



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

**DIROFILARIOSE CANINA EM DOIS MUNICÍPIOS DA ILHA DO MARAJÓ, ESTADO
DO PARÁ, BRASIL: UM ENFOQUE EPIDEMIOLÓGICO, MORFOLÓGICO E
MOLECULAR**

ADRIANO PENHA FURTADO

Belém-Pará
2009

ADRIANO PENHA FURTADO

DIROFILARIOSE CANINA EM DOIS MUNICÍPIOS DA ILHA DO MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, BRASIL: UM ENFOQUE EPIDEMIOLÓGICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Profa. Dra. Reinalda Marisa Lanfredi

Belém-Pará
2009

Furtado, Adriano Penha

Dirofilariose canina em dois municípios da Ilha do Marajó, Estado do Pará, Brasil: um enfoque epidemiológico, morfológico e molecular, Belém – Pará, 2009, 95p, Tese de Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

1. Dirofilariose 2. *Dirofilaria immitis* 3. Epidemiologia 4. PCR
5. Ilha do Marajó

ADRIANO PENHA FURTADO

DIROFILARIOSE CANINA EM DOIS MUNICÍPIOS DA ILHA DO MARAJÓ,
ESTADO DO PARÁ, BRASIL: UM ENFOQUE EPIDEMIOLÓGICO,
MORFOLÓGICO E MOLECULAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Profª. Dra. Reinalda Marisa Lanfredi
 Instituto de Biofísica - UFRJ

Banca Examinadora: Prof. Dr. Claudio Lisias Mafra de Siqueira
 Depto de Bioquímica e Biologia Molecular – UFV

Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. Paulo Sérgio dos Santos Souto
Instituto de Saúde e Produção Animal - UFRA

Prof. Dr. Evander de Jesus de Oliveira Batista
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

Profª. Dra. Jeannie Nascimento dos Santos (suplente)
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Belém, 03 de abril de 2009

*“Seja qual for o caminho escolhido,
mesmo o de palhaço,
a pessoa tem que estudar muito”*

Renato Aragão

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **ENORME** paciência da minha orientadora, Rey.

Ao Vallinoto, por todo apoio para a realização deste trabalho.

À minha AMIGA Jeannie, carinhosamente chamada de “chefinha”, por toda atenção dedicada para a realização deste trabalho. Este trabalho é seu também.

À queridíssima Elane, Delande, Delêndia ou Daisy, como der vontade de chamar, pelo grande apoio em todas as atividades desenvolvidas neste trabalho e pela paciência na hora de tirar qualquer dúvida, inclusive sobre qualquer coisa.

A todos os amigos do LBC, representados aqui por siglas pequenininhas, como IC's, PET e PIBIC-Jr. Guardo cada um desses meninos e meninas com enorme carinho. Titi, obrigado por todo apoio, incentivo, colo...

Aos novos alunos de Pós do LBC. Estou esperando vocês...

Aos novos amigos que fiz no Lab. de Virologia, pela paciência e companheirismo.

Aos amigos do LBHOW – RJ, pelo apoio moral, nas horas vagas e sérias, sejam em Belém, Rio de Janeiro, Recife ou onde for.

Aos meus amigos Palhaços, os Trovadores, que mesmo sem muita paciência, acompanharam (uns de perto, outros de longe) o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus verdadeiros amigos-irmãos de coração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 FILARÍDEOS	10
1.2 FILARÍDEOS DE CANÍDEOS	10
1.3 CICLO DE VIDA	12
1.3.1 Ciclo Zoonótico	16
1.4 DIROFILARIOSE CANINA	18
1.5 IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO DEFINITIVO	19
1.6 DISTRIBUIÇÃO DA DIROFILARIOSE	20
1.7 DIAGNÓSTICO DA DIROFILARIOSE	21
1.7.1 Pesquisa e Quantificação de Microfilárias	21
1.7.2 Pesquisa de Antígenos e Anticorpos Circulantes	24
1.7.3 Biologia Molecular	26
1.7.4 Pesquisa de vermes adultos	27
1.8 OBJETIVOS	28
1.8.1 Objetivo Geral	28
1.8.2 Objetivos Específicos	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 LOCAL DE COLETA	29
2.2 PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS	32
2.2.1 Amostras Sangüíneas e Pesquisa da Infecção	32
2.2.2 Filarídeos Adultos	33
2.3 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS	33
2.3.1 Microscopia de Luz	34
2.3.2 Análise Histológica	34
2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
2.4 ESTUDO MOLECULAR	35
2.4.1 Extração de DNA	35
2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
2.4.3 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados	37
2.4.4 Estudo Filogenético	37
3 RESULTADOS	38
3.1 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA	38
3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA	44
3.2.1 Microscopia de Luz	44
3.2.1.1 Morfometria dos Vermes Adultos	48
3.2.2 Análise Histológica	49
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	52
3.3 ANÁLISE MOLECULAR	63
4 DISCUSSÃO	69
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>D. immitis</i>	15
Figura 2: Diagnóstico por imagem da infecção por <i>D. immitis</i> em humano...	17
Figura 3: Métodos de diagnóstico de filarídeos em cães.....	23
Figura 4: Mapa de localização geográfica dos municípios estudados na Ilha do Marajó.....	30
Figura 5: Atividades de coleta no município de Salvaterra, Ilha do Marajó – PA.....	31
Figura 6: Índice de microfilaremia em 188 cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, distribuídos por sexo.....	41
Figura 7: Índice de microfilaremia em 188 cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, distribuídos por idade.....	42
Figura 8: Coração e pulmão de um cão necropsiado em São Sebastião da Boa Vista – Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	43
Figura 9: Aspectos microanatômicos por microscopia de luz de filarídeos adultos fêmeas e machos obtidos de cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista - Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	45
Figura 10: Aspectos microanatômicos capturados por câmara clara de filarídeos adultos fêmeas e machos obtidos de cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista - Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	46
Figura 11: Cortes histológicos transversais na região mediana do corpo de filarídeos coletados na Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	51
Figura 12: Aspectos da superfície do corpo, por MEV, dos filarídeos obtidos em cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista - Ilha do Marajó.....	53
Figura 13: Aspectos do deirídeo, por MEV, localizado na superfície do corpo dos filarídeos obtidos em cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista - Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	54
Figura 14: Variação das alterações cuticulares observadas em filarídeos coletados nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista – Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	55
Figura 15: Detalhes da vulva de filarídeo fêmea coletada no município de São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	57
Figura 16: Detalhes da abertura anal e fasmídeos de filarídeo fêmea coletada no município de São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	58
Figura 17: Aspectos das alterações cuticulares observadas na região posterior espiralada dos filarídeos machos dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	59
Figura 18: Aspectos das alterações cuticulares arredondadas observadas na região posterior espiralada dos filarídeos machos dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará..	61
Figura 19: Detalhe da disposição das estruturas sensitivas localizadas na extremidade posterior de filarídeos machos dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	62

Figura 20: Detalhe da disposição dos espículos dos filarídeos machos dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará.....	64
Figura 21: Produto da PCR submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,5% usando <i>primers</i> DIDR-F1 e DIDR-R1.....	65
Figura 22: Alinhamento das seqüências obtidas das amostras de microfilárias, de filarídeos adultos obtidos na Ilha do Marajó, do filarídeo adulto obtidos do Rio de Janeiro e das seqüências de filarídeos depositados no <i>Genbank</i>	67
Figura 23: Relação filogenética (Máxima Parcimônia, com 1000 réplicas de bootstrap) entre amostras de microfilárias, vermes adultos obtidos na Ilha do Marajó, vermes adultos obtidos no Rio de Janeiro e seqüências de filarídeos depositados no <i>Genbank</i>	68

RESUMO

Os filarídeos são nematóides parasitas de corpo alongado em forma de fio. Os filarídeos parasitas de cães pertencem à Família Onchocercidae, sendo representados principalmente pelos gêneros *Acanthocheilonema*, *Dipetalonema* e *Dirofilaria*. Estes filarídeos se desenvolvem em locais diferentes no hospedeiro vertebrado, necessitando da passagem por um hospedeiro invertebrado hematófago para completar seu ciclo. No cão, diferentes níveis de infecção podem ocorrer, desde assintomática, até o comprometimento cardiovascular, podendo levar à morte. Na Amazônia, pouco se sabe sobre a distribuição destes parasitas, e até o momento, não se realizou um estudo de diagnóstico diferencial. Este estudo foi realizado em dois municípios na Ilha do Marajó (Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista), com um enfoque epidemiológico (com a pesquisa de microfilárias em amostras de sangue de cães domésticos), morfológico (pela análise de características taxonômicas de vermes adultos) e molecular (pela comparação entre regiões gênicas de microfilárias circulantes em sangue canino e vermes adultos). O percentual de cães microfilarêmicos foi de 37,34% em Salvaterra e 6,67% em São Sebastião da Boa Vista, resultando numa prevalência total de 32,45%. Os filarídeos adultos coletados em ambos os municípios são da *Dirofilaria immitis*, por análise morfológica. Por análise de fragmentos gênicos, concluímos que as microfilárias encontradas na corrente sanguínea dos cães estudados também são da espécie *D. immitis*, e que estes cães não apresentaram infecção mista.

ABSTRACT

Filarids are elongate and filiforms nematodes parasites. Canids filarids parasites belong to the Onchocercidae Family and are represented mainly by Genus *Acanthocheilonema*, *Dipetalonema* and *Dirofilaria*. These filarids develop in different places in the vertebrate host, and need for haematophagus invertebrate host to complete your cycle. Different infection levels can occur, since assintomatic, until the death of dog. The filarids parasites of dogs are found mainly in the region between the tropics. In the Amazon region a little is known about the distribution of these parasites, and until this moment, a study of distinguishing diagnosis was not performed. With this objective, we choose two cities in the Marajó Island (Salvaterra and São Sebastião da Boa Vista) and carry through a epidemiologic, morphologic and molecular studies. The percentage of microfilareemics dogs was of 37.34% in Salvaterra and 6.67% in São Sebastião da Boa Vista, resulting in a total prevalence of 32.45%. Analyzing the morphologic characteristics of the collected adult filarids, we concluded that these worms are of the *Dirofilaria immitis* species. For analysis of genic region, we conclude that the microfilariaes found in the dogs blood studied are also *D. immitis* species, and that these dogs had not presented mixing infection.

1. INTRODUÇÃO

1.1 FILARÍDEOS

Os helmintos filarídeos são nematóides parasitas de vertebrados, que habitam o tecido conjuntivo e muscular, sistema circulatório e linfático além das cavidades serosas dos seus hospedeiros definitivos, sendo que sempre apresentam um invertebrado como hospedeiro intermediário (Smith, 1994).

Diversas famílias agrupam espécies de nematóides filarídeos, mas na Família Onchocercidae, que inclui 18 gêneros, estão agrupados as filárias parasitas de canídeos. Os membros desta família apresentam características morfológicas semelhantes, como: corpo cilíndrico, alongados em forma de fio, pseudocelomados e dióicos com dimorfismo sexual, boca simples sem ornamentação, espículos desiguais no tamanho e forma e abertura da vulva na região do esôfago, logo atrás do anel nervoso (Anderson & Bain, 1976; Vicente *et al.*, 1997).

1.2 FILARÍDEOS DE CANÍDEOS

Diversas espécies de filarídeos já foram descritas parasitando órgãos e tecidos de canídeos. Entretanto, trabalhos posteriores propõem que algumas espécies parasitas são, na verdade, sinônimos (Canestri-Trotti *et al.*, 1997). De qualquer modo, os filarídeos de cães podem ser assim classificados: Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea, Família Onchocercidae e Gêneros *Acanthocheilonema*, *Dipetalonema* e *Dirofilaria* (Vicente *et al.*, 1997).

As espécies dos Gêneros *Acanthocheilonema* e *Dipetalonema* são pouco conhecidas, pois raramente suas formas adultas são observadas em necropsias de cães. Estas filárias não são consideradas patogênicas, habitam o tecido subcutâneo e muscular do hospedeiro vertebrado, e possuem como vetores, carrapatos e pulgas (Bowman, 1990; Olmeda-García *et al.*, 1993).

O Gênero *Dirofilaria* é representado principalmente por duas espécies: *Dirofilaria (Noctiella) repens* Railliet e Henry, 1911 e *Dirofilaria (Dirofilaria) immitis* (Leidy, 1856) Railliet e Henry, 1911. Estas são as filárias mais comumente encontradas parasitando cães, mas, em locais diferentes neste hospedeiro: *D. repens* é comumente encontrada no tecido subcutâneo e *D. immitis*, no coração (ventrículo direito), artéria pulmonar, pulmões e veia cava, o que dá o nome popular deste parasita de “verme do coração”. Estas filárias possuem como hospedeiro intermediário mosquitos da Família Culicidae.

Manfredi *et al.* (2007) descrevem a forma adulta de *D. repens* como ovovivípara e menor que *D. immitis*, apresentando cutícula com distintas estriações longitudinais. A região posterior do macho é espiralada ventralmente, apresentando bolsa copuladora com papilas pedunculadas arredondadas. Espículos diferentes quanto à forma e fortemente quitinizados. A vulva das fêmeas apresenta um fino lábio projetado para fora do corpo.

Estes mesmos autores descrevem a forma adulta de *D. immitis* como um verme ovovivíparo, longo, filiforme de coloração esbranquiçada. Abertura oral terminal, sem lábios, rodeada por pequenas papilas medianas e dois anfídeos laterais. O esôfago diferenciado em muscular e glandular, mas

sem uma nítida delimitação entre estas regiões. As fêmeas com extremidade posterior arredondada, com ânus subterminal e abertura vulvar localizada logo após a junção esôfago-intestino. A região posterior do macho espiralada ventralmente, apresentando duas asas inconspícuas formando a bolsa copuladora, que apresenta papilas pré-, ad-, a pós-cloacais. Os espículos são desiguais quanto à forma, alargados na região proximal e afilados na região distal. O espículo direito é maior que o esquerdo, não apresentando gubernáculo. A cutícula é delgada, apresentando estriações proeminentes apenas na região ventral da cauda espiralada do macho.

1.3 CICLO DE VIDA

Algumas espécies de filarídeos de canídeos, apesar de habitarem órgãos e tecidos diferentes no hospedeiro definitivo, apresentam um ponto em comum em seus ciclos de vida: o fato das fêmeas liberarem suas larvas (microfilárias) na circulação sanguínea do hospedeiro.

Podemos usar como exemplo o ciclo de vida de *D. immitis*, se desenvolvendo no mosquito *Aedes aegypti* L., 1762, como hospedeiro intermediário: após a cópula dos vermes adultos, as fêmeas liberam larvas de primeiro estágio (L1), denominadas microfilárias, na corrente sanguínea do hospedeiro. Estas larvas são capturadas pelas fêmeas de mosquitos durante o repasto sanguíneo. Nas primeiras 24 horas, estas larvas permanecem no intestino médio do mosquito. Durante as próximas 24 horas, as larvas migram ativamente para os túbulos de Malpighi, invadem os tecidos desse órgão, onde

permanecem por seis ou sete dias. Entre o 9° e 15° dia de infecção, as larvas podem ser observadas no lúmen dos túbulos de Malpighi, migram pelo corpo do mosquito até a região da cabeça onde repousam nos espaços próximos à probóscide. Num próximo repasto sanguíneo, passam para o tecido do hospedeiro vertebrado de forma ativa, no local da picada, finalizando o ciclo no mosquito num período total de 17 dias, aproximadamente. Nesta fase, as larvas encontram-se no terceiro estágio de desenvolvimento (L3) (Taylor, 1960).

