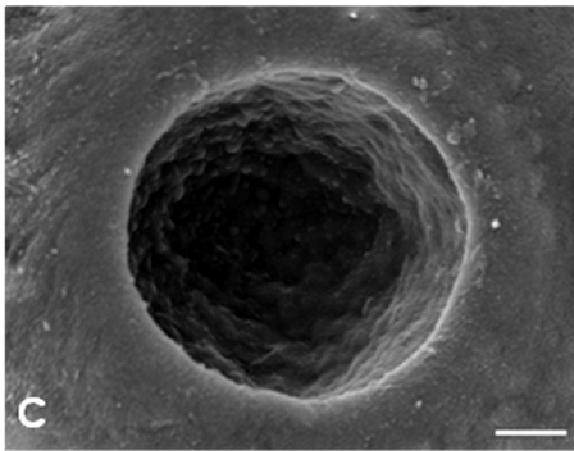
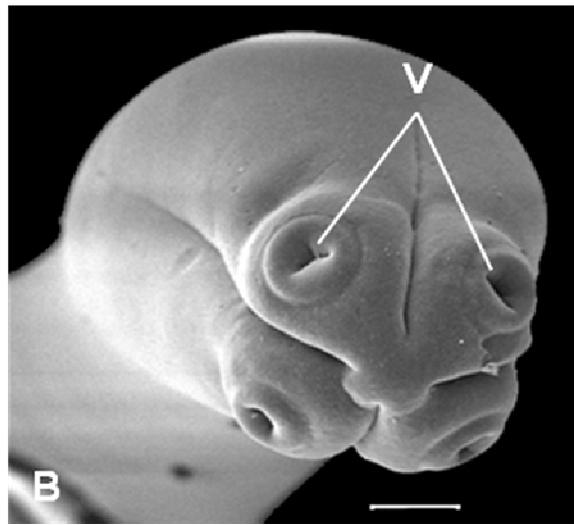
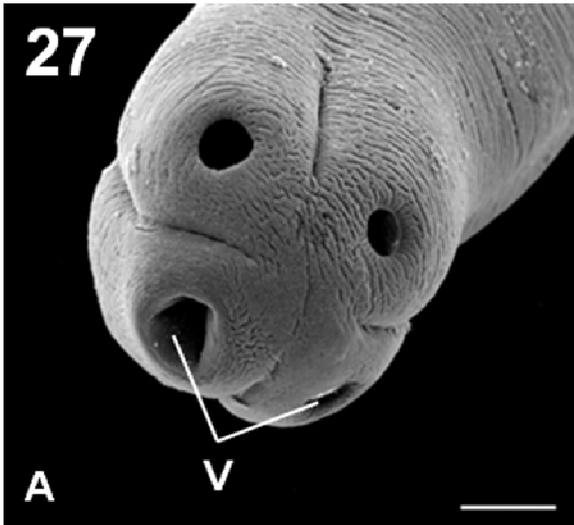
Nos proglotes maduros, é possível visualizar a presença de dois poros genitais, dispostos um em cada lateral, por proglote (Figs. 28 c; 29 a - d).

O cirro parcialmente evertido (exteriorizado) em alguns proglotes maduros apresenta formato cônico, com os espinhos da extremidade nem sempre totalmente exteriorizados e bem caracterizados. Em alguns cirros foi possível observar que as extremidades não se apresentavam como uma estrutura simples e única (Figs 29 b - e).

Não foram observados poros na superfície dos proglotes gravídicos (Figs. 30 a - e).

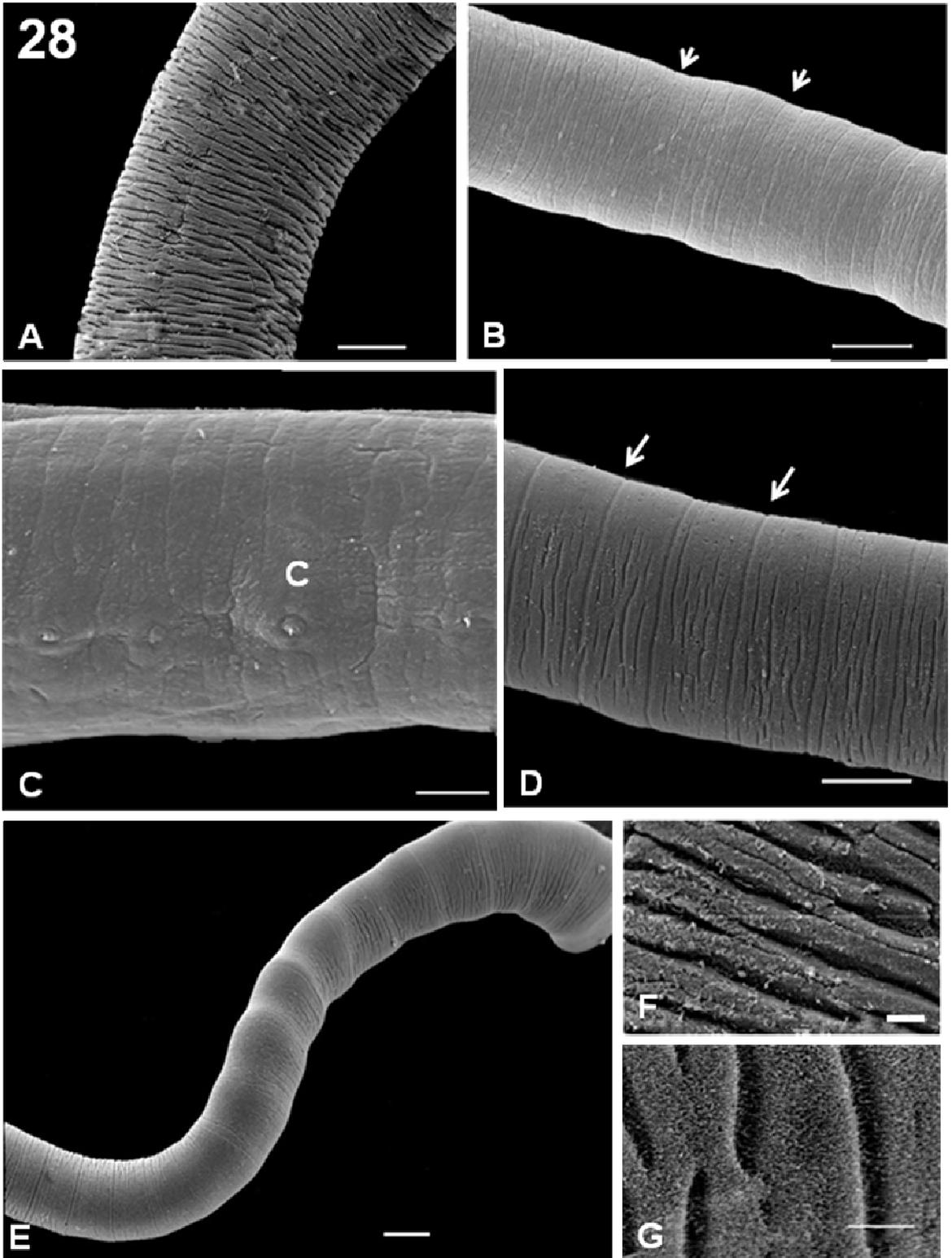
**Figura 27: Microscopia Eletrônica de Varredura do escólice do cestoda parasito de intestino delgado de *R. marina* de Belém-PA.**

- **Figura 27 a:** Escólice “relaxado” no qual pode se observar a morfologia das ventosas (V). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 27 b:** Escólice em momento contraído. Notar a variação da morfologia das ventosas (V). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 27 c:** Detalhe interno da ventosa em momento relaxado. Notar a ausência de espinhos ou outras estruturas. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 27 d:** Detalhe da morfologia da ventosa no momento contraído. Notar uma pequena protrusão do anel da ventosa. Barra = 15  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 27 e:** Detalhes ultraestruturais de microtríquias da região da borda da ventosa no momento relaxado. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 27 f:** Detalhes de microtríquias da região da ventosa no momento contraído. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



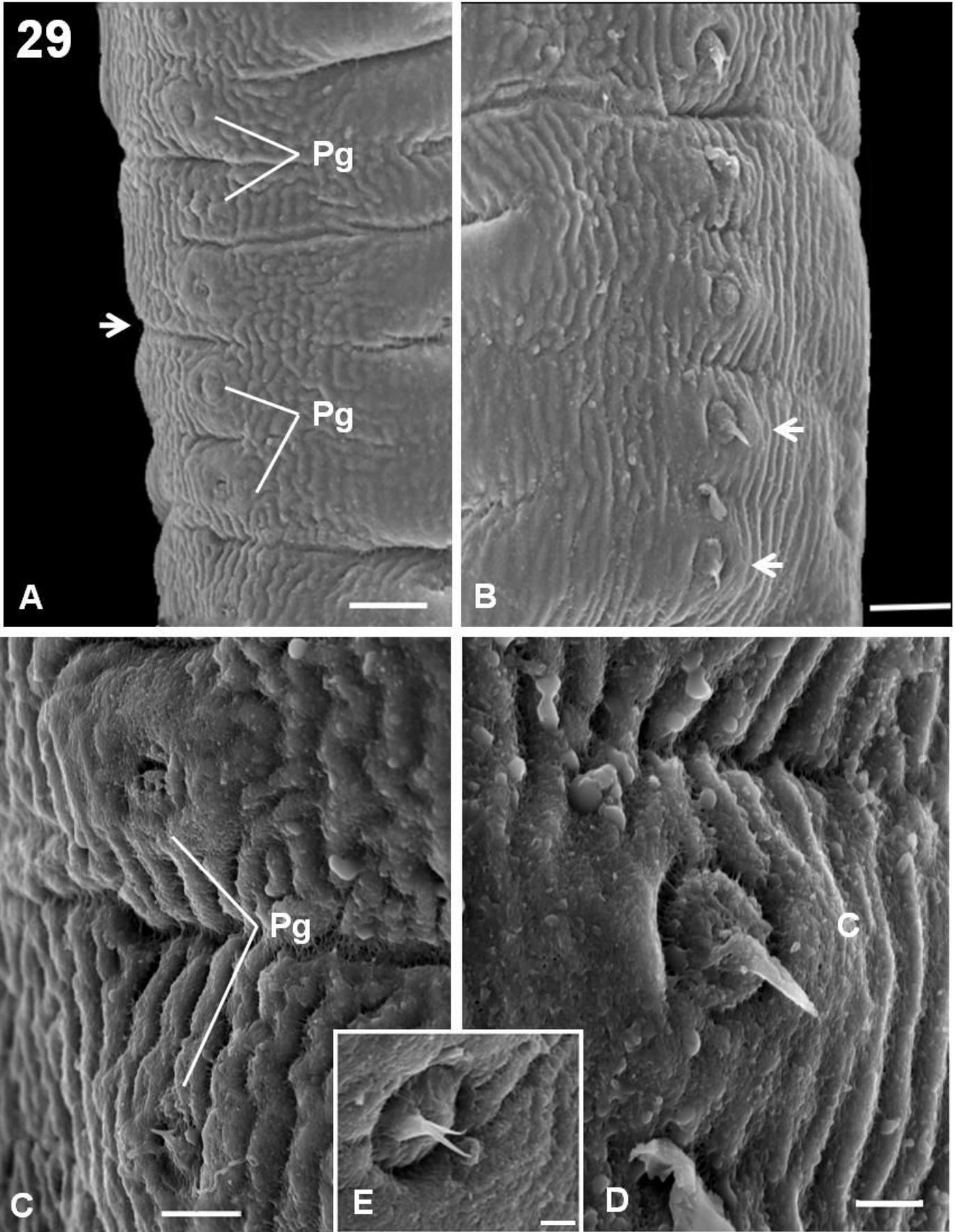
**Figura 28: Microscopia Eletrônica de Varredura de parte do estróbilo do cestóide de intestino delgado de *R. marina* de Belém-PA.**

- **Figura 28 a:** Segmentos de proglotes jovens, nos quais se observam invaginações do tegumento, porém não é possível definir proglotes individualizados. Barra = 100  $\mu\text{m}$
- **Figura 28 b:** Segmento com proglotes maduros, onde se observa delicada delimitação (**cabeça de seta**). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 28 c:** Detalhes dos proglotes maduros, onde se observa cirros (C) parcialmente evertidos. Barra = 30  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 28 d:** Proglotes pré-grávidos onde se observa os limites bem definidos (**setas**) da extensão dos segmentos. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 28 e:** Região próxima a extremidade final do estróbilo onde pode ser observada a segmentação bem distinta entre os proglotes. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figuras 28 f - g:** Detalhes de microtríquias da região dos proglotes jovens (Fig. 28 f) e proglotes maduros (Fig. 28 g) Barras = 10  $\mu\text{m}$ .



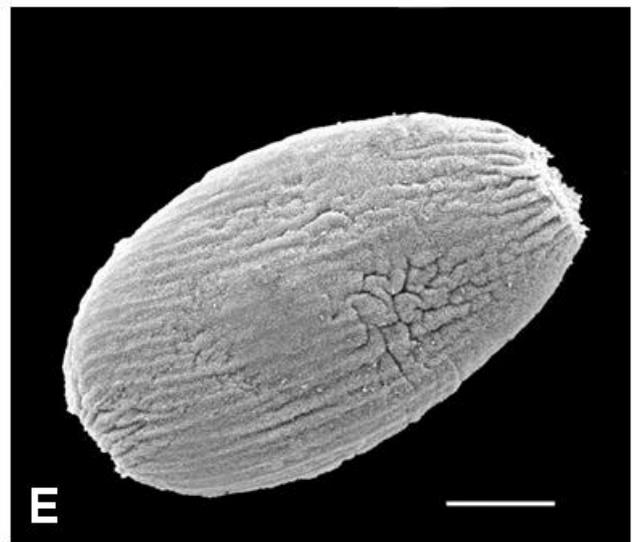
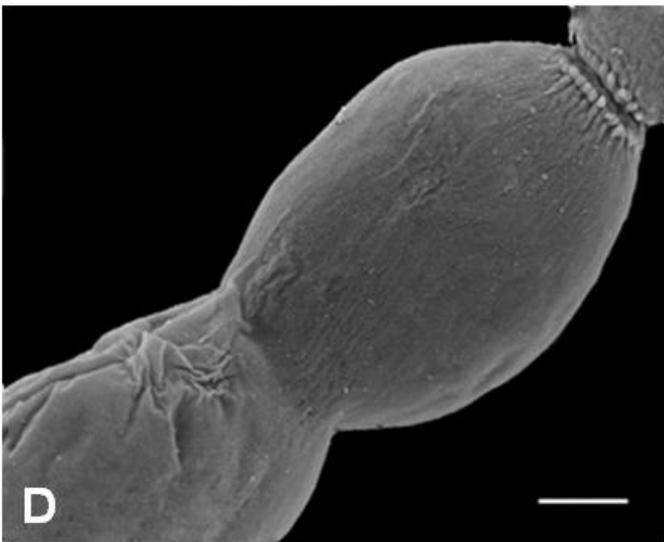
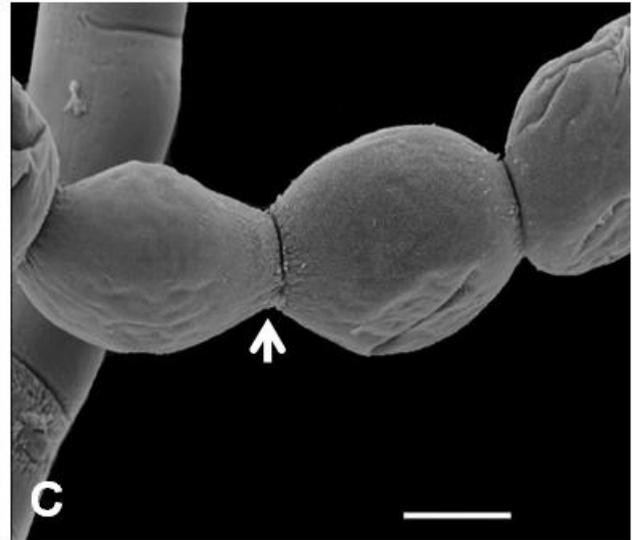
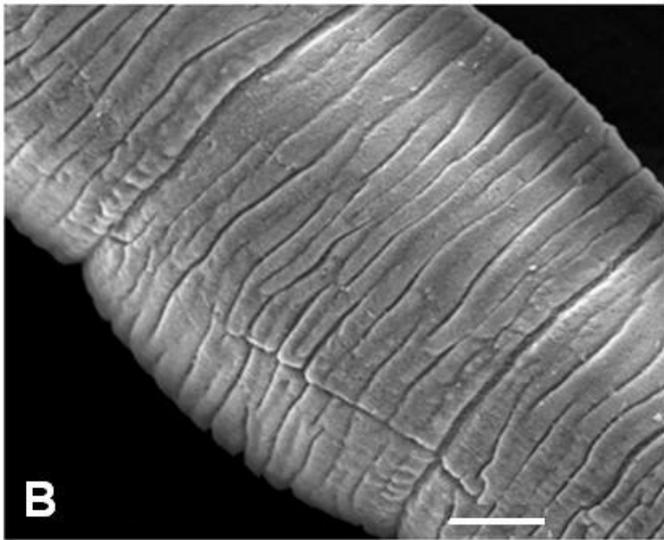
**Figura 29: Detalhes ultraestruturais de proglotes maduros e cirros.**