Ao penetrarem no hospedeiro vertebrado, as larvas permanecem no terceiro estágio por um período de cinco a 10 dias no tecido subcutâneo. Após este período, estas larvas evoluem para o quarto estágio e podem ser observadas ainda no tecido subcutâneo até o 68° dia após a infecção. Durante esta fase de desenvolvimento tissular, alterações nos tecidos do hospedeiro definitivo não são observadas. A partir deste período, adultos jovens podem ser observados no ventrículo direito e artéria pulmonar, até um ano após a infecção (Orihel, 1960). Um resumo comparativo dos ciclos de vida de *D. immitis* e *D. repens* pode ser observado no Quadro 1 e um esquema representativo do ciclo de vida de *D. immitis* também pode ser observado na Figura 1.

Localizações ectópicas em cães já foram descritas para estes parasitos, e formas adultas de *D. immitis* já foram observadas em bronquíolos, tecido subcutâneo, câmara anterior do olho e sistema nervoso central (Hamir, 1987).

Quadro 1: Resumo do ciclo de vida de *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* em mosquito e cão.

Estágio	Hospedeiro	Localização	
		<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dirofilaria repens</i>
Microfilária	Cão	Sangue	Tecido subcutâneo e sangue
Microfilária	Mosquito	Trato digestivo	Trato digestivo
Encistado	Mosquito	Células dos Túbulos de Malpighi	Células dos Túbulos de Malpighi
L2	Mosquito	Luz dos túbulos de Malpighi	Luz dos túbulos de Malpighi
L3	Mosquito	Probóscide	Probóscide
L3	Cão	Tecido subcutâneo e muscular	Tecido conjuntivo subcutâneo
L4	Cão	Tecido subcutâneo e muscular	Não determinado
Adultos jovens	Cão	Cavidade abdominal e torácica	Não determinado
Adultos	Cão	Cavidade dos órgãos torácicos	Tecido subcutâneo

Adaptado de Manfredi et al. (2007).

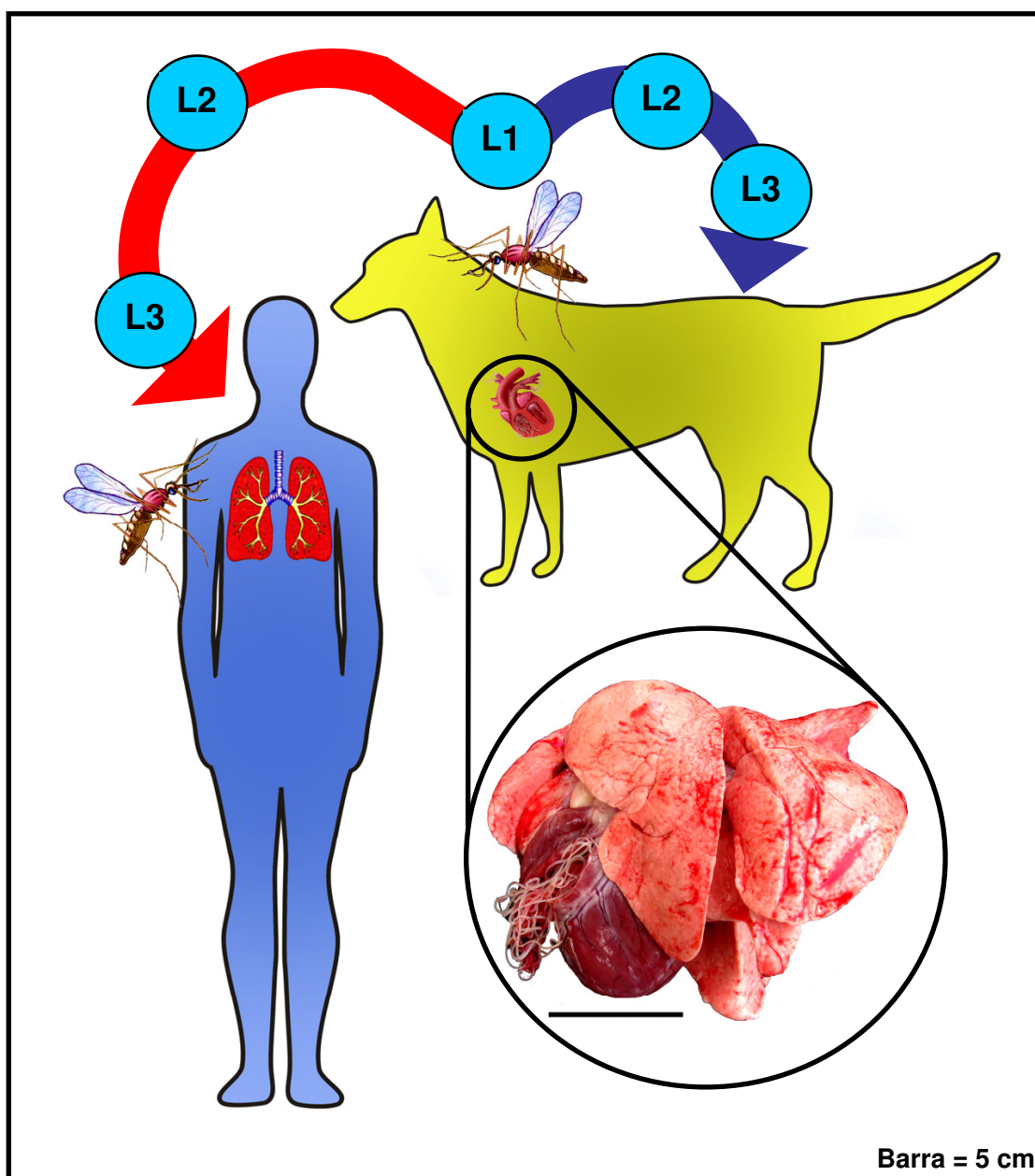


Figura 1: Ciclo de vida de *D. immitis*. Após a cópula dos vermes adultos localizados no coração do cão, as fêmeas liberam microfilárias (L1) na circulação sanguínea do hospedeiro. Fêmeas de mosquitos ingerem as microfilárias durante o hematofagismo. Estas larvas se desenvolvem até L3 no corpo do mosquito e são transmitidas para outro cão, durante os próximos repastos sanguíneos. O ciclo zoonótico ocorre quando fêmeas de mosquito infectadas com L3 de *D. immitis* realizam repasto sanguíneo em humanos. Após a penetração das larvas, estas são levadas pela circulação sanguínea até os pulmões, principalmente, onde morrem.

Além de cães domésticos, *D. immitis* já foi descrita parasitando outros animais, como canídeos selvagens (Wixson *et al.*, 1991; Sillero-Zubiri *et al.*, 2004), raposas (Gortázar *et al.*, 1998; Magi *et al.*, 2008), felídeos (Furlanello *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 2003) e pingüim (Sano *et al.*, 2005).

1.3.1 Ciclo Zoonótico

Eventualmente, filarídeos do gênero *Dirofilaria* têm sido descritos parasitando vários tecidos humanos produzindo tipicamente infecções crípticas de difícil diagnóstico. Embora tenha sido considerada uma infecção acidental, hoje esta doença está na lista de doenças zoonóticas emergentes, e tem sido descrita em vários países (Ciferri, 1982; Orihel & Eberhart, 1998; Stayerman *et al.*, 1999; Koltas *et al.*, 2002; Zialdi *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Kramer *et al.*, 2007), incluindo o Brasil (Rodrigues-Silva *et al.*, 2004), provocando infecções de diferentes níveis de gravidade, dependendo da localização do parasita.

No homem (por ser um hospedeiro inadequado) raramente estes nematóides chegam à fase adulta e não se observa a presença de microfilárias no sangue periférico (Simón *et al.*, 2007). As larvas infectantes que penetram durante a picada de mosquitos morrem na circulação sanguínea e são conduzidas pela artéria pulmonar até os pulmões, na maioria dos casos. Neste local, as larvas induzem a embolização pela formação de nódulos não calcificados, em “forma de moeda” por imagem radiológica (Figura 1 e 2). Normalmente, este quadro não produz ameaça à saúde do homem.

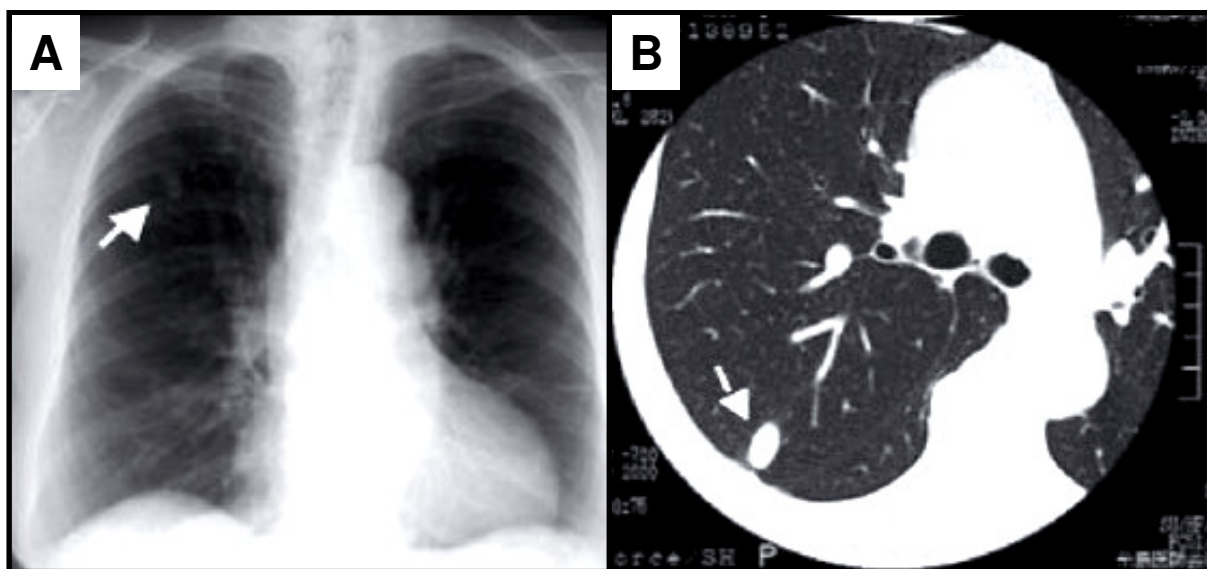


Figura 2: Diagnóstico por imagem da infecção por *D. immitis* em humano. A) lesão em forma de “moeda” no pulmão direito observada por raios-X torácico. B) lesão nodular de 20 mm X 10 mm, oval, não calcificado, bem-delimitada no lóbulo superior direito do pulmão por tomografia computadorizada. Fonte: Miyoshi et al. (2006).

Contudo, devido à semelhança radiológica entre este nódulo citado e um tumor primário ou metastático, são necessários recursos invasivos como tricotomia ou biópsia pulmonar para se chegar a um diagnóstico, que muitas vezes não é conclusivo (Flieder & Moran, 1999; Muro *et al.*, 1999; Hirano *et al.*, 2002; Rodrigues-Silva *et al.*, 2004; Simón *et al.*, 2005; Myioshi *et al.*, 2006).

1.4 DIROFILARIOSE CANINA

As espécies do gênero *Dirofilaria* apresentam capacidade de provocar diversas infecções (dirofilarioses), sendo a mais conhecida a doença do “verme-do-coração” que é comum em cães e gatos em áreas em que *D. immitis* é descrita. Outras espécies de *Dirofilaria*, como *D. repens* provocam infecções consideradas menos graves aos hospedeiros, mas sua distinção com *D. immitis* é fundamental para o diagnóstico (Grandi *et al.*, 2007).

D. immitis provoca, em cães, uma infecção crônica que apresenta diversos sinais clínicos, como cansaço, apatia, indisposição para atividades físicas e tosse. A lesão primária ocorre quando este filarídeo atinge a idade adulta no interior das artérias pulmonares, pulmões e nas cavidades do lado direito do coração. O “enovelamento” de vários vermes, que neste estágio de desenvolvimento podem chegar a 30 cm de comprimento, provoca a obstrução da circulação sanguínea nestes órgãos, dificultando a passagem do sangue, sobrecarregando o coração, além de provocar embolia e extravasamento de sangue no tecido pulmonar, pela obstrução de vasos de pequeno calibre pelas microfílaras (Furlanello *et al.*, 1998).

Esta doença pode ser assintomática quando a infecção ocorre com poucos vermes, mas pode levar o animal à morte quando um grande “novelo” de vermes adultos é formado (Grandi, *et al.*, 2007).

Devido à localização das formas adultas, as infecções por *D. repens* ocorrem na pele, levando ao aparecimento de nódulos subcutâneos, onde o parasita adulto está inserido. Normalmente, os animais infectados não apresentam sintomas graves, e em locais não endêmicos, os casos identificados são por achados cirúrgicos (Grandi *et al.*, 2007).

1.5 IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO DEFINITIVO

Infecções por nematóides induzem uma resposta imune do tipo Th2 no hospedeiro, caracterizada pelos elevados níveis do anticorpo imunoglobulina-E (IgE) e interleucina-4 (IL-4), com uma diminuição dos níveis de interferon- γ (INF- γ), e a contribuição deste quadro imunológico para a longevidade do parasita no hospedeiro.

Diversas moléculas foram isoladas dos produtos de secreção-excreção de filarídeos, como as poliproteínas de 15 kDa e 30 kDa de *D. immitis* que parecem estar relacionadas com a modulação do sistema imune do hospedeiro. A longa duração da infecção por filarídeos parece estar relacionada com a imunossupressão mediada pelos produtos de secreção-excreção, semelhante ao que ocorre na filariose linfática humana (Tezuka *et al.*, 2003; Morchón *et al.*, 2007).

De fato, Orihel (1960) descreve que não foi observada nenhuma reação inflamatória no tecido muscular de cães infectados por larvas L3 e L4

de *D. immitis*, assim como nos tecidos cardíaco e pulmonar, a não ser quando estes helmintos foram encontrados mortos.

1.6 DISTRIBUIÇÃO DA DIROFILARIOSE

Os trabalhos que envolvem estudos epidemiológicos com filárias do gênero *Dirofilaria* mostram cães infectados nas Américas, na Europa, na África e na Ásia, principalmente em países localizados entre os trópicos, onde a presença de vetores é mais intensa (Genchi *et al.*, 2007a).

A primeira descrição de filarídeo parasitando um cão no Brasil foi feita por Lent & Teixeira-de-Freitas (1937), que identificaram esta espécie como *D. repens*.

D. immitis foi descrita parasitando cães em vários Estados, com as seguintes prevalências: São Paulo (14,2 %) (Duque-Araújo *et al.*, 1995), Rio de Janeiro (13,68 %) (Labarthe *et al.*, 1998), Maranhão (46,0 %) (Ahid *et al.*, 1999), Minas Gerais (9,4 %) (Ferreira *et al.*, 1999), Mato Grosso (5,8 %) (Fernandes *et al.*, 2000), Santa Catarina (15,0 %) (Araújo *et al.*, 2003).

No Estado de Alagoas, Brito, *et al.* (2001) descreveram cães co-infectados por microfilárias *D. immitis* (1,3 %) e *A. reconditum* (1,3 %). No litoral do Paraná, Reifur *et al.* (2004) verificaram co-infecção em cães por microfilárias de *D. immitis* (3,9 %), *A. reconditum* (22,6 %) e um tipo de microfilária não identificada (4,7 %). Em ambos os trabalhos, a distinção das espécies foi feita por análise das características morfológicas das microfilárias observadas na circulação sanguínea dos cães.

Até o presente momento, apenas dois trabalhos retratam dados epidemiológicos da infecção de cães por filarídeos no Norte do Brasil: Souza *et al.* (1997), pesquisando microfilárias circulantes em 540 cães de Belém, detectaram uma prevalência de 10,74% e Garcez *et al.* (2006), pesquisando 34 cães das vilas União e Pingo D'água (Salvaterra – Ilha do Marajó – Pará), descreveram uma prevalência de 53,4%, usando um método de diagnóstico imunoenzimático. Nestes dois trabalhos a infecção foi associada à *D. immitis*, sem a realização de um diagnóstico diferencial.

1.7 DIAGNÓSTICO DA DIROFILARIOSE

Os sinais clínicos manifestados em cães parasitados por filarídeos são diversos, e dependem da espécie parasita em questão. Os cães infectados por *D. immitis* apresentam sintomas que não são exclusivos desta infecção. Pouco se conhece a respeito da infecção por *D. repens* em cães, e os sinais clínicos relatados se referem à formação de nódulos subcutâneos, ou a localização ectópica deste parasita. Deste modo, o diagnóstico laboratorial se mostra essencial para a detecção destas infecções (Grandi *et al.*, 2007).

1.7.1 Pesquisa e Quantificação de Microfilárias

Diversos trabalhos citam que as microfilárias podem ser diferenciadas por várias técnicas, como: a) exame a fresco de amostra sanguínea para a observação da movimentação das microfilárias entre as células sanguíneas; b) concentração de microfilárias por filtração ou

centrifugação do sangue em formalina (método de Knott); c) reações histoquímicas (Genchi *et al.*, 2007b).

Existem tabelas que auxiliam a distinção de microfilárias, como a descrita por Foreyt (2005), que leva em consideração diversas características para se diferenciar as microfilárias de *D. immitis* e *A. reconditum*, como o número de microfilárias observadas nas amostras sanguíneas, motilidade, estruturas cefálicas, tamanho do corpo e a forma da cauda.

Apesar de ser uma opção de baixo custo (Genchi *et al.*, 2007b), Bowman (1990) afirma que é necessário paciência e muita prática para a diferenciação de microfilárias por características morfológicas, além do longo tempo para a realização de todos os métodos que revelem estas características.

Como a coloração de rotina de distensões sanguíneas com o corante Giemsa e o Panótico® (Figura 3A) não evidenciam características que possam auxiliar na diferenciação das microfilárias, técnicas de coloração que se baseiam na reação histoquímica da fosfatase ácida foram desenvolvidas com este propósito. As microfilárias podem ser distinguidas por esta técnica pela posição dos pontos de reação da fosfatase ácida (Figura 3B): *D. immitis* mostra dois pontos de atividade (poro excretor e anal), *D. repens* mostra um ponto de atividade (poro anal) e *Acantocheilonema* sp. apresenta atividade em quase todo corpo (Chalifoux e Hunt, 1971).

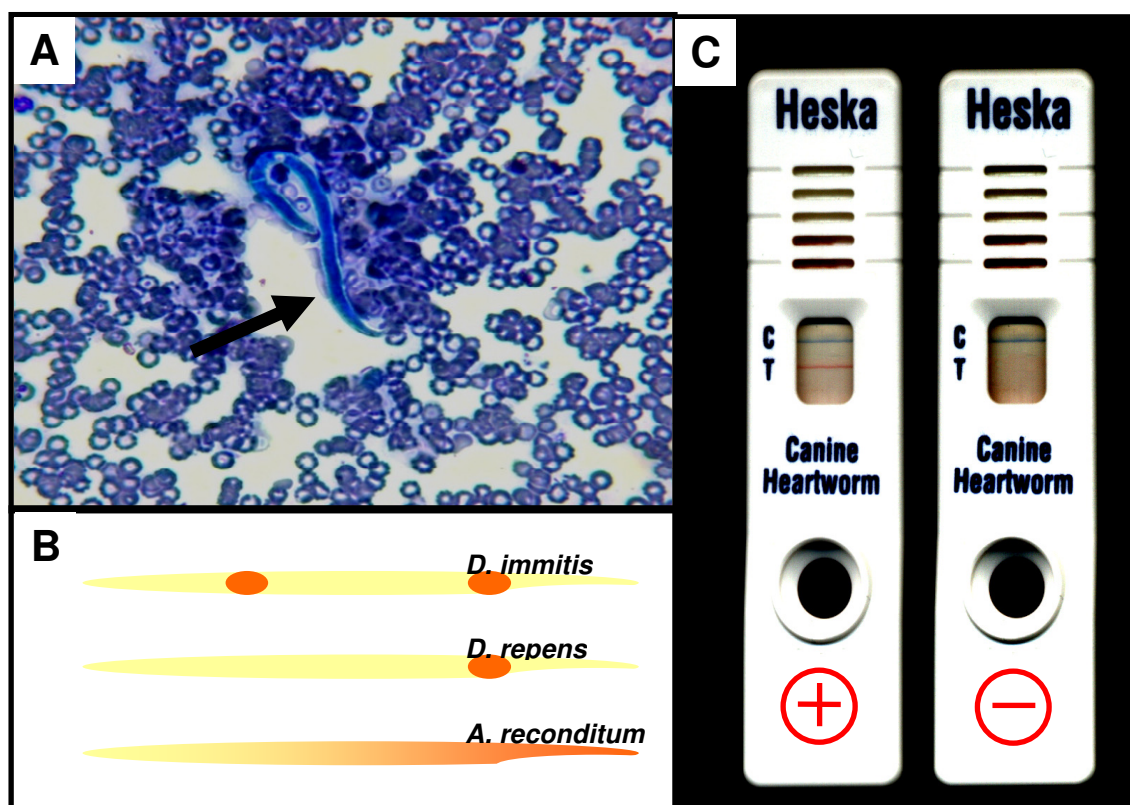


Figura 3: Métodos de diagnóstico de filarídeos em cães. A) Observação de microfilária (seta) em distensão sanguínea corada com Giemsa (400X). B) Desenho representativo da diferença de coloração após pesquisa da atividade da fosfatase ácida em microfilária de espécies diferentes. C) Kit comercial de verificação da infecção (Solo Step® CH Heartworm Tests), que se baseia na pesquisa de antígenos de fêmeas de filarídeos grávidas. Resultado negativo (em cima) e positivo (embaixo). Fotos: LBC – ICB – UFPA.

Vários autores destacam que este método se mostra oneroso e requer um longo tempo de preparação dos reagentes, os quais facilmente perdem a validade, além de necessitar de um profissional suficientemente treinado para este tipo de diagnóstico (Rishniw *et al.*, 2006; Nuchprayon *et al.*, 2006, Genchi, *et al.*, 2007b), ainda que Peribañez *et al.* (2001) tenha obtido resultados semelhantes usando um “kit” comercial para detecção de fosfatase ácida em leucócitos.

O Quadro 2 mostra uma comparação entre microfilárias de diversas espécies filarídeos caninos do ponto de vista morfológico e pelo método da fosfatase ácida.

1.7.2 Pesquisa de Antígenos e Anticorpos Circulantes

Testes que envolvem a reação antígeno-anticorpo, como o ELISA e os “kits” obtidos comercialmente, também são utilizados rotineiramente para a pesquisa de infecção por filarídeos em cães (Figura 3C). Alguns fabricantes afirmam que estes testes são capazes de diferenciar espécies de microfilárias. Entretanto, a possibilidade de reação imune cruzada com antígenos de outros helmintos deixa em dúvida a qualidade dos resultados obtidos por estes métodos, tanto para fins epidemiológicos, como para diagnóstico específico (Fernandes *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2002). Por este motivo, Genchi *et al.* (2007b) alerta que o uso destes testes não é aconselhado em locais em que não se conhece as espécies de filarídeos presentes nestas áreas.

Quadro 2: Comparação entre microfilárias de diversas espécies filarídeos de cães. Diferenças observadas entre os parâmetros morfométricos, resultado da pesquisa de atividade da fosfatase ácida e características morfológicas.

Espécies	Comprimento / Largura (µm)	Fosfatase ácida	Características
<i>Dirofilaria immitis</i>	290-300 / 5-7	Poro anal e excretor	Sem bainha; extremidade cefálica pontiaguda; cauda pontiaguda e reta
<i>Dirofilaria repens</i>	300-360 / 6-8	Poro anal	Sem bainha; extremidade cefálica obtusa; cauda afilada e encurvada em gancho
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	260-283 / 4	Quase todo o corpo	Sem bainha; extremidade cefálica obtusa com um gancho cefálico; cauda encurvada em gancho
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	190-247 / 4-6,5	Quase todo o corpo	Com bainha, extremidade cefálica obtusa, cauda afilada e reta.

Adaptado de Manfredi et al. (2007).

1.7.3 Biologia Molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a *nested* PCR e a *semi-nested* PCR, seguida ou não do uso de enzimas de restrição têm sido usadas para identificação de espécies de filarídeos. Isto foi observado nos trabalhos de Nuchprayoon *et al.* (2005) e Nuchprayoon *et al.* (2006) que usaram RFLP-PCR na região ITS1 do DNAr e Casiragui *et al.* (2006) que estudaram a região 12S do DNAr usando enzimas de restrição, conseguindo diferenciar as espécies *D. immitis*, *D. repens* e *A. reconditum*.

Apesar de vários pesquisadores considerarem um método oneroso, que necessita de um laboratório equipado com recursos de alta tecnologia e pessoal especialmente treinado, a caracterização molecular de filarídeos tem se mostrado uma ferramenta de extrema importância para os estudos em parasitologia, pois além de auxiliar na identificação de parasitas, pode ainda auxiliar no entendimento de questões ainda não elucidadas, como o mecanismo de ação e resistência de alguns fármacos utilizados no tratamento de filarioses (Gasser *et al.*, 1996; Prichard, 1997; Genchi *et al.*, 2007b), além de enriquecer os bancos de dados, como o Genbank, com informações que podem ser usadas em estudos sobre filogenia molecular, como os que já foram desenvolvidos em filarídeos por Xie *et al.* (1994a), Xie *et al.* (1994b), Chansiri *et al.* (1999), Casiraghi *et al.* (2001), Pradeep-Kumar *et al.* (2002), Casiraghi *et al.* (2004), Krueger *et al.* (2007), Fong *et al.* (2008).

1.7.4 Pesquisa de vermes adultos

A coleta de helmintos, através de cirurgias e necropsias, e o estudo morfométrico de suas estruturas ainda é uma ferramenta importante para a identificação destes parasitos, incluindo os filarídeos.

Furlanello *et al.* (1998) consideram que os métodos de diagnóstico por imagem, como raios-X e ultrassonografia, podem auxiliar na localização dos vermes adultos nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, e na identificação de casos de infecção oculta, isto é, quando a infecção por filarídeos não é detectada por nenhum dos métodos de rotina, como a pesquisa de microfilárias, pesquisa de antígenos e anticorpos ou PCR.

Kelly (1973) ressaltou a ocorrência de infecção oculta por filarídeos, sugerindo vários fatores, como a destruição das microfilárias através de mecanismos imunomediados no período pré-patente da doença, presença de vermes imaturos, tratamento com drogas apenas microfilaricidas, morte das formas adultas e a presença apenas de parasitas do mesmo sexo.

Além disso, um quadro de reação imune aguda, conhecida por Eosinofilia Pulmonar Tropical, pode provocar a diminuição de microfilárias circulantes. Este quadro se caracteriza por uma intensa eosinofilia ($> 3000/\mu\text{l}$), maior que a observada normalmente nas infecções helmínticas, além de um aumento no número de linfócitos B (50X), que leva a um aumento exagerado nos níveis de IgE e IgG, específico para microfilárias. Nestes pacientes, a quantidade de microfilárias circulantes é significativamente diminuída, chegando a não ser detectada. De fato, indivíduos com Eosinofilia Pulmonar Tropical apresentam um número maior de microfilárias em processo de

degeneração no parênquima pulmonar, o que leva à intensa reação inflamatória no local, além dos danos provocados pela degranulação dos eosinófilos. Esta síndrome é mais conhecida em humanos em áreas endêmicas para filariose humanas (Ottesen & Nutman, 1992; Marshall *et al.*, 1998).

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

Pesquisar a ocorrência da filariose canina na Ilha do Marajó – PA, além de identificar os filarídeos responsáveis por esta infecção.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Realizar levantamento epidemiológico da prevalência de filariose canina a partir de amostras sanguíneas obtidas de cães domiciliados, nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, ambos localizados na Ilha do Marajó - PA.

- Pesquisar a ocorrência de vermes adultos nos cães domiciliados nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, localizados na Ilha do Marajó – PA, diagnosticando esta(s) espécie(s) através de características morfológicas e moleculares.

- Realizar estudo filogenético comparando as seqüências gênicas dos filarídeos adultos com as seqüências gênicas das microfilárias circulantes em cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, localizados na Ilha do Marajó – PA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE COLETA

As coletas foram realizadas nos municípios de Salvaterra (00°45'12"S e 48°31'00"W Gr) e regiões adjacentes (Vila União, Pingo D'Água, Vila Ceará, Jubim, Joanes, São Vicente e Caldeirão) e São Sebastião da Boa Vista (01°43'05"S e 49°31'45"W Gr), ambos localizados na Ilha de Marajó – Pará – Brasil (Figura 4).

Todas as atividades de coleta foram acompanhadas e tiveram o apoio das equipes de controle de endemias dos órgãos de Saúde Pública Estadual e Municipal, representados pela Secretaria de Saúde do Estado do Pará – 7ª Regional de Proteção Social do Marajó (SESPA) e Secretarias Municipais de Saúde de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista. As coletas de amostras deste trabalho ocorreram durante as atividades de coleta de rotina de amostras sanguíneas para pesquisa e controle de cães infectados pelo *Vírus da raiva* e por *Leishmania* sp., durante as campanhas de vacinação contra a raiva e o recolhimento e eliminação de cães calazar-positivos (Figura 5). Alguns cães calazar – positivos, eliminados nestas atividades, foram cedidos para nossa equipe para necropsias e pesquisa de filarídeos adultos.



Figura 4: Mapa de localização geográfica dos municípios estudados na Ilha do Marajó. Os municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista (asteriscos) e sua disposição em relação à capital do Estado do Pará, Belém. *Insert:* área estudada destacada. Fonte: <http://maps.google.com.br/>



Figura 5: Atividades de coleta no município de Salvaterra, Ilha do Marajó – PA. A) Atividades de coleta desenvolvidas neste trabalho acompanhadas pelas equipes dos Órgãos de Saúde Pública; B) Entrevista com os donos dos cães para obtenção de dados; C) Coleta de sangue por punção da artéria radial de cão, para pesquisa de microfilárias circulantes.

2.2 PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS

Os valores percentuais referentes à infecção por filária canina foram obtidos a partir de coletas de amostras sanguíneas para o diagnóstico de microfilaremia e pesquisa de filarídeos adultos em cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista (Ilha do Marajó - PA).

O teste de X^2 ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para análise de significância estatística das diferenças encontradas na distribuição entre características como sexo e idade dos cães infectados.

A idade dos cães foi informada pelos donos dos mesmos, durante as atividades de entrevista.

2.2.1 Amostras Sanguíneas e Pesquisa da Infecção

Foram obtidas 188 amostras de sangue (158 do município de Salvaterra e 30 de São Sebastião da Boa Vista) a partir da punção venosa da veia radial de cães domésticos.