- **Figura 29 a:** Visão lateral do proglote maduro onde se observa a distinção entre os proglotes (**seta**) e os poros genitais (**Pg**). Barra = 26  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 29 b:** Visão dos proglotes da Fig. 29 a. Observa-se os poros genitais na lateral oposta, com alguns cirros evertidos (**cabeças de setas**). Barra = 20  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 29 c:** Detalhes em maior aumento da região dos poros genitais (**Pg**) observados na Figura 29 a. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 29 d:** Detalhe de cirro (**C**) situado no proglote maduro da Fig. 29 b. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 29 e:** Cirro parcialmente evertido. Notar a separação dos espinhos na ponta do cirro. Barra = 3  $\mu\text{m}$ .



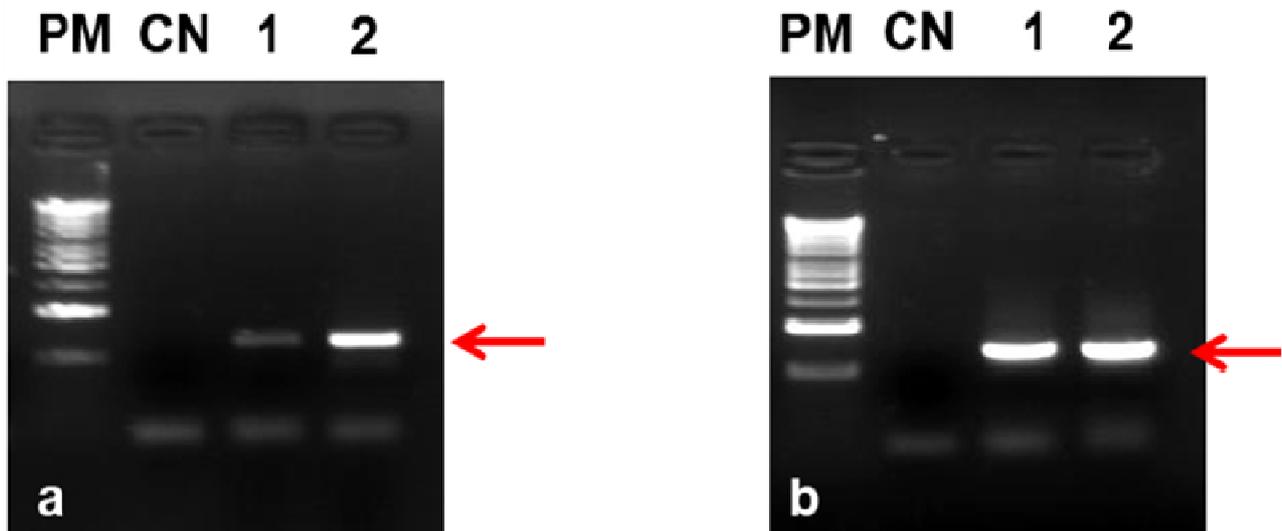
**Figura 30: Microscopia Eletrônica de Varredura da porção final do estróbilo do cestoda.**

- **Figura 30 a:** Extremidade posterior do estróbilo do cestóide, evidenciando a segmentação dos proglotes grávidos. Barra = 400  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 30 b:** Detalhes de um proglote grávido onde se nota o seu estreitamento e aumento de comprimento. Barra = 40  $\mu\text{m}$
- **Figura 30 c:** Porção terminal do estróbilo onde se observa as constrições (cabeça de seta) bem evidentes entre os proglotes grávidos. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 30 d:** Detalhes de superfície de um proglote grávido. Notar a ausência de poros nestes segmentos. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .
- **Figura 30 e:** Proglote grávido isolado, desprendido do estróbilo. Notar a morfologia elipsóide característica desse estágio de desenvolvimento. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .



### 3.5 ANÁLISE POR BIOLOGIA MOLECULAR

O DNA foi extraído de dois *pools* de 10 cestoda coletados de um hospedeiro proveniente de cada bairro para comparação gênica das populações de helmintos encontradas. Portanto, a PCR dos *primers* 2880 e B e CES1 e CES2 resultou fragmentos amplificados de aproximadamente 800 pb como observado na figura 31.



**Figura 31:** Visualização dos produtos da PCR dos dois pares de *primers* 2880 e B (**a**) e CES1 e CES2 (**b**) submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%. Observar a amplificação de aproximadamente 800pb em cada par de primer (setas). DNA *Ladder* (**PM**), controle negativo (**CN**), amostra de Nematotaeniidae proveniente do Bairro do Coqueiro (**1**), amostra de Nematotaeniidae proveninetes do Bairro do Guamá (**2**).

Após a amplificação e alinhamento das seqüências obtidas, a seqüência final apresentou 1253 nucleotídeos e observou-se que as duas populações não apresentavam diferenças genéticas (Fig. 32).

Após a análise no BLAST, e alinhamento, foram escolhidas e alinhadas as seqüências com alta porcentagem de semelhança com a do cestóide deste trabalho. O alinhamento final apresentou considerável variação de tamanho, portanto as regiões excedentes foram cortadas para minimizar áreas de alta variação e maximizar as informações obtidas nas seqüências (Figura 33). Assim a árvore Filogenética foi construída usando como grupo externo a espécie *Diphyllobotrium latum* (Pseudophyllidea: Diphyllobotridade) (Número de acesso ao GenBank: DQ925309) (Fig. 34).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Nematotaeniidae I CATGTCAGTCAGGCCTTCATACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGCTATGGTTTATTGGATCGTACCCGTTAA
Nematotaeniidae II CATGTCAGTCAGGCCTTCATACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGCTATGGTTTATTGGATCGTACCCGTTAA

      110     120     130     140     150     160     170     180
Nematotaeniidae I CTCTAGAGCTAATACATGCCTTAAAGCCCTGACCTTGCTGGCTAGCTTAGCTAGTAGGGAATGGGTGCACCTTATTAGATCAGA
Nematotaeniidae II CTCTAGAGCTAATACATGCCTTAAAGCCCTGACCTTGCTGGCTAGCTTAGCTAGTAGGGAATGGGTGCACCTTATTAGATCAGA

      210     220     230     240     250     260     270     280
Nematotaeniidae I TGCGCAAGTGCGTGCATTGAAATACTTCTGGTGACTCTGGATAATTGTTACAGATCGCAGTCGGCCTTGAGTCGGCGACGGGT
Nematotaeniidae II TGCGCAAGTGCGTGCATTGAAATACTTCTGGTGACTCTGGATAATTGTTACAGATCGCAGTCGGCCTTGAGTCGGCGACGGGT

      310     320     330     340     350     360     370     380
Nematotaeniidae I TATCAACTTTTCGATGGTAGGTGACCTGCCTACCATGGTTCTTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCGGGAGGGGAGC
Nematotaeniidae II TATCAACTTTTCGATGGTAGGTGACCTGCCTACCATGGTTCTTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCGGGAGGGGAGC

      410     420     430     440     450     460     470     480
Nematotaeniidae I CTTCCAAGGGAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAACCAATCCAGTACGGGGAGGTGGTGACGAAAAATACCGATGCGGGACCTCT
Nematotaeniidae II CTTCCAAGGGAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAACCAATCCAGTACGGGGAGGTGGTGACGAAAAATACCGATGCGGGACCTCT

      510     520     530     540     550     560     570     580
Nematotaeniidae I CGGAATGAGTGGACTCTAAATCCTTTACGAGGATCAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAACTCCAGCTCC
Nematotaeniidae II CGGAATGAGTGGACTCTAAATCCTTTACGAGGATCAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAACTCCAGCTCC

      610     620     630     640     650     660     670     680
Nematotaeniidae I TTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGTAGCATTGTTGCCTGTTGGTGATTGAGCATGGGCGTGTGGCCGATGAC
Nematotaeniidae II TTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGTAGCATTGTTGCCTGTTGGTGATTGAGCATGGGCGTGTGGCCGATGAC