Todas estas amostras foram submetidas à pesquisa de microfilárias circulantes pela análise de duplicatas de distensões sanguíneas, coradas pelo método Panótico Rápido® (Laborclin Produtos para Laboratórios LTDA, Pinhais, Paraná/Brasil) e pelo método de Knott modificado (9 mL de formalina 2% adicionado de 1 mL de sangue, seguido de centrifugação a 1500 rpm por 5 min, sendo o precipitado submetido à coloração com solução aquosa de azul de metileno 1% e posterior análise ao microscópio). Foram considerados positivos os cães que apresentarem pelo menos uma microfilária em pelo menos um dos métodos.

2.2.2 Filarídeos Adultos

Como mencionado anteriormente, nos municípios estudados, rotineiramente, cães domésticos calazar-positivos são eutanasiados pelas equipes dos órgãos de Saúde Pública. Para o desenvolvimento deste trabalho, 30 cães (20 em Salvaterra e 10 em São Sebastião da Boa Vista) foram cedidos para necropsia e pesquisa de vermes adultos na cavidade cardíaca, artéria pulmonar, pulmões e veias cava. Foram considerados positivos os cães que apresentaram pelo menos um filarídeo no interior de uma destas estruturas. Amostras sanguíneas destes cães também foram submetidas à pesquisa de microfilárias e incluídas no total de amostras coletadas.

Todos os vermes coletados foram lavados em tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline* - PBS), pH 7.4 e processados de acordo com cada técnica a que foram submetidos: os destinados à microscopia de luz, análise histológica e MEV foram fixados imediatamente após a coleta em AFA (ácido acético glacial a 2%, formaldeído a 3% e 95% de etanol 70° GL) aquecido a 60°C; os destinados à extração de DNA foram mantidos a 4°C até as etapas seguintes do processamento.

2.3 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

O estudo morfológico foi feito através da análise de características taxonômicas de vermes adultos colhidos em Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, submetidos à microscopia de luz, cortes histológicos e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

2.3.1 Microscopia de Luz

Após a fixação, vermes adultos machos e fêmeas foram desidratados em uma série etanólica crescente (30% – 100% / 15 min cada), clarificados em lactofenol de Aman por 72 h e observados em microscópio de luz Olympus BX41, acoplado a câmara clara, para obtenção de fotomicrografias e desenhos taxonômicos. As medidas obtidas neste trabalho são apresentadas em milímetros, com exceção do comprimento total (centímetros).

2.3.2 Análise Histológica

Foram colhidos fragmentos de um centímetro da região mediana de vermes adultos machos e fêmeas fixados em AFA aquecido a 60°C. Estes fragmentos foram submetidos à lavagem em PBS (3x, 5 min.) e submetidos à desidratação em série etanólica crescente (em concentrações entre 30% – 100% / 15 min cada) para infiltração e inclusão em Histoiresina[®]. Cortes transversais de seis micrômetros, feitos em micrótomo Leica EM UC6, foram corados com azul de toluidina 1%, observados e fotografados em microscópio de luz Olympus BX41, acoplado a câmera fotográfica digital Sony Cyber Shot 6.0 MP.

2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Cerca de um centímetro e meio das extremidades anterior e posterior de vermes adultos machos e fêmeas foram pós-fixados em tetróxido

de ósmio, desidratados em série etanólica crescente (em concentrações entre 30% - 100% / 2 h cada) até a secagem ao ponto crítico, metalizados com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 1450 VP.

2.4 ESTUDO MOLECULAR

O estudo molecular foi realizado a partir da comparação entre regiões gênicas de microfilárias circulantes (presentes nas amostras de sangue coletadas) e vermes adultos. Estas amostras foram submetidas à extração de DNA, PCR e seqüenciamento de DNA, seguido de estudo filogenético.

Como controle positivo, foi utilizado um filarídeo adulto fêmea, identificado morfológicamente como *D. immitis* pela equipe do Laboratório de Biologia de Helmintos “Otto Wulcherer”, Instituto de Biofísica “Carlos Chagas Filho”, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Este exemplar foi submetido por nossa equipe aos métodos de estudo molecular aplicados nas amostras da Ilha do Marajó, Estado do Pará.

2.4.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA das microfilárias, todas as amostras sanguíneas consideradas positivas (ou seja, que apresentaram pelo menos uma microfilária detectável pelos métodos descritos anteriormente) foram submetidas ao método de fenol-clorofórmio, segundo Sambrook e Russell (2001). Amostras consideradas negativas (ou seja, que não apresentaram microfilárias detectáveis pelos métodos descritos anteriormente) também foram

submetidas à extração de DNA pelo mesmo método, sendo utilizadas como controle negativo.

A extração de DNA dos vermes adultos seguiu o protocolo e reagentes indicados no *ChargeSwieth gDNA Mini Tissue Kit* (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), que consiste na lise dos tecidos dos helmintos, seguido do acréscimo de *Beads Magnéticas*® 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*® 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*®, que se desligam do DNA.

2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizados os *primers* específicos para filarídeos DIDR-F1 (AGTGCGAATTGCAGACGCATTGAG) e DIDR-F2 (AGCGGGTAATCACGACT GAGTTGA) descritos por Rishniw *et al.*, (2006) que amplificam a região 5.8S – ITS2 – 28S do rDNA. A reação foi feita com 2 µL de DNA extraído, 1,5 mM de MgCl₂, 250 µM de dNTP (*Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA*), tampão 1X (20 mM Tris – HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1 U de *Platinum Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA*) e 10 µM de cada *primer*, em um volume final da reação de 20 µL.

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. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita após eletroforese em gel de agarose 2,5%, impregnado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta, utilizando DNA *Leadder* de 100 pb.

2.4.3 Seqüenciamento dos Fragmentos Amplificados

Os fragmentos amplificados foram submetidos ao seqüenciamento direto de acordo com o protocolo da *ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready kit* (PerkinElmer Cetus, Noortwalk, CA, USA), usando o *primer* DIDR-F1 e o produto da reação foi levado ao seqüenciador de DNA *ABI Prism™ 310, Genetic Analyzer*.

2.4.4 Estudo Filogenético

Para o estabelecimento de relações filogenéticas, as seqüências obtidas a partir das amostras da Ilha do Marajó e Rio de Janeiro foram alinhadas entre si e com seqüências de filarídeos previamente depositadas no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) por outros autores.

O alinhamento das seqüências foi realizado usando o software Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A árvore filogenética foi construída usando o software Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) e método da Máxima Parcimônia, com 1000 réplicas de *bootstrap*. A amostra *Setaria digitata* (von Linstow, 1906) (Nematoda, Filarioidea: Setariidae) (EF196091) foi utilizada como grupo externo.

3 RESULTADOS

A análise morfológica não evidenciou nenhuma diferença entre os filarídeos adultos coletados em cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista. Resultado semelhante foi observado pelo ponto de vista molecular, tanto para os filarídeos adultos quanto para as microfilárias. Por este motivo, optamos por agrupar os dados coletados em ambos os municípios para a computação dos dados estatístico-epidemiológicos e morfométricos.

3.1 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

A prevalência da filariose canina no município de Salvaterra foi de 37,34%, enquanto que no município de São Sebastião da Boa Vista foi de 6,67% (Tabela 1). Quando levamos em consideração a somatória das amostras coletadas em ambos os municípios, observamos uma prevalência total de 32,45% (Tabela 2).

Foram coletadas mais amostras em cães machos do que de fêmeas, e o número de cães machos microfilarêmicos foi maior do que o de fêmeas. Entretanto, não foi observada diferença na distribuição da infecção em relação ao sexo dos cães (χ^2 correção de Yates = 0,341; $p = 0,559$) (Figura 6).

O número de cães jovens (0 a 1 ano) foi maior do que os cães mais velhos. Entretanto, observamos que o número de cães positivos com idade a partir de quatro anos foi significativamente maior ($\chi^2 = 32,943$; $p < 0,0001$) (Tabela 2, Figura 7).

Tabela 1: Microfilaremia estimada em 158 cães de Salvaterra e 30 de São Sebastião da Boa Vista, distribuídos por idade e sexo.

Idade	Salvaterra			São Sebastião da Boa Vista		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	♀:♂	♀:♂	♀:♂	♀:♂	♀:♂	♀:♂
0 a 1	6 (3,80%) [5:1]	53 (33,54%) [18:35]	59 (37,34%) [23:36]	0 (0%) [0:0]	11 (36,67%) [5:6]	11 (36,67%) [5:6]
2 a 3	22 (13,92%) [9:13]	19 (12,03%) [9:10]	41 (25,95%) [18:23]	0 (0%) [0:0]	5 (16,67%) [2:3]	5 (16,67%) [2:3]
4 ou +	23 (14,56%) [5:18]	18 (11,39%) [7:11]	41 (25,95%) [12:29]	1 (3,33%) [0:1]	2 (6,67%) [0:2]	3 (10%) [0:3]
n.i.*	8 (5,06%) [2:6]	9 (5,70%) [4:5]	17 (10,76%) [6:11]	1 (3,33%) [1:0]	10 (33,33%) [8:2]	11 (36,67%) [9:2]
Total	59 (37,34%) [21:38]	99 (62,66%) [38:61]	158 (100%) [59:99]	2 (6,67%) [1:1]	28 (93,33%) [15:13]	30 (100%) [16:14]

* não informado pelos donos dos cães

Tabela 2: Microfilaremia estimada em 188 cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, distribuídos por idade e sexo.

Idade	Salvaterra + São Sebastião da Boa Vista		
	Positivo	Negativo	Total
	n (%) [♀:♂]	n (%) [♀:♂]	n (%) [♀:♂]
0 a 1	6 (3,19%) [5:1]	64 (34,04%) [23:41]	70 (37,23) [28:42]
2 a 3	22 (11,70%) [9:13]	24 (12,77%) [11:13]	46 (24,44%) [20:26]
4 ou +	24 (12,77%) [5:19]	20 (10,64%) [7:13]	44 (23,40%) [12:32]
n.i.*	9 (4,79%) [3:6]	19 (10,11%) [12:7]	28 (14,89%) [15:13]
Total	61 (32,45%) [22:39]	127 (67,55%) [53:74]	188 (100%) [75:113]

* não informado pelos donos dos cães

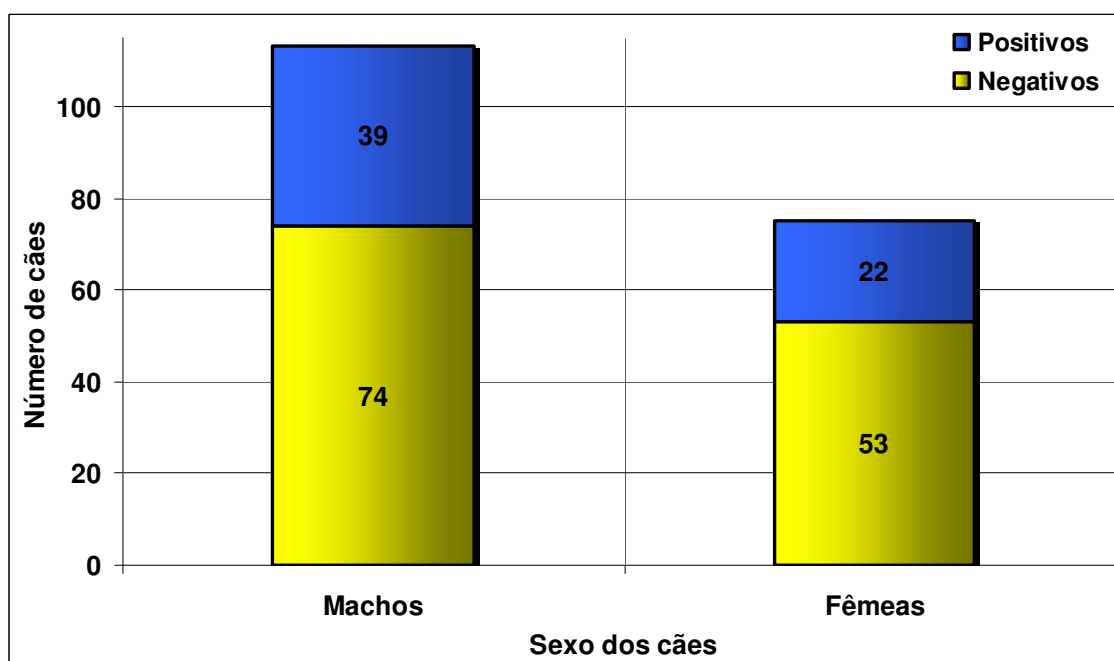


Figura 6: Índice de microfilaremia em 188 cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, distribuídos por sexo. O número de amostras coletadas de cães machos foi maior do que o de fêmeas. Não se observou relação entre infecção e sexo dos cães (X^2 correção de Yates = 0,341; $p = 0,559$).

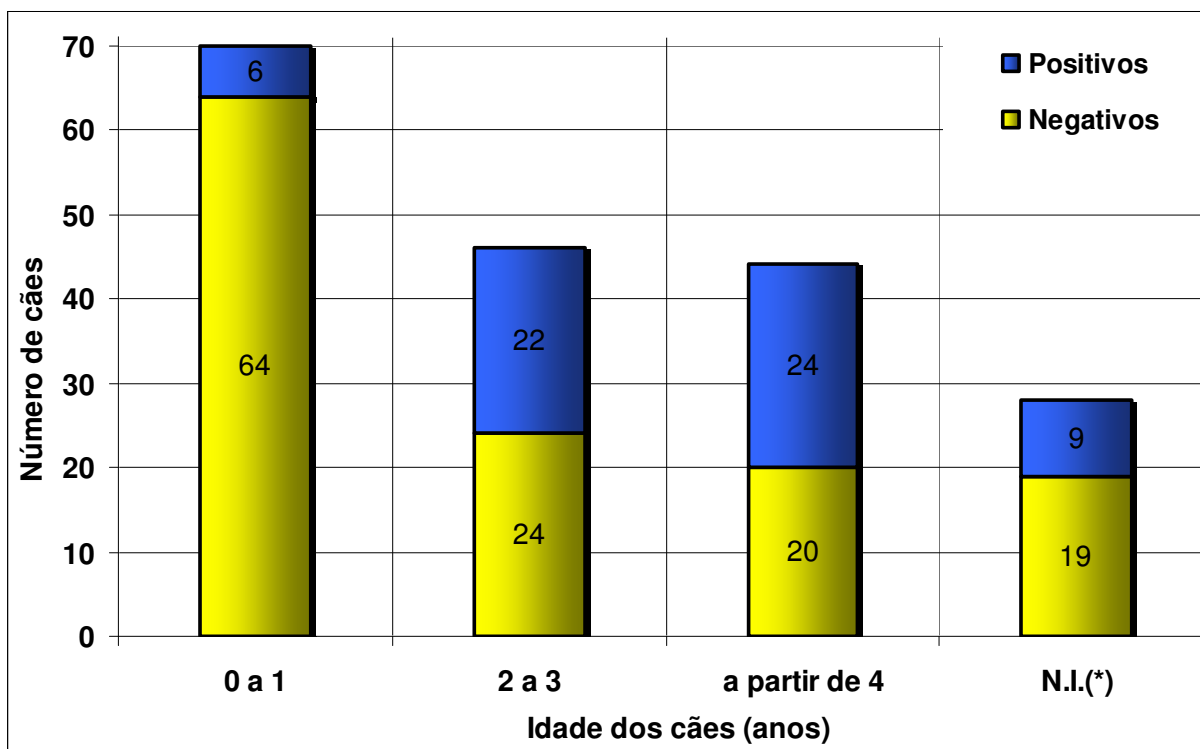


Figura 7: Índice de microfilaremia em 188 cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, distribuídos por idade. Um maior número de amostras foi coletado em cães jovens (0 – 1 anos). O número de cães positivos com idade de quatro anos ou mais foi significativamente maior ($X^2 = 32,943$; $p < 0,0001$).