      710     720     730     740     750     760     770     780
Nematotaeniidae I GTGTGTTGGCATGGTGTGGGGTAGTAGGCTGGCGCATTAGTGCTAGTGTGTGGTGTGGCTACGCGGGTGGCTAAATGAGCTGC
Nematotaeniidae II GTGTGTTGGCATGGTGTGGGGTAGTAGGCTGGCGCATTAGTGCTAGTGTGTGGTGTGGCTACGCGGGTGGCTAAATGAGCTGC

      810     820     830     840     850     860     870     880
Nematotaeniidae I CGTGATGCCTTGTGGCGCTGTGATTTGCGCTGCTGTGGCTGTGTCTAGCTTTCTGTGGTCTGTGATGGCTTGCCTAGGC
Nematotaeniidae II CGTGATGCCTTGTGGCGCTGTGATTTGCGCTGCTGTGGCTGTGTCTAGCTTTCTGTGGTCTGTGATGGCTTGCCTAGGC

      910     920     930     940     950     960     970     980
Nematotaeniidae I CTTGCTCCTACCGCTACAGCGTTGGGGTTGTGTTGTTGGTTTCATAAATAGCGTCCTTGTTCCTAGCTGGCAAGGTGACGGT
Nematotaeniidae II CTTGCTCCTACCGCTACAGCGTTGGGGTTGTGTTGTTGGTTTCATAAATAGCGTCCTTGTTCCTAGCTGGCAAGGTGACGGT

     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
Nematotaeniidae I TCTGAGGTGTAAGAGCCGAGGTGTAGGCGGGTGTGGTGGTCTGTCACACGCTGTGGAGCCCATCGGCCGTTTGCATG
Nematotaeniidae II TCTGAGGTGTAAGAGCCGAGGTGTAGGCGGGTGTGGTGGTCTGTCACACGCTGTGGAGCCCATCGGCCGTTTGCATG

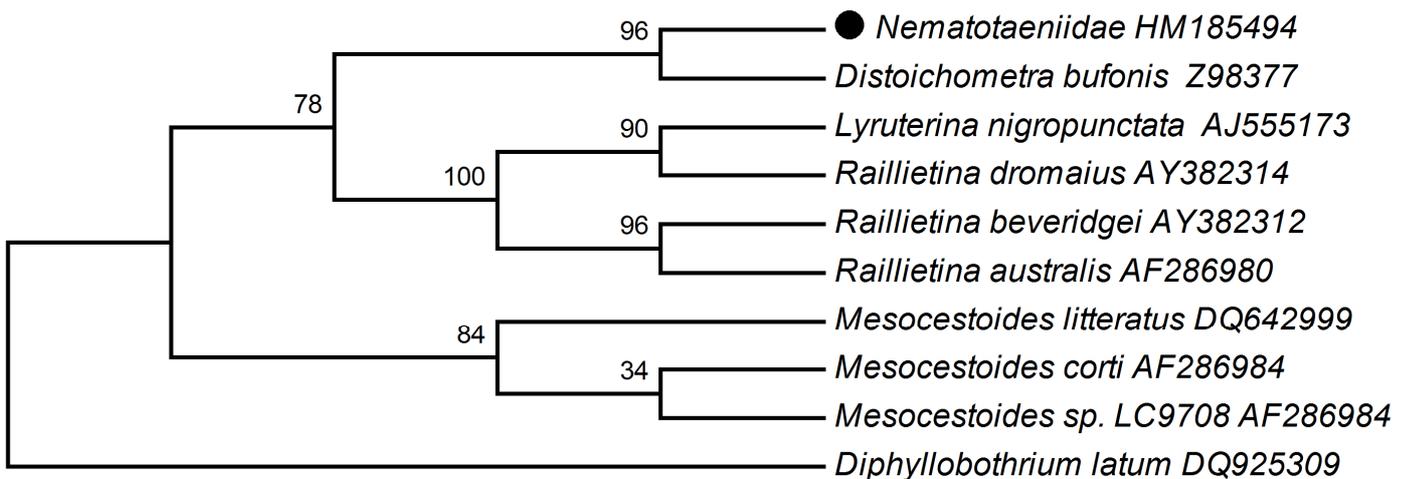
     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180
Nematotaeniidae I AAAGGTGTCGTAGGCGGATGGCACGTTTACTTTGAACAAATTTGAGTGCTCAAATCAGGCCGATGTTGCCTGAAAAGTTTTG
Nematotaeniidae II AAAGGTGTCGTAGGCGGATGGCACGTTTACTTTGAACAAATTTGAGTGCTCAAATCAGGCCGATGTTGCCTGAAAAGTTTTG