Dos 30 cães necropsiados (20 em Salvaterra e 10 em São Sebastião da Boa Vista), 13 (43,33%) apresentaram filarídeos adultos no coração, artéria pulmonar a pulmões (Figura 8), e nestes cães parasitados, foi observada infecção oculta em sete (53,84%), ou seja, não apresentaram microfílarias circulantes detectáveis por nenhum dos métodos utilizados neste trabalho, mesmo apresentando vermes adultos no interior dos órgãos torácicos.

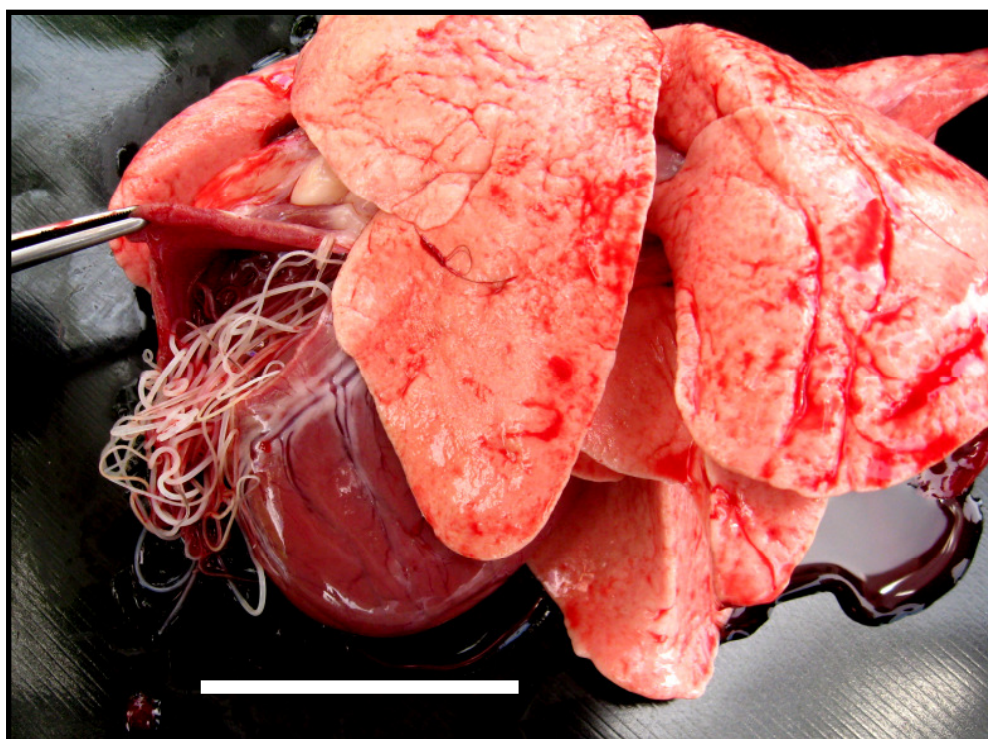


Figura 8: Coração e pulmão de um cão necropsiado em São Sebastião da Boa Vista – Ilha do Marajó, Estado do Pará. Observamos um novelo de filarídeos adultos emergindo de uma incisão no ventrículo direito. Barra = 5 cm.

3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

No momento da necropsia, todos os vermes coletados apresentavam movimento de contração e relaxamento, indicando que estavam vivos. Os vermes coletados apresentaram corpo filiforme, com coloração esbranquiçada, fêmeas nitidamente maiores em comprimento do que os machos, que possuíam a porção posterior espiralada.

3.2.1 Microscopia de Luz

Após processamento, a observação por microscopia de luz mostrou que os vermes adultos machos e fêmeas apresentaram a região anterior arredondada, extremidade cefálica ligeiramente afilada (Figuras 9A, 9B, 10A e 10B), com estruturas semelhantes, como: pequena abertura oral, terminal, sem lábios (Figura 10B), rodeada por quatro pares de pequenas papilas sésseis e dois pequenos anfídeos laterais (Figura 10B). Foi observado o anel nervoso (Figuras 9A, 9B e 10A) em torno do esôfago (Figuras 9A, 9B, 10A e 10B) relativamente curto e tipicamente filarióide, ou seja, sem apresentar uma dilatação na junção com o intestino (Figura 10A). Não se observou uma nítida divisão entre a região glandular e muscular do esôfago. Contudo, foi observado um par de pequenos deirídeos localizadas lateralmente (Figura 10A), posterior à posição do anel nervoso.

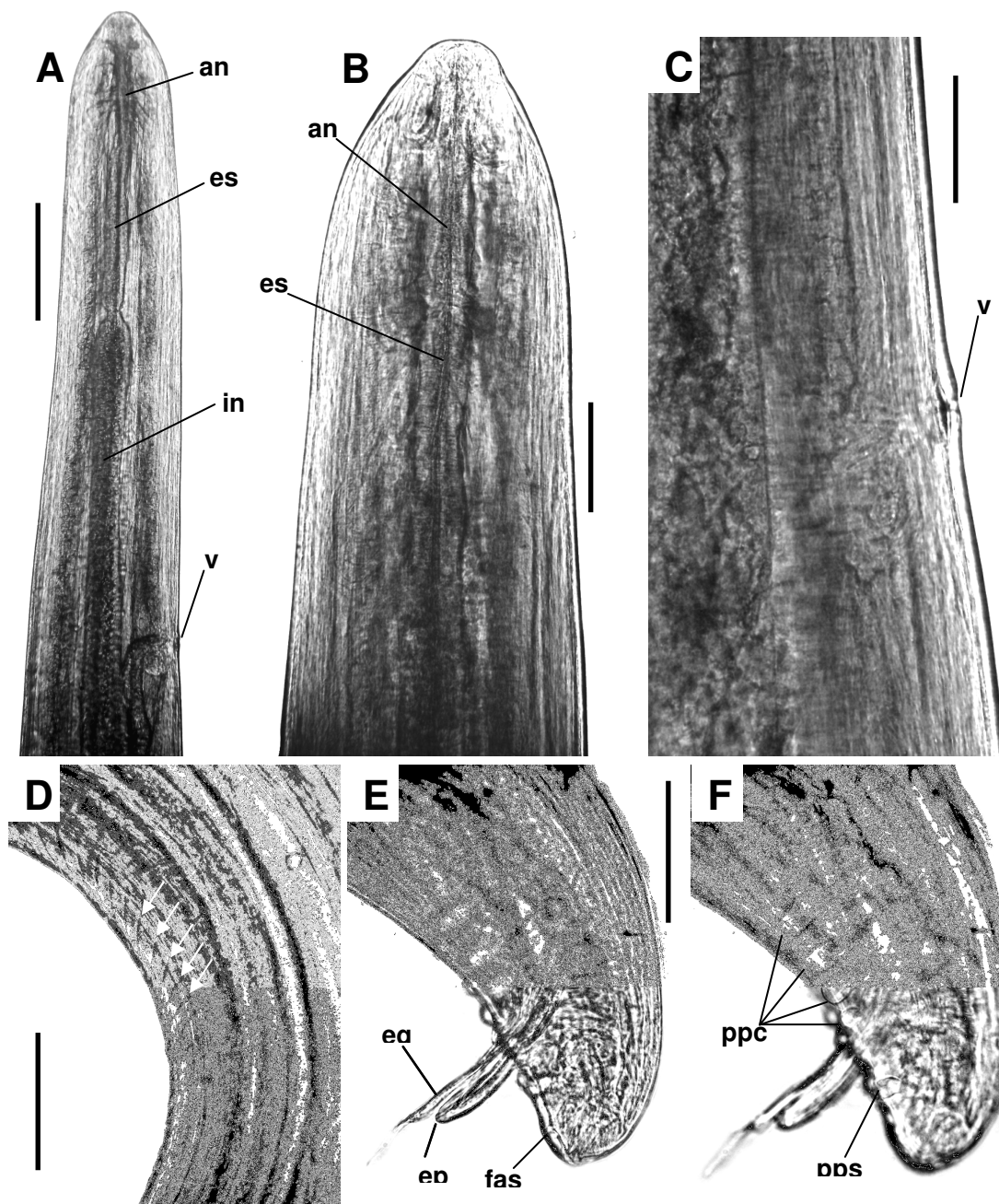


Figura 9: Aspectos microanatômicos por microscopia de luz de filarídeos adultos fêmeas e machos obtidos de cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista - Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Visão lateral de filarídeo fêmea, destacando-se a região anterior arredondada, com extremidade cefálica ligeiramente afilada, onde se observa o anel nervoso (an), esôfago (es), intestino (in) e a vulva (v) (Barra = 200 μ m). B) Detalhe da extremidade anterior de filarídeo fêmea, destacando-se o anel nervoso (an) e o esôfago (es) (Barra = 100 μ m). C) Detalhe da vulva (v) de filarídeo fêmea em visão lateral (Barra = 100 μ m). D) Detalhe da última espira da região posterior espiralada do macho destacando a área rugosa constituída por estrias (setas) (Barra = 200 μ m). E) e F) Visão lateral da extremidade caudal de filarídeo macho em duas secções ópticas diferentes, onde se observa as papilas pré-cloacais (ppc), as papilas pós-cloacais (pps), o espículo grande (eg), o espículo pequeno (ep) e o fasmídeo (fas) (Barra = 100 μ m).

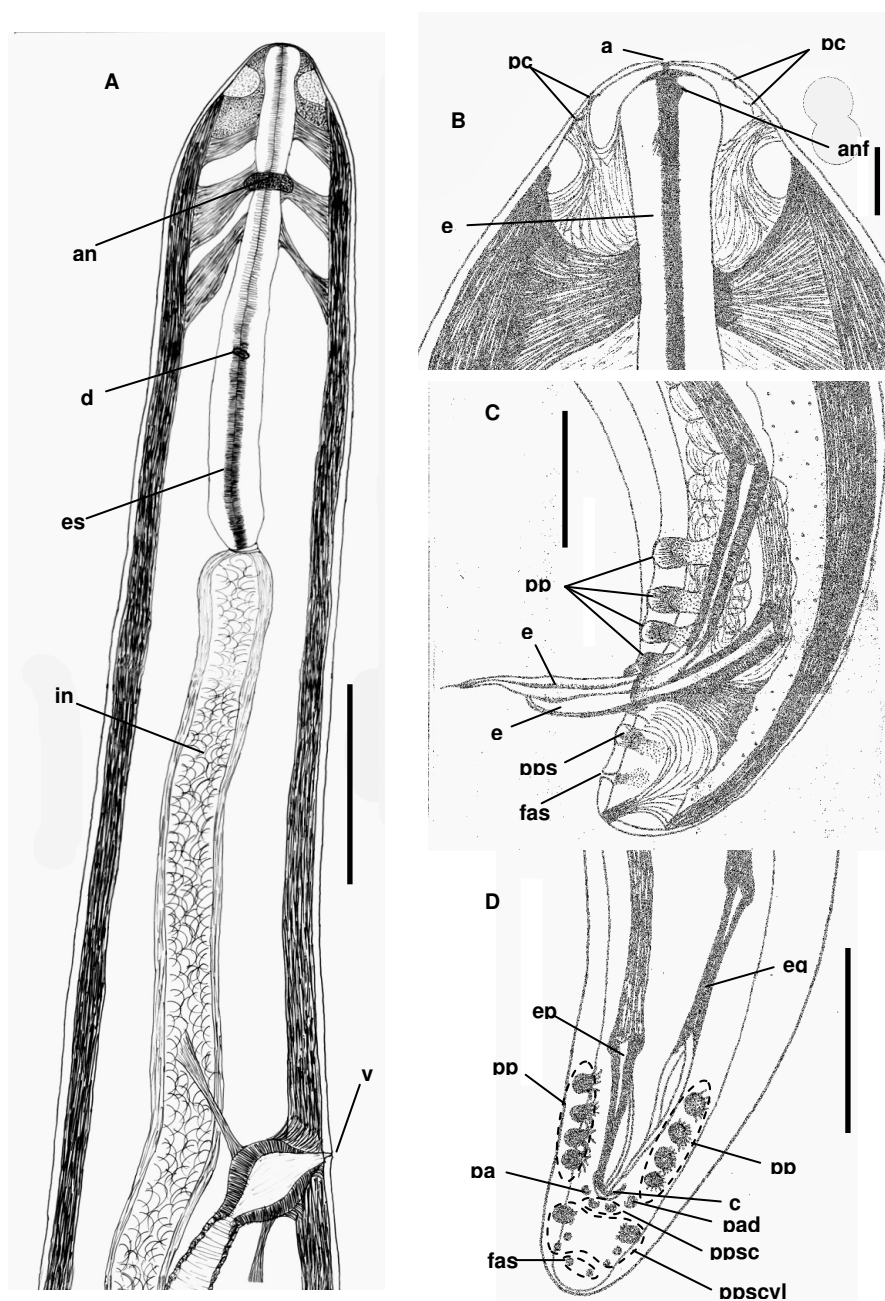


Figura 10: Aspectos microanatômicos capturados por câmara clara de filarídeos adultos fêmeas e machos obtidos de cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista - Ilha do Marajó, Estado do Pará.

A) Visão lateral de filarídeo fêmea, destacando-se a região anterior arredondada, com extremidade cefálica ligeiramente afilada, onde se observa o anel nervoso (an), deirídeo (de), esôfago (es), intestino (in) e a vulva (v) (Barra = 200 μ m). B) Detalhe da extremidade anterior de fêmea, onde se observa a abertura oral (ao), papilas cefálicas (pc), anfídeo (anf), esôfago (es) (Barra = 50 μ m). C) Vistão lateral da extremidade posterior de macho de filarídeo, onde se observa as papilas pré-cloacais (ppc), papilas pós-cloacais (ppsc), espículo maior (eg), espículo menor (ep) e fasmídeo (fas) (Barra = 100 μ m). D) Vista ventral da extremidade posterior de macho de filarídeo, onde se observa as papilas pré-cloacais (ppc), abertura cloacal (c), papilas ad-cloacais (pad), papilas pós-cloacais ventrais (ppscv), papilas pós-cloacais ventro-laterais (ppscvl) e o par de fasmídeos ventrais (fas) (Barra = 100 μ m).

As fêmeas eram didelfas e ovovivíparas, e todas apresentaram microfilárias no interior do útero, indicando que estavam na fase adulta. O útero se apresentou tubular, com várias voltas pela extensão do corpo (da junção esôfago-intestino até a região posterior), comunicando-se com o meio externo pela abertura da vulva, ventral, localizada logo após a junção esôfago-intestino (Figuras 9A, 9C e 10A). O intestino caracterizou-se por um tubo retilíneo que se estendia pelo corpo até a extremidade posterior (abertura anal). A extremidade posterior da fêmea apresentou-se retilínea e arredondada, com a abertura do ânus ventral e subterminal.

Os machos apresentavam intestino e testículo tubulares e retilíneos que se distendiam ao longo do corpo até a abertura cloacal. Foi observada uma área rugosa ventral na região posterior espiralada, constituída por estrias oblíquas e paralelas (Figura 9D). A última espira apresentou estruturas relacionadas à cópula, como papilas, espículos e fasmídeos.