     1210     1220     1230     1240     1250
Nematotaeniidae I GGACTTCGGTTCATTTTCGTTGGTTTTTCGGATCCGAAGTAATGATCAAAAGAG
Nematotaeniidae II GGACTTCGGTTCATTTTCGTTGGTTTTTCGGATCCGAAGTAATGATCAAAAGAG

```

**Figura 32:** Sequência nucleotídica de 1253pb da população de cestoda encontrada nos dois bairros de Belém (Nematotaeniidae I: Bairro do Coqueiro, Nematotaeniidae II Bairro do Guamá). Note que não há diferenças entre as seqüências obtidas





**Figura 34:** Árvore filogenética de 10 seqüências de cestoda realizada pelo método da Máxima Parcimônia usando 1.000 réplicas de *Bootstrap*. (● - representa as amostras de cestoda do presente estudo). Os números representam a porcentagem de réplicas de *bootstrap*.

Esta árvore filogenética gerada é composta por espécies de quatro famílias da Ordem Cyclophyllidea e mostra a criação de dois grupos com origens distintas.

O primeiro grupo é formado por duas sub-árvores, compostas por espécies das Famílias Nematotaeniidae (Nematotaeniidae I, Nematotaeniidae II e *Distoichometra bufonis*), Daivaineidae (*Raillietina australis*, *Raillietina beveridgei*, *Raillietina dromaius*) e Paruterinae (*Lyruterina nigropunctata*). O segundo grupo é formado por espécies da Família Mesocestoidea, incluindo espécies do gênero *Mesocestoides*.

Observa-se então, na árvore filogenética gerada que membros da Família Nematotaeniidae e Daivaineidae derivam de uma mesma origem apresentando um alto valor de *Bootstrap* (95%).

#### 4. DISCUSSÃO

Dentre as 18 espécies de cestoda da Família Nematotaeniidae apenas oito são parasitos de anfíbios, e as Famílias de Anuros comumente parasitados por esses cestoda são: Bufonidae, Ranidae, Hylidae e Leptodactylidae. Em anfíbios da Família Bufonidae, foram identificados três espécies do gênero *Nematotaenia*, cinco do gênero *Cylindrotaenia* e uma espécie do gênero *Distoichometra* (Jones, 1987).

De acordo com Jones (1987), as espécies Família da Nematotaeniidae normalmente possuem pequeno número de testículos por segmento, corpos cilíndricos e órgãos paruterinos não existindo outro grupo dentre os cestoda que apresentam essas três características em seus representantes. Considerando estes parâmetros, nossos dados estão de acordo com Jones (1987), classificando o Cestoda descrito em *R. marina* de Belém-PA, como membro dessa Família.

Outro caráter para diagnóstico dessa Família é o processo de formação das cápsulas paruterinas. Nestes indivíduos estas cápsulas são formadas a partir de uma massa tecidual localizada na porção anterior do útero, em outros grupos de cestoda que possuem órgãos paruterinos, estas são formadas diretamente do útero (Douglas, 1958; Swiderski & Tkach; 1997). Isso também foi visualizado em nossos dados de microscopia de luz, reforçando a inclusão desses parasitos na Família Nematotaeniidae.

Nossos dados morfológicos não se enquadram aos observados em outras Famílias, pois o processo de formação dos órgãos paruterinos em Dilepididae, Anaplocephalidae, Mesocestoididae e Devaineidae descritas segundo Douglas (1958) e Yamaguti (1959), são bastante diferentes do observado no cestóide de *R. marina* de Belém – PA.

Deste modo, o parasito possui todas as características morfológicas que o enquadram na Família Nematotaeniidae.

Existem algumas revisões descrevendo a Família Nematotaeniidae (Douglas, 1958; Stumpf, 1982; Jones, 1987), e chaves de identificação (Yamaguti, 1959; Prudhoe & Bray, 1982); porém, ainda não existem critérios que facilitem a classificação dos gêneros e espécies que compõe esta Família. Isto se deve à grande variedade de caracteres utilizados sem padronização pelos pesquisadores, para distinguir as espécies. Além disso, estes helmintos possuem características morfológicas muito difíceis de serem observadas.

Douglas (1958) e Yamaguti (1959) descrevem quatro Gêneros para a Família Nematotaeniidae: *Nematotaenia*, *Distoichometra*, *Baerietta* e *Cylindrotaenia*, baseando-se no número de testículos, morfologia, disposição e número de cápsulas paruterinas no proglote grávido. Por outro lado, de acordo com esses autores, caracteres como: ovário e glândula de vitelo únicos, medulares e compactos; poro genital, bolsa do cirro e cirro também únicos e dispostos alternadamente nas margens laterais de cada proglote maduro, seriam características em comum, entre os gêneros.

Assim, considerando inicialmente o número de testículos, o gênero *Cylindrotaenia* teria apenas um testículo, enquanto dois testículos estariam presentes nas espécies dos gêneros *Baerietta*, *Nematotaenia* e *Distoichometra*.

No entanto, Jones (1987) propôs que todos os gêneros da Família Nematotaeniidae teriam dois testículos, um ovário, uma glândula vitelogênica, uma bolsa do cirro e um cirro. Portanto, para se diferenciar entre os gêneros se consideraria a morfologia, disposição e número de cápsulas paruterinas por proglote grávido e morfologia da bolsa do cirro e do cirro nos proglotes maduros; sendo que todos os gêneros teriam dois testículos.

Deste modo, Jones (1987) ao fazer uma revisão taxonômica sobre a Família Nematotaeniidae mostra que *Cylindrotaenia* possui dois testículos, tornando *Baerietta* uma sinonímia deste gênero e, no mesmo trabalho o autor propõe um novo gênero. Assim, a maioria das espécies descritas sob o gênero *Baerietta*, hoje são consideradas do gênero *Cylindrotaenia*.

De acordo com Jones (1987) a Família Nematotaeniidae passa a ser composta de quatro gêneros com variação de um gênero novo: *Nematotaenia*, *Distoichometra*, *Cylindrotaenia* e *Bitegmen*.

De acordo com Yamaguti (1959), Douglas (1986) e Jones (1987); os helmintos do gênero *Nematotaenia* e *Distoichometra*, são distinguíveis de outros gêneros por possuírem cinco ou mais cápsulas paruterinas nos segmentos grávidos. Contudo, estes gêneros se diferenciam na disposição destes órgãos paruterinos: em *Nematotaenia* eles se encontram dispersos no proglote e em *Distoichometra* se agregam posteriormente. Estas características não são observadas nos cestoda parasitos de intestino delgado de *R. marina* de Belém- PA, as que, apresentam apenas duas cápsulas paruterinas unidas basalmente.

De acordo com Jones (1987) *Bitegmen*, até o momento identificado apenas em répteis, possui duas cápsulas paruterinas pareadas, por segmento, e delimitadas por um envoltório fibroso espesso. Apresentam cirro com fibras musculares que se prendem anteriormente à parede da bolsa; a parte anterior do átrio genital é circundada por tecido muscular, diferenciando-se do cestóide do presente estudo que apesar de possuir duas cápsulas paruterinas por segmento grávidico, não apresentam envoltório de revestimento fibroso espesso e ausência fibras musculares na parede da bolsa do cirro.

Em nossos resultados, a presença de duas cápsulas paruterinas, sem revestimento, ovais e paralelas, unidas pela base, incluíram inicialmente nossos exemplares no Gênero

*Cylindrotaenia*, de acordo com as descrições de Douglas (1958), Yamaguti (1959) e Jones (1987). Porém, mesmo apresentando morfologia da bolsa do cirro e cirro similares ao descrito por esses autores, observamos nas nossas amostras a presença de dois cirros e suas disposições em cada lado de um mesmo proglote maduro, o que desvincula nossos exemplares do gênero *Cylindrotaenia*.

Além disso, observamos a presença de dois grupos de órgão reprodutores por proglote maduro; cada grupo está composto de dois testículos, um ovário, uma glândula vitelogenética e uma bolsa do cirro finalizando-se em um poro genital lateral. Estes dois grupos estão dispostos de forma alternada e oposta no proglote maduro. Esses dados são corroborados pela visualização direta dos vermes comprimidos, em cortes histológicos seriados longitudinais e transversais e pela visão de dois poros em posição oposta através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Esses parâmetros morfológicos encontrados nos impossibilitaram de classificar os espécimes deste estudo como membros do Gênero *Cylindrotaenia*.

Se considerarmos apenas isoladamente os parâmetros: diâmetro do escólice, morfologia da bolsa do cirro e forma do cirro; nossos espécimes se incluíam no Gênero *Cylindrotaenia* e poderiam ser comparados com os cinco grupos de espécies já descritos para este Gênero por Jones (1987).

- O Grupo I, *Cylindrotaenia americana*, composto de duas espécies americanas, *Cylindrotaenia americana* (Colômbia e Peru) e *Cylindrotaenia idahoensis* (Estados Unidos).
- O grupo *Cylindrotaenia crinia* (Grupo II): contém espécies da Austrália e Nova Zelândia.

- O Grupo III, *Cylindrotaenia jaegerskioeldi*: ocorre principalmente na África, Sri Lanca e Japão.
- O grupo *Cylindrotaenia japonica* (Grupo IV) parece estar restritamente distribuído no Japão.
- O grupo V, nomeado de *Cylindrotaenia montana*.

O Grupo III inclui espécimes que possuem segmentos grávidos com órgãos paruterinos dividindo os embriões em dois grupos e expandido as cápsulas paruterinas em dois grandes sacos ovóides; excluindo, portanto, a possibilidade do cestóide parasito de *R. marina* de Belém-PA pertencer a este grupo.