As papilas cloacais apresentavam tamanhos diferentes e estavam assim distribuídas: quatro pares de grandes papilas pedunculadas pré-cloacais (eventualmente, uma ou mais papilas não foram observadas nesta região); um par de pequenas papilas sésseis ad-cloacais; um par de pequenas papilas sésseis pós-cloacais ventrais, logo após a abertura cloacal; três pares de papilas pós-cloacais ventro-laterais, sendo o primeiro par constituído de grandes papilas pedunculadas e dois pares de papilas sésseis (Figuras 9E, 9F, 10C e 10D).

Observamos que os espículos apresentaram tamanhos e forma diferentes, com ausência do gubernáculo. O espículo menor localizava-se no

lado interno na espiral, apresentando uma concavidade longitudinal formado por uma bainha onde se encaixava o espículo maior, quando externalizados (Figuras 9E, 10C e 10D). Foi observado um par de fasmídeos ventrais, posterior às papilas pós-cloacais (Figuras 9E, 10C e 10D).

3.2.1.1 Morfometria dos Vermes Adultos

Os dados morfométricos foram colhidos de dezesseis vermes fêmeas (oito do município de Salvaterra e oito do município de São Sebastião da Boa Vista) e sete vermes machos (cinco do município de Salvaterra e dois do município de São Sebastião da Boa Vista) e estão apresentados da seguinte forma: menor – maior (média $\pm$ desvio padrão).

Fêmeas: comprimento total: 17,7 cm – 27,2 cm (21,83 cm $\pm$ 2,52); largura do corpo: 0,40 mm – 0,61 mm (0,49 mm $\pm$ 0,06); comprimento do esôfago: 1,05 mm – 1,57 mm (1,29 mm $\pm$ 0,14); largura do esôfago: 0,09 mm – 0,17 mm (0,12 mm $\pm$ 0,02); posição do anel nervoso, em relação à extremidade anterior: 0,33 mm – 0,52 mm (0,41 mm $\pm$ 0,08); deirídeos, em relação à extremidade anterior: 0,56 mm – 0,97 mm (0,70 mm $\pm$ 0,09); posição da vulva, em relação à extremidade anterior: 2,23 mm – 3,26 mm (2,68 mm $\pm$ 0,25); comprimento da cauda (da abertura anal à extremidade posterior): 0,15 mm – 0,27 mm (0,17 mm $\pm$ 0,04).

Machos: comprimento total: 11,94 cm – 16,23 cm (13,76 cm $\pm$ 1,73); largura do corpo: 0,34 mm – 0,5 mm (0,41 mm $\pm$ 0,06); comprimento do esôfago: 1,08 mm – 1,46 mm (1,21 mm $\pm$ 0,14); largura do esôfago: 0,09 mm – 0,13 mm (0,11 mm $\pm$ 0,02); posição do anel nervoso, em relação à extremidade

anterior: 0,35 mm – 0,47 mm (0,40 mm $\pm$ 0,05); deirídeos, em relação à extremidade anterior: 0,29 mm – 0,77 mm (0,57 mm $\pm$ 0,2); comprimento da cauda (da abertura cloacal à extremidade posterior): 0,09 mm – 0,11 mm (0,10 mm $\pm$ 0,01); comprimento do espículo maior: 0,31 mm – 0,39 mm (0,34 mm $\pm$ 0,03); comprimento do espículo menor: 0,15 mm – 0,19 mm (0,17 mm $\pm$ 0,01).

A Tabela 3 apresenta a morfometria dos vermes adultos coletados neste trabalho, comparando com os dados previamente apresentados por Leidy, 1856 (apud Lent e Teixeira-de-Freitas, 1937), López-Neyra (1947), Murata *et al.* (2003) e Sano *et al.* (2005).

3.2.2 Análise Histológica

Secções transversais de vermes adultos mostraram uma cutícula altamente basofílica, sem protuberâncias que indicassem a presença de estriações cuticulares longitudinais (Figuras 11A e 11B). A histologia também evidencia grandes fibras musculares e o cordão lateral apresentando o canal excretor foram observados em ambos os sexos, assim como o intestino (Figuras 11A e 11B). As fêmeas apresentaram várias alças do útero contendo microfilárias no seu interior (Figura 11A), e os machos apresentaram o testículo, formado por um parênquima compacto e basofílico (Figura 11B).

Tabela 3: Dados morfométricos dos vermes adultos coletados nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista.
Valores coletados neste trabalho (*) comparados com medidas de *D. immitis* previamente descritas por outros autores.

Parâmetros Taxonômicos	Furtado <i>et al.</i> (2008) (*)		Leidy, 1856 <i>apud</i> Lent e Teixeira-de-Freitas, 1937		López-Neyra, 1947		Murata <i>et al.</i> , 2003	Sano <i>et al.</i> , 2005
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
Comp. Total (cm)	17,7 – 27,2 (21,83 ± 2,52)	11,94 – 16,23 (13,76 ± 1,73)	15,0 - 30,0	12,0 - 18,0	21,0 - 31	12,0 - 20,0	19,0 - 28,0	10,5
Larg. do Corpo (mm)	0,40 – 0,61 (0,49 ± 0,06)	0,34 – 0,5 (0,41 ± 0,06)	1,0 - 1,3	0,6 - 0,9	1,0 - 1,3	0,6 - 0,69	0,77 - 0,99	0,58
Comp. do Esôfago (mm)	1,05 – 1,57 (1,29 ± 0,14)	1,08 – 1,46 (1,21 ± 0,14)			1,25 - 1,5		1,75 – 1,78	1,28
Larg. do Esôfago (mm)	0,09 – 0,17 (0,12 ± 0,02)	0,09 – 0,13 (0,11 ± 0,02)						
Anel Nervoso (mm)	0,33 – 0,52 (0,41 ± 0,08)	0,35 – 0,47 (0,40 ± 0,05)					0,33 - 0,54	0,36
Deirídeo (mm)	0,56 – 0,97 (0,70 ± 0,09)	0,29 – 0,77 (0,57 ± 0,2)						0,64
Vulva (mm)	2,23 – 3,26 (2,68 ± 0,25)		2,35 - 3,4		2,15 - 3,4		2,78 - 4,45	
Cauda (mm)	0,15 – 0,27 (0,17 ± 0,04)	0,09 – 0,11 (0,10 ± 0,01)			0,18 - 0,21	0,09 - 0,10	0,24	0,11
Espículo Grande (mm)		0,31 – 0,39 (0,34 ± 0,03)		0,3 - 0,35		0,3 - 0,33		0,37
Espículo Pequeno (mm)		0,15 – 0,19 (0,17 ± 0,01)		0,17 - 0,22		0,17 - 0,26		0,19

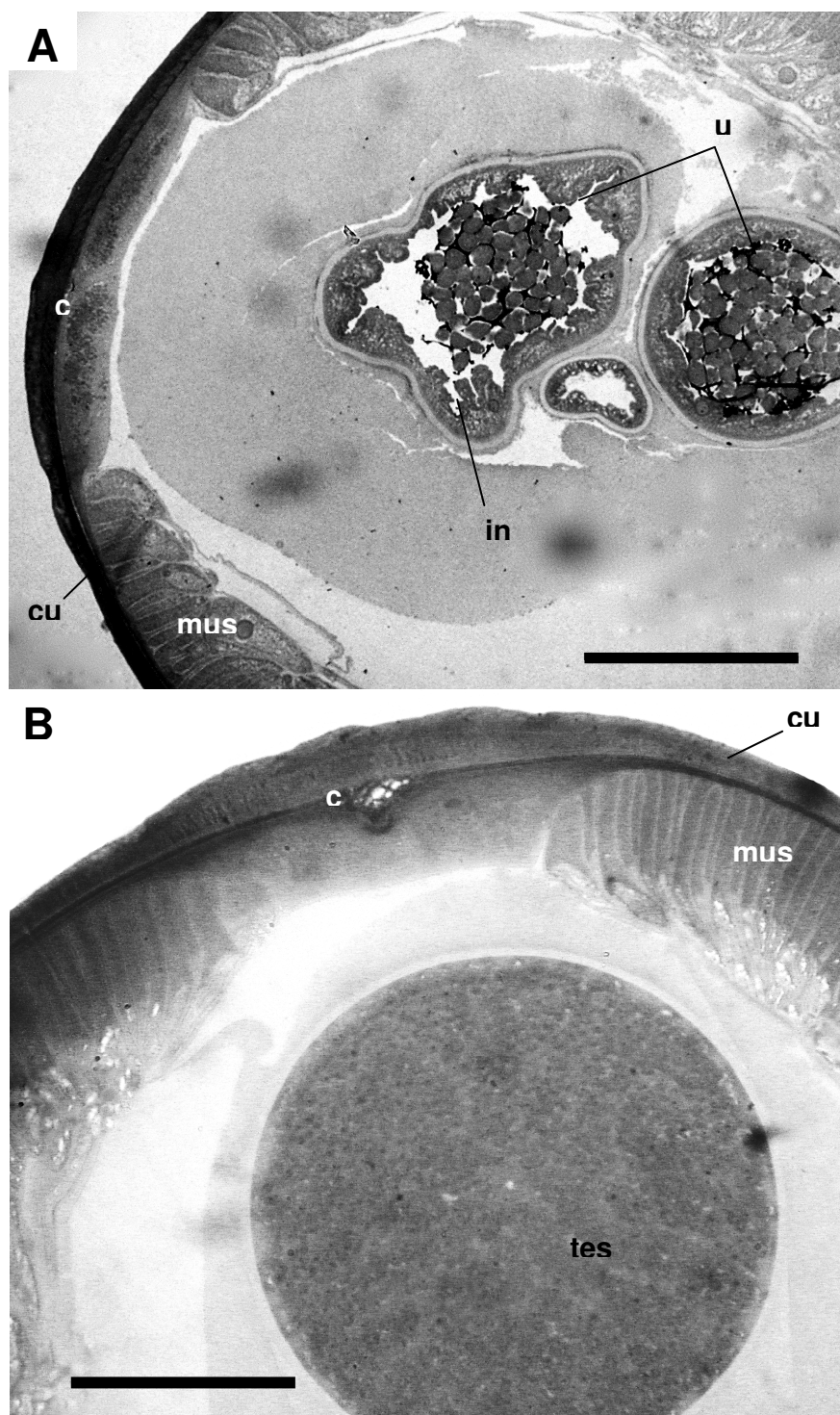


Figura 11: Cortes histológicos transversais na região mediana do corpo de filarídeos coletados na Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Filarídeos adulto fêmea, evidenciando a cutícula (cu), útero (u) com microfilárias, intestino (i), cordão lateral (cl) e o tecido muscular (mus) (Barra = 200 μ m). B) Filarídeo adulto macho, evidenciando a cutícula (cu), testículo (t), cordão lateral (cl) e o tecido muscular (mus) (Barra = 100 μ m).

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A extremidade cefálica dos vermes adultos apresentou-se constituída por estruturas semelhantes em ambos os sexos. Esta região apresentou-se discretamente afilada e arredondada (Figura 12A), com abertura oral terminal, circular, não estando delimitada por lábios (Figuras 12B, 12C e 12D). Destacaram-se ao redor da abertura oral, quatro pares de pequenas papilas cefálicas e dois anfídeos laterais, representados por uma elevação cuticular (Figuras 12B, 12D, 12E e 12F). Os anfídeos apresentaram uma abertura basal, voltada para a região posterior do corpo (Figuras 12G e 12H).

Pequenos deirídeos estavam localizados no centro de uma depressão cuticular (de forma variando entre circular e oval), próximos à linha lateral e ligeiramente deslocados para a região ventral (Figura 13A). Os deirídeos se mostraram constituídos por uma estrutura filamentosa, de base mais larga que o ápice, apresentando uma concavidade longitudinal em forma de “calha” (Figura 13B). O ápice desta estrutura se apresentava trifurcado, variando de formato, dependendo do nível de exteriorização (Figura 13C).

A superfície do corpo apresentou delicadas estrias transversais paralelas (Figura 14C). Na região cefálica (em torno das papilas, anfídeos e abertura oral) e na extremidade posterior das fêmeas (em torno dos fasmídeos) estas estrias não apresentaram uma disposição transversal, mas sim, dispostas aleatoriamente (Figuras 14 A e 14B). Foi observada uma alteração no padrão de distribuição das estriações cuticulares no entorno dos deirídeos, abertura vulvar e ânus da fêmea (Figuras 13A, 15B e 16B).

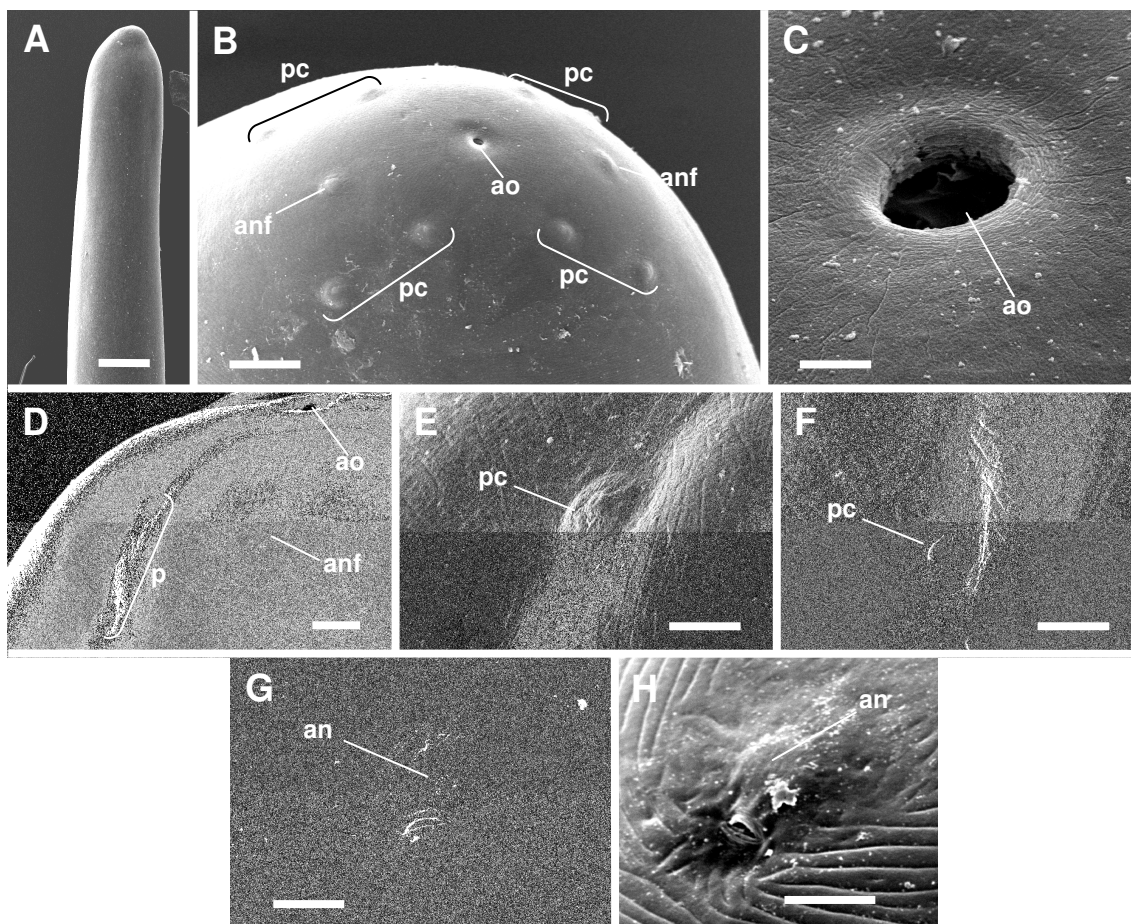


Figura 12: Aspectos da superfície do corpo, por MEV, dos filarídeos obtidos em cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista - Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Visão geral da extremidade cefálica discretamente afilada e arredondada de filarídeo macho (Barra = 200 μ m). B) Detalhe da extremidade cefálica de filarídeo macho, onde se observa a abertura oral terminal (ao), quatro pares de pequenas papilas cefálicas (pc) dispostas radialmente, dois anéis laterais (anf) (Barra = 20 μ m). C) Detalhe da abertura oral (ao) (Barra = 2 μ m). D) Detalhe da disposição das papilas cefálicas (pc) e anelli (anf) em relação à abertura oral (ao) (Barra = 10 μ m). E) Detalhe de uma papila cefálica (pc) proximal à abertura oral (Barra = 5 μ m). F) Detalhe de uma papila cefálica (pc) distal à abertura oral (Barra = 5 μ m). G) Detalhe de um anelli (anf) evidenciando a abertura basal fechada (Barra = 5 μ m). H) Detalhe de um anelli (anf) evidenciando a abertura basal aberta (Barra = 5 μ m).

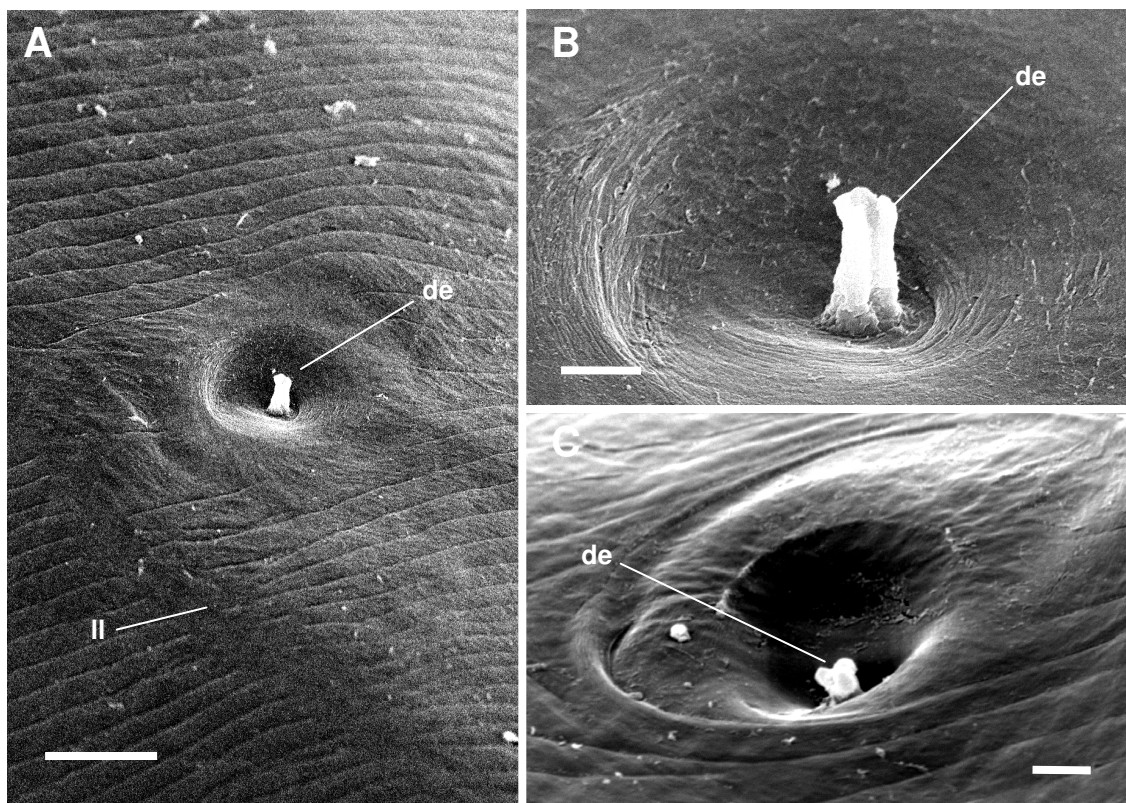


Figura 13: Aspectos do deirídeo, por MEV, localizado na superfície do corpo dos filarídeos obtidos em cães dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista - Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Disposição de um deirídeo (de) em relação à linha lateral (ll) (Barra = 10 µm). B) Detalhe de um deirídeo (de) totalmente evertido, evidenciando o formato semelhante a uma calha e o ápice trifurcado distendido, localizado no centro de uma depressão cuticular (Barra = 2 µm). C) Detalhe de um deirídeo (de) parcialmente evertido, com ápice trifurcado globoso, localizado no centro de uma depressão cuticular (Barra = 5 µm).

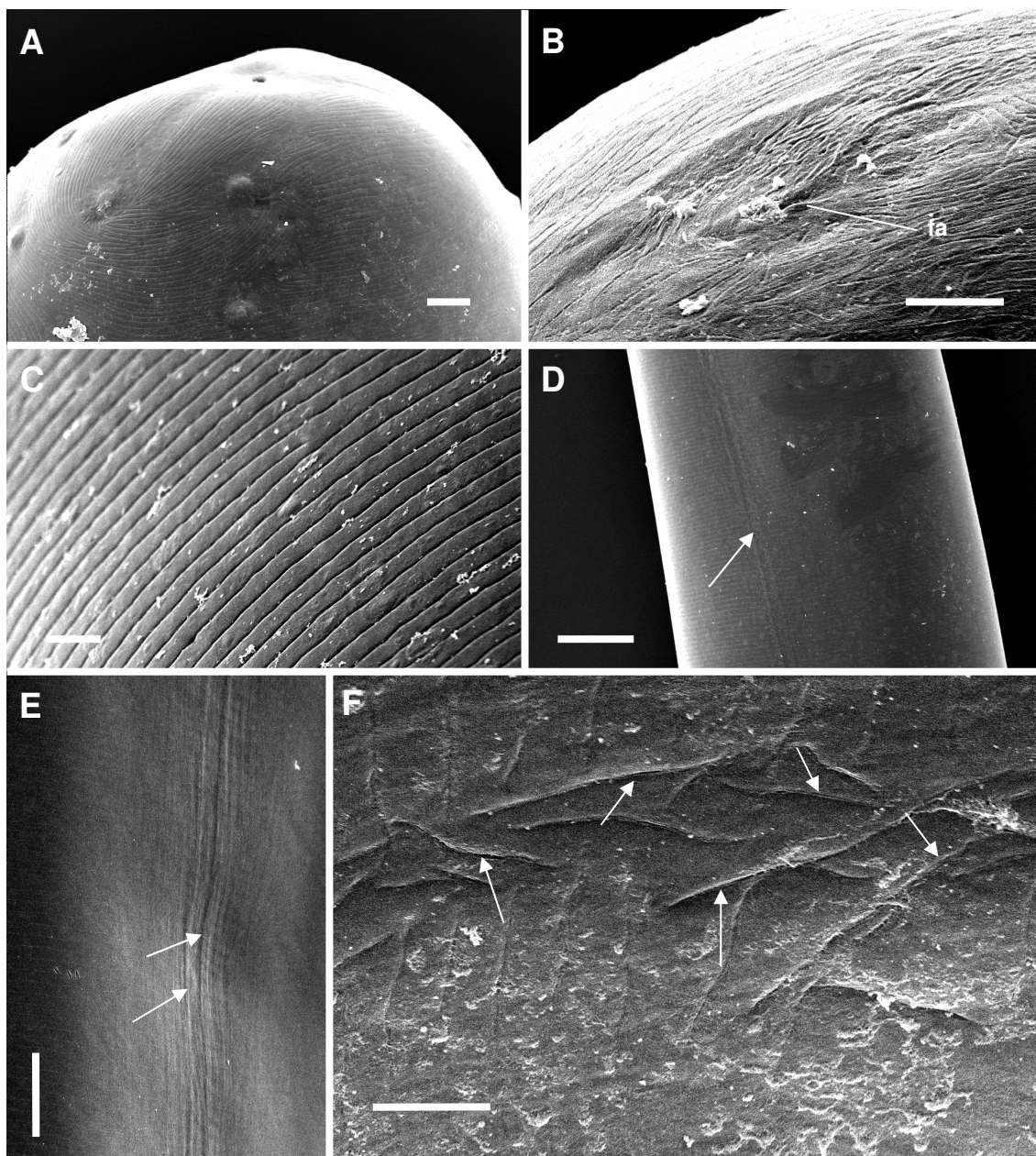


Figura 14: Variação das alterações cuticulares observadas em filarídeos coletados nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista – Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Disposição aleatória das estriações cuticulares na extremidade anterior, em torno da abertura oral, papilas cefálicas e deirídeos (Barra = 10 μ m). B) Disposição aleatória das estriações cuticulares na extremidade posterior de um filarídeo fêmea, em torno da abertura dos fasmídeos (fas) (Barra = 5 μ m). C) Detalhe das estriações cuticulares transversais (Barra = 5 μ m). D) Linha lateral inconspícua longitudinal (seta) (Barra = 100 μ m). E) Detalhe da linha lateral constituída por linhas paralelas contínuas (Barra = 50 μ m). F) Detalhe da linha lateral constituída por discretas linhas descontínuas, próximo à região posterior (Barra = 5 μ m).

Duas linhas laterais inconspícuas foram observadas longitudinalmente (Figura 14D), as quais se apresentaram formadas por discretas linhas descontínuas próximo à região anterior e posterior (Figuras 14F), e nas outras regiões do corpo, por duas ou três linhas paralelas e contínuas (Figura 14E).

As fêmeas apresentaram a vulva relativamente próxima à extremidade anterior (Figura 15A), com abertura vulvar elíptica, transversalmente disposta em relação ao eixo do corpo, delimitada por lábios não proeminentes, e sem estruturas como papilas ou franjas (Figuras 15B, 15C e 15D). A abertura anal era subterminal em relação à extremidade posterior, apresentando-se encurvada, formando uma “meia-lua” (Figuras 16A, 16B e 16C). Na extremidade posterior, foram observados dois fasmídeos latero-ventrais, constituídos por duas aberturas circulares (Figura 16D). A linha lateral também foi observada nesta região, formada por discretas linhas descontínuas (Figura 16E).

A região posterior espiralada dos machos (Figura 17A) apresentou ventralmente uma área rugosa, constituída por elevações cuticulares paralelas entre si, em forma de cristas de comprimento variado (Figuras 17B e 17C), podendo apresentar bifurcações (Figura 17D *insert*). Estas cristas apresentaram-se acompanhando o eixo longitudinal das espiras maiores (Figuras 17B e 17D), deslocando-se gradativamente para a posição transversal nas espiras menores (Figuras 17C e 17E). Na região onde se apresentaram longitudinalmente dispostas, o número de cristas variou de sete a onze, dependendo do segmento observado e da volta da espiral.

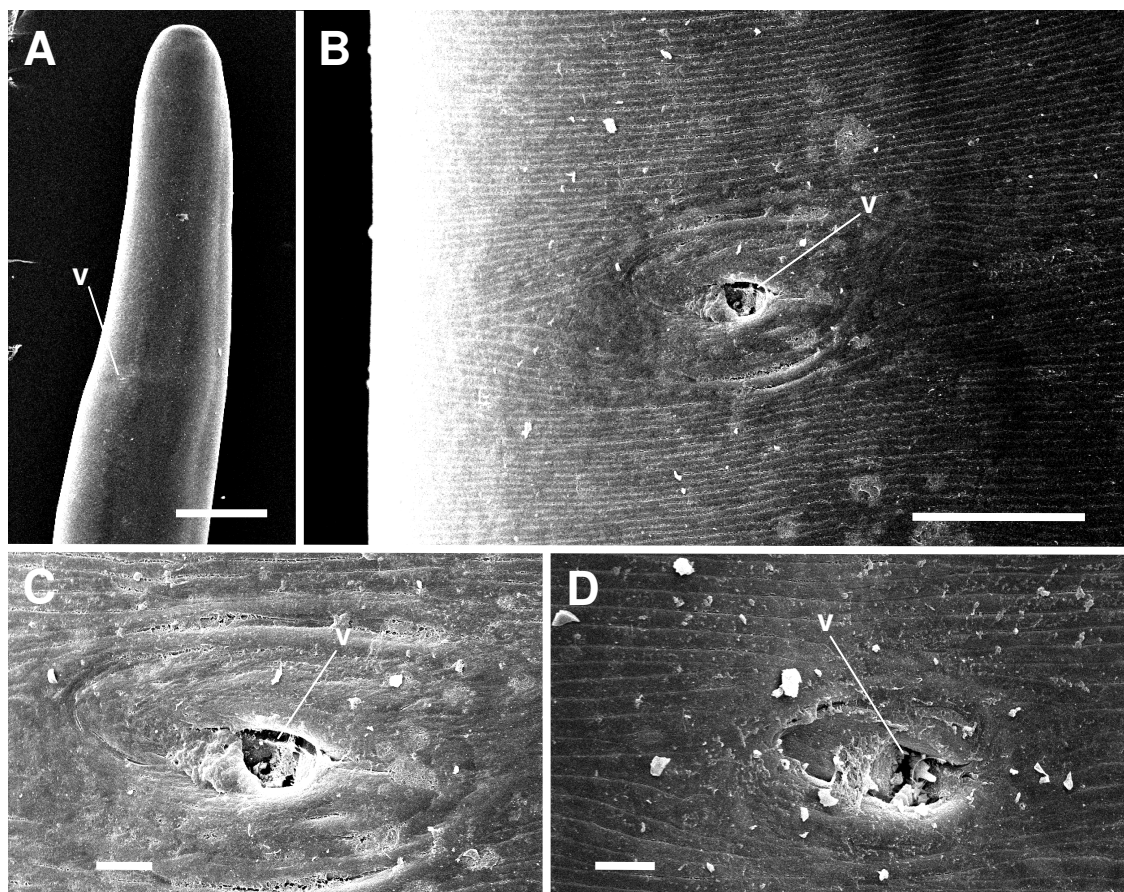


Figura 15: Detalhes da vulva de filarídeo fêmea coletada no município de São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Visão geral da extremidade anterior, evidenciando a posição a vulva (v) (Barra = 500 μ m). B) Detalhe da vulva (v), evidenciando a abertura vulvar elíptica, a posição transversal em relação ao corpo e a alteração no padrão de estriações cuticulares transversais em torno desta estrutura (Barra = 50 μ m). C) Detalhe da abertura vulvar (v) delimitada por lábios não proeminentes inconspícuos (Barra = 10 μ m). D) Detalhe da abertura vulvar (v) delimitada por lábios não proeminentes inconspícuos (Barra = 10 μ m).