Ao observarmos parâmetros como o canal copulatório, bolsa do cirro e morfologia das cápsulas paruterinas, é notável que o cestóide do presente estudo apresenta um ducto não muscular, bolsa do cirro simples e cápsulas paruterinas simples não separadas por um “pescoço”. Diferenciando-os completamente dos espécimens do Grupo IV que possuem o canal copulatório muscular e do Grupo V, que possui a bolsa do cirro com uma complexa parede fibrosa e cápsulas paruterinas separadas por um “pescoço”.

Os cestóides de *R. marina* de Belém-PA possui então algumas características comuns aos Grupos I e II. A morfologia e localização das cápsulas paruterinas situadas dorso-ventralmente e localização do hospedeiro (Continente Americano), como o Grupo I (*Cylindrotaenia americana*); porém, possui cirro com espinhos ou microtríquias assim como o Grupo II (*Cylindrotaenia crinia*).

Jones (1987) não inclui algumas espécies já descritas de *Cylindrotaenia* (*C. diana* (Heifer, 1948), *C. chilensis* Puga & Franjola, 1983, *C. malayi* (Yuen & Fernando, 1974) e *C. roonwali* Nama, 1972) nestes grupos devido ao estado de preservação das espécies-tipo

depositadas nos Museus, assim o cestóide do presente estudo difere-se de todos esses grupos de *Cylindrotaenia*

Os cestóides deste trabalho possuíram maior similaridade com as espécies do grupo *C. americana*; já que as cápsulas paruterinas encontram-se sempre pareadas dorso-ventralmente e não são completamente divididas como no Grupo III *C. jaegerskioeldi* ou divididas por um pescoço como no Grupo V *C. montana*.

Para fins de comparação, veja Tabela 3.

**Tabela 2:** Comparação das medidas dos parâmetros morfológicos das espécies de cestoda do Grupo *Cyindrotaenia americana* e o cestóide encontrado em *R. marina* de Belém-PA. (Medidas em Micromêtros. )

| <b>Parâmetros</b>          | Cestoda de <i>R.marina</i> de Belém-Pa | <i>C. Americana</i> (Jones, 1987) | <i>C. idahoensis</i> (Jones, 1987) | <i>C. chilensis</i> (Puga & Franjola, 1983) |
|----------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------|
| (Comprimento x Largura)    |                                        |                                   |                                    |                                             |
| Comprimento                | 70 mm                                  | 35 – 61 mm                        | 15,5mm                             | 42 mm                                       |
| Diâmetro do Escólice       | 173 – 233                              | 123 – 408                         | 294 – 431                          | 500 – 600                                   |
| Ventosas                   | 134 – 167 X 135 – 167                  | 65 – 115                          | 115 – 160                          | 130                                         |
| Diâmetro do Canal Excretor | 16 – 23                                | 8 – 20                            | 8                                  | **                                          |
| Proglotes Maduros          | 35 – 41 X 323 – 343                    | 15 – 54 x 92 – 485                | 24 – 39 X 197 – 26                 | 70 – 100 X 300 – 400                        |
| Testículos                 | 61 – 115 X 27 – 35                     | 12 – 48 X 20 – 101                | 19 – 25 X 41 – 60                  | 20 – 30 X 10 – 20                           |
| Cirro                      | 15,5 – 17,5                            | 20 – 32                           | 31 – 37                            | **                                          |
| Bolsa do Cirro             | 38 – 41 X 16 – 19                      | 29 – 56 X 9 – 31                  | 31 – 37X 23 – 27                   | 30 x 20                                     |
| Ovário                     | 44 – 53 X 32 – 44                      | 8 – 48 X 10 – 58                  | 18 – 21 X 27 – 39                  | 20 – 30 X 20 – 30                           |
| Glândula de Vitelo         | 25 – 35                                | 4 – 31 X 10 – 39                  | 15 – 17 X 25 – 31                  | 20                                          |
| Proglote Pré-Grávido       | 72 – 89 X 817 – 890                    | 23 – 138 X 92 – 490               | 77 – 269 X 192 – 269               | 150 – 170 X 330 – 350                       |
| Órgãos paruterinos         | 80 – 112 X 28,49 – 40                  | 17 – 78 X 12 – 68                 | 31 – 68 X 48 – 90                  | **                                          |
| Proglotes Grávidos         | 337 – 418 X 176 – 224                  | 45 – 154 X 154 – 539              | 139 – 184 X 184 – 423              | 24 – 380 X 160 – 230                        |
| Cápsula Paruterina         | 65 – 72 X 66 – 74                      | 23 – 68                           | 55 – 108                           | 80 – 120 X 40 – 70                          |
| Oncosferas por cápsula     | 7 – 9                                  | 0 – 10                            | 5 – 9                              | 4 – 6                                       |
| Oncosferas por segmento    | 15 – 19                                | 0 – 19                            | 11 – 17                            | 10 – 12                                     |
| Envelope Externo           | 27 – 33 X 15 – 18                      | 14 – 39 X 10 – 27                 | 27 – 29 X 20 – 25                  | 30 x 20                                     |
| Ganchos                    | 7 – 9                                  | 6 – 10                            | 10 – 10                            | 10                                          |
| Tegumento                  | 14 – 20                                | **                                | **                                 | 5                                           |

\*\* Dados não fornecidos pelo autor

As espécies do grupo *C. americana* se diferenciam principalmente pela morfologia dos órgãos paruterinos que são mais largos do que longos em *C. idahoensis* [*Baerietta idahoensis*] (Waitz & Mehra, 1961 *apud* Jones, 1987) e mais longos do que largos em *C. americana*.

Outra espécie desse grupo foi descrita em anfíbios da espécie *Batrachyla taeniata* (Amphibian: Leptodactylidae) no Chile por Puga & Franjola (1983), *Cylindrotaenia chilensis* [*Baerietta chilensis*]. Esta espécie de cestoda possui similaridade com o cestóide do presente estudo; no entanto, diferencia-se principalmente por possuir poucos ovos por segmento (5-9 ovos), tegumento mais fino (*Cylindrotaenia chilensis*, 3 µm; Cestoda de *R. marina* de Belém – PA, 16 µm), único bulbo por proglote grávido e um único cirro por proglote maduro.

Como explanado anteriormente alguns parâmetros morfológicos posicionam o cestoda aqui descrito, no Gênero *Cylindrotaenia*, tais como: morfologia e morfometria das cápsulas e complexos paruterinas e morfologia da bolsa do cirro. Porém, não se pode ignorar dados importantes como o número de órgãos reprodutores masculino e feminino, número de cirros e poros genitais nos proglotes maduros, os quais dissociam este cestoda não somente das espécies descritas para esse Gênero, quanto do próprio Gênero *Cylindrotaenia* e, também, dos demais gêneros da Família Nematotaeniidae.

Deste modo, após extensa análise, baseada no conjunto de dados obtidos por variadas técnicas e pela comparação com os dados da literatura, é aqui proposto um novo gênero e uma nova espécie para a Família Nematotaeniidae: *Lanfrediella amphicirrus* n. gen. n. sp.

*Lanfrediella amphicirrus* n. gen. n. sp. é o primeiro parasito de *R. marina* descrito em Belém – PA. Outras espécies de Nematotaeniidae como a *Cylindrotaenia americana* foram descritos em anfíbios brasileiros por Stumpf (1982), Jones (1987) e Santos (2009).

## Sumário Taxonômico

*Lanfrediella ampicirrus* n. gen. n. sp.

Hospedeiro: *Rhinella marina* (Linnaeu, 1758) (Amphibia: Bufonidae)

Local de infecção: Intestino delgado

Localidade: Belém, PA, Brasil 01° 28'03''S , 48° 20'18''W.

Prevalência: 60%

Amplitude de infecção: 3 - 160 helmintos/hospedeiro

Espécie Tipo: CHIOC 37314a-b; CHIOC 35706 (Anexo III)

Etimologia: O nome do Gênero é baseado no sobrenome de Reinalda Marisa Landredi que contribuiu com os estudos de helmintologia na Região Amazônica e o epíteto específico foi baseado na característica morfológica importante da espécie, do latim *amphi* – dois; *cirrus* – órgão de cópula do parasito.

### 4.1 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA O ESTUDO DE CESTÓIDES

Em nossas análises, a utilização de técnicas como microscopia de luz (montagem para análise direta, secções em parafina e Historesina<sup>®</sup>) e microscopia eletrônica de varredura possibilitaram estudos mais aprofundados, adicionando dados na literatura sobre a morfologia dos helmintos da Família Nematotaeniidae, sendo o primeiro trabalho a apresentar resultados com Microscopia Eletrônica de Varredura; possibilitando a observação de detalhes ultraestruturais de superfície do helminto, e auxiliando na observação dos poros laterais, confirmando a existência de dois poros por proglote.

A disposição e o número de poros por proglote são de difícil resolução nas observações dos cestoda corados com Carmin<sup>®</sup> (análise direta). Uma vez que na primeira,

devido a contrações e torções do parasito durante o processo de fixação, o estróbilo nem sempre fica adequadamente comprimido.

Este é o primeiro estudo de cestoda pelo método de inclusão em Historesina<sup>®</sup> técnica inovadora, que auxiliou na visualização das estruturas internas, por exemplo, testículos, ovários, glândulas de vitelo, ductos espermáticos e bolsa do cirro, além de preservar melhor o tegumento do parasito. Assim sugere-se que esta técnica pode ser útil em estudos futuros para diagnóstico da espécie.

Se comparado o método de inclusão em Historesina<sup>®</sup> e inclusão em parafina, observou-se que as estruturas internas do parasito apresentaram-se mais preservadas no método de inclusão por Historesina<sup>®</sup>; um exemplo disto foi a diferença de espessura do tegumento de acordo com o método. A inclusão em parafina gera mais artefatos e diminui sua espessura.

Fiala (2005) considera que a metodologia de reconstrução 3D de secções seriadas, por muitas vezes demorada e difícil, facilita o estudo de estruturas com complexo arranjo celular e anatômico.

No presente estudo a reconstrução 3D dos cortes seriados dos proglotes maduros facilitou a visualização das estruturas internas do helminto, principalmente a disposição dos dois cirros por proglote. Somente a análise por microscopia de luz através de coloração e montagem entre lâmina e lamínula, fornece difícil visualização. Por outro lado, a análise de cortes transversais e longitudinais muitas vezes deixa dúvidas sobre a disposição e organização dos órgãos internos, devido a fragilidade dos tecidos e conseqüentes produções de artefatos de técnica.

Portanto, a reconstrução 3D de cortes seriados de amostras incluídas em Historesina<sup>®</sup> pode ser uma importante ferramenta de análise complementar para facilitar a taxonomia de

membros da Família Nematotaeniidae, que por apresentarem corpo cilíndrico, possuem segmentação externa do corpo e estruturas internas de difícil visualização.

Após a amplificação e seqüenciamento do 18S rDNA das populações de dois bairros diferentes de Belém-PA, observou-se que em ambos locais, os cestodas parasito de *R. marina* pertenciam a mesma espécie, já que estes não apresentavam diferenças moleculares corroborando com os dados morfológicos.

Através das análises filogenéticas foram encontradas evidências que aproximam a Família Nematotaeniidae e Daivaineidae. Isso pode ser devido a algumas características morfológicas compartilhados por alguns membros destas Famílias, como por exemplo, a presença de órgãos paruterinos em membros da Família Davaneidae Sub-Família Idogeninae Fuhrmann1907.

Swiderski e Tkach (1997) observaram a existência de homologia morfológica entre a origem, diferenciação e função dos órgãos paruterinos entre membros da Família Nematotaeniidae e Família Mesocestoidea; assim como, com as cápsulas dos ovos de *Raillietina* spp, o que está de acordo com nossas observações no presente estudo e com o observado por Foronda et al. (2004), que realizaram um estudo de filogenética molecular com alguns membros da Ordem Cyclophyllidea.

O banco de dados de seqüências gênicas de cestoda ainda é muito limitado, apresentando apenas 400 seqüências, dentre elas cerca de 90% são de espécies do gênero *Echinococcus* Rudolphi, 1801 ou *Taenia* Linnaeus, 1758 disponíveis no *GenBank* até o dia 10 de Março de 2010.

Dentre estas existe apenas uma seqüências parcial de 459pb do 18S rDNA de um membro da Família Nematotaeniidae, da espécie *Distoichometra bufonis*, depositado por Mariaux (1996). Deste modo, nosso trabalho contribuiu com a adição de uma nova seqüência

gênica de helmintos da Família Nematotaeniidae, e que poderá ser utilizada em estudos filogenéticos. No entanto, ainda são necessários estudos complementares com adição de seqüências nucleotídicas de espécies já descritas e de novas espécies para que esta ferramenta seja mais utilizada, facilitando assim classificação e identificação de novas espécies.

## 5. CONCLUSÕES

- O Cestoda parasito de intestino delgado de *R. marina* de Belém-PA, pertence à Família Nematotaeniidae.
- Dados de Microscopia Eletrônica de Varredura e Historesina<sup>®</sup> foram inovadores para a distinção desses cestoda das demais espécies descritas no mundo, uma vez que essas técnicas ainda não haviam sido utilizadas para os estudos dos cestoda da Família Nematotaeniidae.
- A Análise por reconstrução 3D de estruturas foi uma nova ferramenta utilizada no estudo de helmintos e foi de grande auxílio no entendimento da disposição dos órgãos internos do parasito do presente estudo, podendo ser uma técnica complementar no estudo e taxonomia de helmintos.
- Comparando os exemplares por nós estudados com os demais indivíduos da Família Nematotaeniidae, através de Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Varredura sugerimos que o cestoda parasito de *R. marina* ainda não havia sido descrita, sugerindo um novo gênero e espécie: *Lanfrediella ampicirrus* n. gen. n. sp.
- O presente trabalho contribuiu com a adição de novas sequências nucleotídicas para o banco de dados mundial, que poderão ser úteis para compreensão de relações filogenéticas de parasitos.
- Nossos dados contribuem para a adição de mais uma espécie de helminto na diversidade de parasitos de *Rhinella marina*, da Região Amazônica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPHIBIA WEB: Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California.

Disponível em: <<http://amphibiaweb.org/>>. Acessado: 05/05/2010.

BARTON, D.P. Introduced animals and their parasites: The cane toad, *Bufo marinus*, in Australia. *Australian J. Ecology*, **22**: 316-324, 1997.

BARTON, D.P. Ecology of helminth communities in tropical Australian amphibians. *International Journal of Parasitology*, **29**: 921-926, 1999.

BRANDT, L.A. & MAZZOTTI, F.J. Marine Toads (*Bufo marinus*). *Institute of Food and Agricultural Sciences Extension, University of Florida*, WEC **11**: 1-4, 2002

BOWMAN, D.D & LYNN, R.C. *Parasitology For Veterinarians*. Sixth Edition. W.B. Saunders Company, 1995. Pág. 129-150.

BROOKS D.R & HOBERG E.P. Parasite systematic in the 21st century: opportunities and obstacles. *TRENDS in Parasitology*, **17 (6)**: 273-275, 2001.

CANNATELLA, D. & GRAYBEL, A. Bufonidae. True Toads. Version 01 January 1995.

Em: *The Tree of Life Web Project*, Disponível em: <<http://tolweb.org/>>. Acessado em 05/05/2010.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. The Online Source for Credible Health Information. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>>. Acessado em: 05/05/2010.

CHAPARRO, J.C.; PRAMUK, J.B.; GLUESENKAMP, A.G. A New Species of Arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) From Cloud Forest of Southeastern Peru. *Herpetologica*, **63(2)**: 203-212, 2007.

- CHERVY, L. The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic Parasitology*, **52**: 1–33, 2002.
- CHO, J.H.; LEE, K.B.; YOUNG, T.S.; KIM, B.S.; PARK, H.B.; RYU, K.N.; PARK, J.M.; LEE, S.Y.; SUH, J.S. Subcutaneous and skeletal sparganosis: imaging characteristics and pathologic correlations. *Skeletal Radiology*, **29**: 402 – 408, 2000.
- COLLINS, J. CNAH - The Academic Portal for North American Herpetology. Disponível em: <<http://cnah.org/>>. Acessado em: 05/05/2010.
- CRAIG, P. & ITO, A. Intestinal Cestodes. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **20**: 524–532, 2007.
- DOUGLAS, L.T. The Taxonomy of Nematotaeniid Cestodes. *The Journal of Parasitology*, **4** (3): 261 – 273, 1958.
- DUBEY, S. & SHINE, R. Origin of the parasites of an invading species, the Australian cane toad (*Bufo marinus*): are the lungworms Australian or American?. *Molecular Ecology*, **1**: 1-7, 2008.
- ESPÍNOLA-NOVELO, J.F. & GUILLÉN-HERNÁNDEZ, S. Helminth Parasites in *Chaunus* and *Cranopis valliceps* (Anura: Bufonidae) from Lagunas Yalahau, Yucatan, Mexico. *Journal of Parasitology*, **94**(3): 672-674, 2008.
- ESPINOZA-JIMÉNEZ, A.; GARCIA-SARABIA, L.; OSORIO-SARABIA, D.; LEÓN-RÉGAGNON, V. Checklist of Helminth Parasites of the Cane Toad *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae) From Mexico. *Journal of Parasitology*, **93**(4): 937-944, 2007.
- FORONDA, P.; CASANOVA, J.C.; VALLADARES, B.; MARTINEZ, E.; FELIU, C. Molecular systematics of several cyclophyllid families (Cestoda) based on the analysis of 18S ribosomal DNA gene sequences. *Parasitology Research*, **93**: 279-282, 2004.

FROST, D.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.; HAAS, A.; HADDAD, C.; DESÁ, R.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.; RAXWORTHY, C.; CAMPBELL, J.; BLOTTO, B.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.; LYNCH, J.; GREEN, D.; WHELLER, W. The Amphibian Tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **297**: 1-370, 2006.

IUCN, Conservation International, and NatureServe. Global Amphibian Assessment. Disponível em: <<http://www.globalamphibians.org>>. Acessado em 05/05/2010.

IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG). Global Invasive Species Database. Disponível em: <[http:// www.issg.org/](http://www.issg.org/)>. Acessado em 05/05/2010.

GARCÍA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; EVANS, C.A.W.; GILMAN, R.H. *Taenia solium* cysticercosis. *The Lancet*, **361**: 547-556, 2003

GREENLEES M.J.; BROWN G.P.; WEBB J.K.; PHILLIPS B.L.; SHINE R. Do invasive cane toads (*Chaunus marinus*) compete with Australian frogs (*Cyclorana australis*)?. *Austral Ecology*, **32**: 900–907, 2007.

HALTON, D.W. Nutritional Adaptations to Parasitism within the Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology*, **27 (6)**: 693 – 704, 1997.

HALTON, D.W.; MAULE, A.G.; MAIR, G.R.; SHAW, C. Monogenean neuromusculature some structural and functional correlates. *International Journal for Parasitology*, **28**: 1609 – 1623, 1998.

HALTON D.W. Microscopy and the helminth parasite. *Micron*, **35**: 361–390, 2004.

JONES, M.K. A taxonomic revision of the Nematotaeniidae Lühe, 1910(Cestoda: Cyclophyllidea). *Systematic Parasitology*, **10**: 165-245, 1987.

- JONES, M.K. Structure and Diversity of cestode epithelia. **International Journal for Parasitology**, **17**: 913-923, 1998.
- KUCHTA, R.; SCHOLZ, T.; BRABEC, J.; BRAY, R.A. Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphylobothriidea. **International Journal for Parasitology**, **38**: 49–55, 2008.
- KWET, A.; DI-BERNARDO, M.; MANEYRO, R. First Record of *Chaunus achavali* (Anura, Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Brazil, with a key for identification of the species in the *Chaunus marinus* group. **Iheringia, Sér. Zool.**, **96(4)**: 479-485, 2006.
- LANOO, M. **Amphibian declines: The conservation status of United States species**. University Of California Press. Berkeley and Los Angeles London. Part Two: 384 – 440, 2005.
- LEE, S.H.; WE, J.S.; SOHN, W.M.; HONG, S.T.; CHAI, J.Y. Experimental life history of *Spirometra erinacei*. **The Korean Journal of Parasitology**, **28 (3)**: 161-173, 1990.
- LEVRON, C.; PODDUBNAYA, L.G.; KUCHTA, R.; FREEMAN, M.; WANG, Y.H.; SCHOLZ, T. SEM and TEM study of the armed male terminal genitalia of the tapeworm *Paraechinophallus japonicus* (Cestoda: Bothriocephalidea). **Journal of Parasitology**, **94(4)**: 803-810, 2008
- MACPHERSON, C.N.L. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. **International Journal of Parasitology**, **35**: 1319 - 1331, 2005.
- MAIR, G.R.; MAULE, A.G.; SHAW, C.; HALTON, D.W. Muscling in on Parasitic Flatworms. **Parasitology Today**, **14 (2)**: 73-76, 1998.

- MARIAUX, J. Cestode Systematics: Any Progress? *International Journal for Parasitology*, **26(3)**: 231-243, 1996.
- MIN, D.Y. Cestode Infection in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, **28**: 123-144, 1990.
- MONIS, P.T. The importance of systematic in parasitological research. *International Journal for Parasitology*, **29**: 381-388, 1999.
- MORAES NETO, A.H.; THATCHER, V.E.; LANFREDI, R.M. *Amphimerus bragai* n. sp. (Digenea: Opisthorchiidae), a parasite of the rodent *Nectomys squamipes* (Cricetidae) from Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **93(2)**: 181-6, 1998.
- NBCI TAXONOMY DATABASE. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>. Acessado em 05/05/2010.
- PALM, H. W.; MUNDT, U.; OVERSTREET R. Sensory receptors and surface structure of trypanorhynch cestodes. *Parasitology Research*, **86**: 821-833, 2000
- PRUDHOE, S. & BRAY, R.A. *Platyhelminth parasites of the Amphibia*. London: British Museum (Natural History) and Oxford University Press, 1982.
- PUGA, S. & FRANJOLA, R. *Baerietta chilensis* sp. Nov., (Cestoda; Nematotaeniidae); primera especie neotropical descrita en el anuro chileno *Batrachyla taeniata* (Leptodactylidae). *Buletin Chileno di Parasitologia*, **30**: 521-525, 1983.
- RAETHER, W. & HÄNEL, H. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. *Parasitology Research*, **91**: 412-438, 2003.
- RAGOO, R.M. & OMAHMAHARAJ, I.R. Helminths of the Cane Toad *Bufo marinus* from Trinidad, West Indies. *Caribbean Journal of Science*, **39(2)**: 242-245, 2003.

REY, L. *Parasitologia*. 4ª Ed. GUANABARA KOOGAN, 2008.

RUHNKE, T.R.; CAIRA, J. N.; CARPENTER, S.D. *Orectolobicestus* n. g. (Cestoda: Tetraphyllidea), with the description of five new species and the transfer of *Phyllobothrium chiloscyllyi* to the new genus. *Systematic Parasitol* **65**: 215–233, 2006.

SANTOS, V.T.; AMATO, S.B. Helminth fauna of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) from the Rio Grande do Sul Coastland, Brazil - analysis of the parasitic community. **The Journal of Parasitology**

SCHMIDT, G.D & LARRYS, S.R. *Foundations of Parasitology*. Fifth Edition. Wm C.Brow Publisher, 1996.

SCHOLZ, T.; ZD'ÁRSKA Z., CHAMBRIER, A.; DRÁBEK, R. Scolex morphology of the cestode *Silurotaenia siluri* (Batsch, 1786) (Proteocephalidae: Gangesiinae), a parasite of European wels (*Silurus glanis*). *Parasitology Research*, **85**: 1-6, 1999.

SIM, S.; YOU, J.K.; LEE, I.Y.; IM, K.I.; YOUNG, T.S. A case of breast sparganosis. *The Korean Journal of Parasitology*, **40 (4)**: 187-189, 2002.

SMYTH J. D. *Introduction to Animal Parasitology*. Third edition, Cambridge University Press, 1995.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPETOLOGIA. Lista de Anfíbios do Brasil. Disponível em : < <http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acessado em 05/05/2010.

SPEARE, R. A Review of the Diseases of the Cane Toad, *Bufo marinus*, with Comments on Biological Control. *Aust. Wildl. Res.*, **17**: 387-410, 1990.

SPEARE, R. *Amphibians Disease Home Page*. Amphibians Diseases Group. James Cook University. Modificado em 2 January 2008. Disponível em:

<<http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/ampdis.htm>>. Acessado em 05/05/2010.

STUMPF I.V.K.; Estudo Da Família Nematotaeniidae Lühe,1910. *Acta. Biol. Par.* **10(11):** 53-106, 1982

SWIDERSKI Z.; TKACHT V. Differentiation and Ultrastructure of the Paruterine Organs and Paruterine Capsules, in the Nematotaeniid Cestode *Nematotaenia dispar* (Goeze,1782) Lühe, 1910, a Parasite of Amphibians. *International Journal of Parasitology*, **27 (6):** 635-644, 1997.

TORRES, P.; AEDO, E.; FIGUEROA, L.; SIEGMUND, I.; SILVA, R.; NAVARRETE, N.; PUGA, S.; MARIN, F.; AEDO E. Infección por helmintos parásitos en salmón coho, *Oncorhynchus kisutch*, durante su retorno al río Simpson. *Chile. Bol. chil. Parasitol.*; **55(1-2):**.31-35, 2000.

TYLER, S. & TYLER, M. S. Origin of Epidermis in Parasitic Platyhelminths. *International Journal of Parasitology*, **27 (6):** 715-738, 1997

VICENTE, J.J.; RODRIGUES, H.O.; GOMES, D.C.; PINTO, R.M. Nematóides do Brasil 2ª Parte: Nematóides de Anfíbios. *Revista Brasileira de Zoologia*, **7(4):** 549-626, 1990.

WIKIPÉDIA. Desenvolvido pela Wikimedia Foundation. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Bufo\\_marinus&oldid=12579909](http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Bufo_marinus&oldid=12579909)>. Acessado em: 24/11/2008.

YAMAGUTI, S. *Systema Helminthum. Vol. II. The Cestodes of Vertebrates*. Interscience Publishers, New York, 1959.

YANG, J.W.; LEE, J.H.; KANG, M.S. A Case of Ocular Sparganosis in Korea. *Korean Journal of Ophthalmology*, **21 (1):** 48-50, 2007.

YOON, K.C.; SEO, M.S.; PARK, S.W.; PARK, Y.G. Eyelid Sparganosis. *American Journal Of Ophthalmology*, **138 (5)**: 873-875, 2004.

YOUNG, B.E; STUART, S.N; CHANSON, J. S; COX, N.A; BOUCHER, T.M.  
*Disappearing Jewels: The Status of New World Amphibians*. Nature Serve, Arlington Virginia, 2004.

ZUG, G.R & ZUG, P.B. *The Marine Toad, Bufo marinus: A Natural History Resumé of Native Populations*. Smithsonian Institution Press. City of Washington, 1979

## **7. ANEXO I**



comitê de ética em pesquisa  
com animais de experimentação



**PARECER BIO010-10**

**Projeto: ANÁLISE TAXONÔMICA E MOLECULAR DE CESTODA DE  
INTENSTINO DELGADO DE *Rinella marina* (ANPHIBIA: BUFONIDADE  
(LINEAU, 1758) DE BELÉM-PARÁ .**

**Coordenador:** Prof. Dra Jeannie Nascimento dos Santos

**Área Temática:** Biologia

**Vigência:** 04/2008 a 04/2011

**Nº no CEPAE-UFPA:** BIO010-10

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 03 de março de 2008

Com Animais de Experimentação da Universidade  
Federal do Pará

**8. ANEXOS II**



## **9. ANEXOS III**





**10.ANEXO IV**