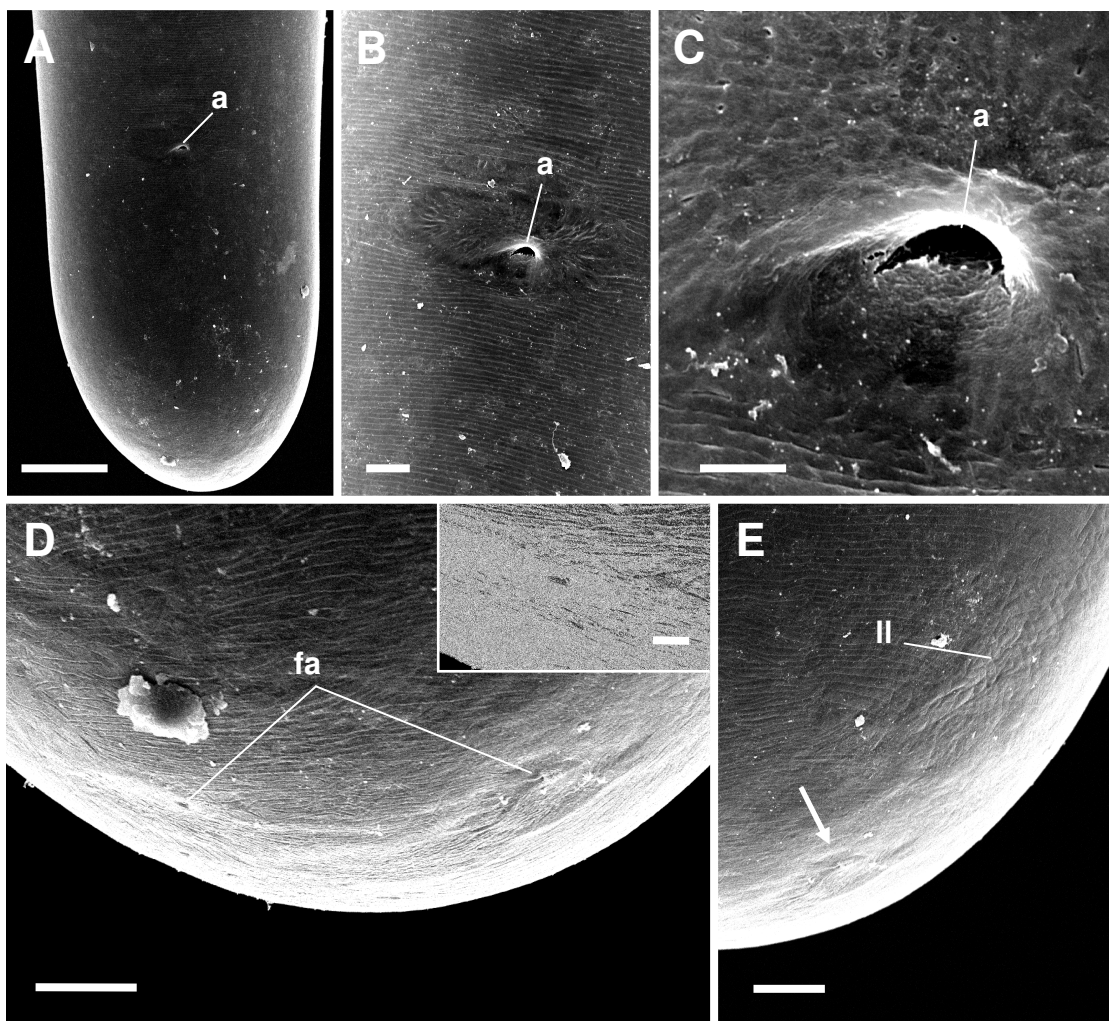


Figura 16: Detalhes da abertura anal e fasmídeos de filarídeo fêmea coletada no município de São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Visão geral da extremidade posterior, evidenciando a posição subterminal do ânus (a) (Barra = 50 μm). B) Detalhe do ânus (a), evidenciando a abertura anal encurvada para a extremidade posterior e a alteração no padrão de estriações cuticulares transversais em torno desta estrutura (Barra = 10 μm). C) Detalhe do ânus (a), evidenciando a abertura anal (Barra = 5 μm). D) Detalhe da extremidade posterior evidenciando um par de fasmídeos ventro-laterais (fa) (Barra = 10 μm), insert: detalhe da abertura de um fasmídeo (Barra = 2 μm). E) Detalhe da linha lateral (II) finalizando na extremidade posterior (seta), constituídas por discretas linhas descontínuas (Barra = 10 μm).

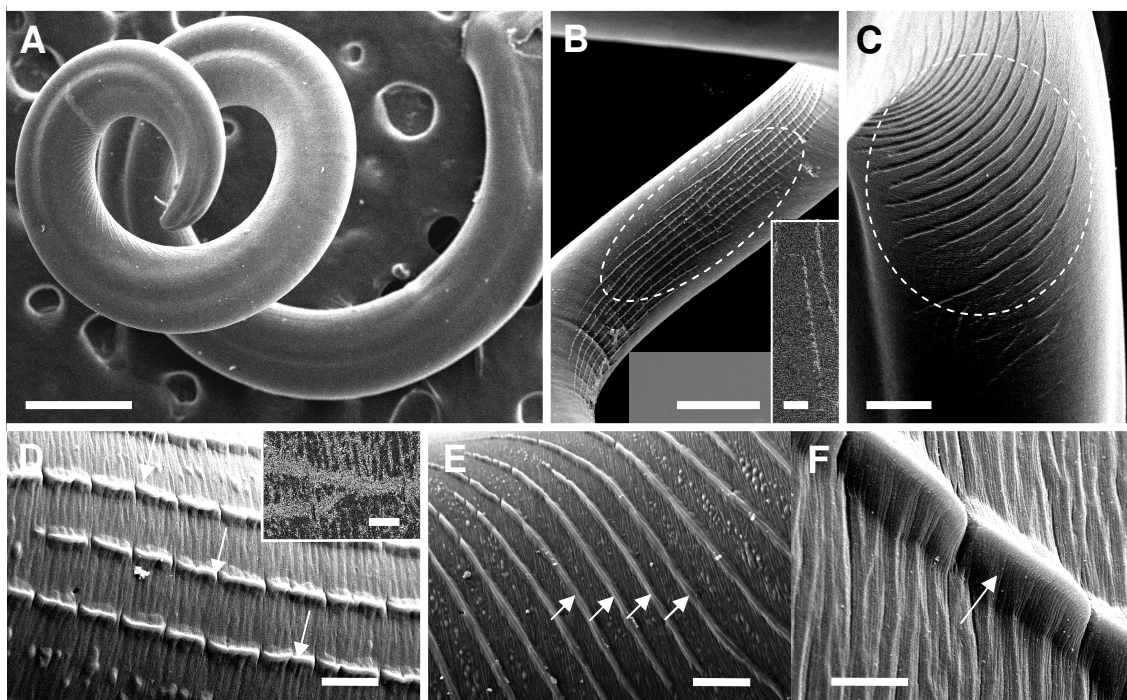


Figura 17: Aspectos das alterações cuticulares observadas na região posterior espiralada dos filarídeos machos dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Visão geral da região posterior espiralada dos filarídeos machos (Barra = 500 μm). B) Disposição longitudinal das cristas na área rugosa da espira maior (área pontilhada) (Barra = 200 μm). Insert: detalhe de uma crista de menor tamanho (Barra = 10 μm). C) Disposição transversal das cristas na área rugosa da espira menor (área pontilhada) (Barra = 50 μm). D) Detalhe das cristas longitudinais (setas) (Barra = 20 μm). Insert: detalhe de uma bifurcação em uma crista (Barra = 5 μm). E) Detalhe das cristas transversais (setas) (Barra = 20 μm). F) Detalhe da segmentação de uma crista (seta) disposta longitudinalmente na área rugosa, constituída por uma elevação cuticular cuneiforme, alongada, com base de contorno suavizado e ápice retilíneo (Barra = 5 μm).

Estas cristas eram descontínuas, constituídas por uma fileira de elevações cuticulares cuneiformes, alongadas, com base de contorno suavizado e ápice retilíneo (Figura 17F). Possuem comprimento variado, sendo mais curtas quando emergem de modo perpendicular às estriações cuticulares transversais.

Além das cristas (elevações cuticulares alongadas), foram observadas numerosas elevações cuticulares arredondadas, menos elevadas que as cristas, dispostas enfileiradas no final de cada crista (Figura 18G). Estas elevações arredondadas também foram observadas formando fileiras que se intercalavam nos espaços entre as cristas (Figura 18H). Estruturas semelhantes também foram observadas lateralmente à área rugosa, constituindo uma área de transição para a região dorsal do verme (Figura 18I e 18J). Entretanto, nesta região, estas elevações arredondadas não se apresentavam enfileiradas, mas sim aleatoriamente dispostas na região lateral, até a região dorsal (Figura 18K).

Na extremidade posterior do corpo do verme foi observada uma bolsa copuladora inconspícua (Figura 19A, 19B e 19C), com diversas papilas nas regiões próximas à abertura cloacal. As papilas pré-cloacais nem sempre se apresentaram pareadas (Figuras 19B e 19C). Um par de pequenas papilas ad-cloacais foi observado lateralmente à abertura cloacal (Figura 19D). As papilas pós-cloacais não foram observadas em todos os espécimes, variando em número, porém, geralmente eram constituídas por um par de pequenas papilas pós-cloacais ventrais (Figura 19D) logo após a abertura cloacal, e duas grandes papilas ventro-laterais (Figura 19D).

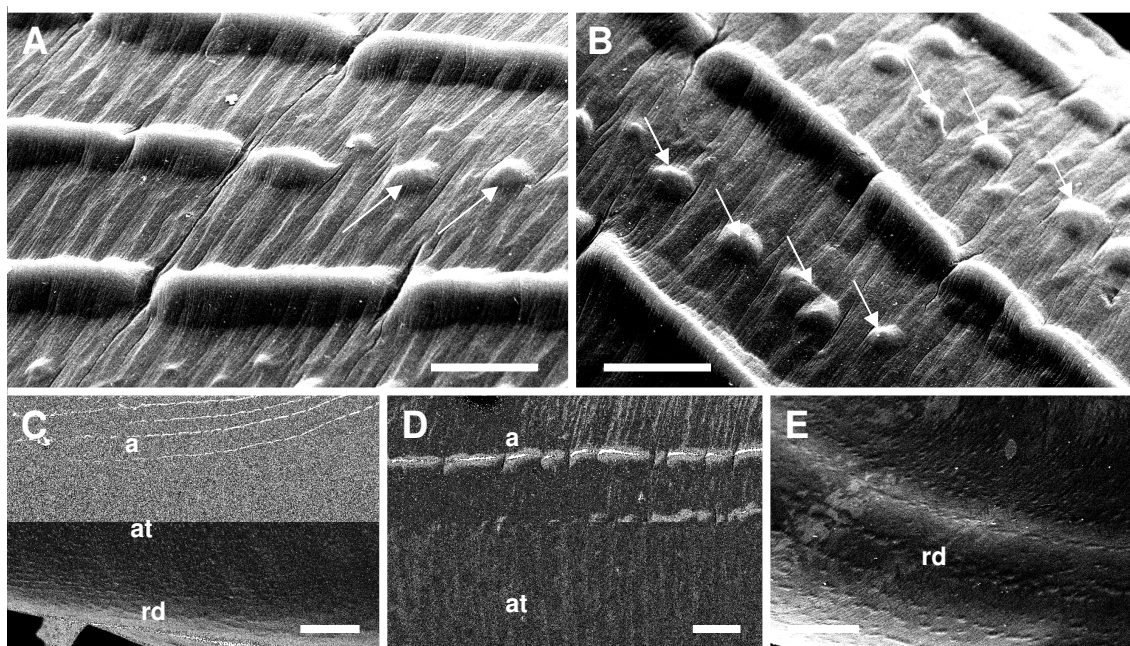


Figura 18: Aspectos das alterações cuticulares arredondadas observadas na região posterior espiralada dos filarídeos machos dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Detalhe das elevações cuticulares arredondadas enfileiradas no final de cada crista (setas) (Barra = 10 μ m). B) Detalhe das elevações cuticulares arredondadas enfileiradas no espaço entre as cristas (setas) (Barra = 10 μ m). C) Visão geral da área de transição (at), entre a área rugosa (ar) e a região dorsal (rd) (Barra = 50 μ m). D) Detalhe de uma crista da área rugosa (ar) e das elevações cuticulares arredondadas dispostas aleatoriamente na área de transição (at) (Barra = 10 μ m). E) Detalhe das elevações cuticulares arredondadas dispostas aleatoriamente na região dorsal (Barra = 50 μ m).

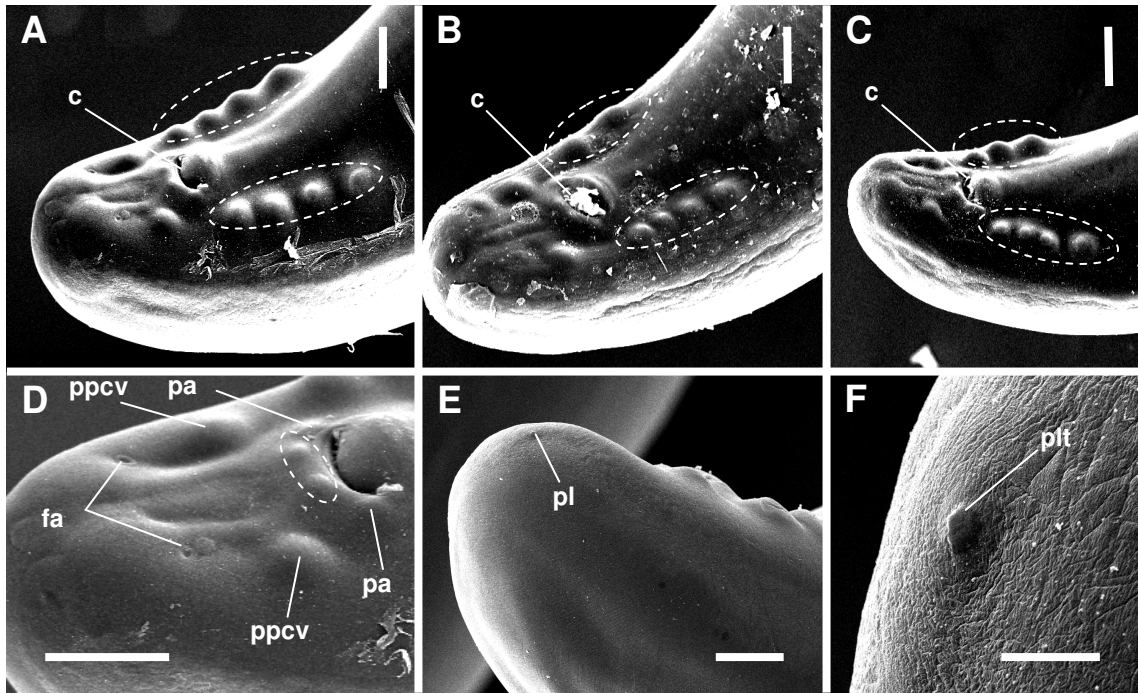


Figura 19: Detalhe da disposição das estruturas sensitivas localizadas na extremidade posterior de filarídeos machos dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Visão geral da bolsa copuladora inconspícua e a disposição das papilas pré-cloacais pareadas (área pontilhada) em relação a abertura cloacal (c) (Barra = 30 μ m). C) e B) Visão geral da bolsa copuladora inconspícua e a disposição das papilas pré-cloacais não-pareadas (área pontilhada) em relação a abertura cloacal (c) (Barras = 40 μ m e 50 μ m resp.). D) Detalhe das papilas ad-cloacais (pad), papilas pós-cloacais ventrais (área pontilhada), papilas pós-cloacais ventro-laterais (ppcvl) e abertura fasmidial (fas) delimitada por uma discreta elevação cuticular (Barra = 30 μ m). E) Visão geral da extremidade posterior arredondada e da localização da papila latero-terminal (plt) (Barra = 20 μ m). F) Detalhe da papila latero-terminal (plt) (Barra = 5 μ m).

Um par de fasmídeos ventrais foi observado posterior às papilas pós-cloacais, representados por uma abertura fasmidial circular rodeada por uma pequena elevação cuticular, também circular (Figura 19D).

A extremidade posterior do macho apresentou-se arredondada, onde foi observado um par de pequenas papilas latero-terminais (Figuras 19E e 19F).

Quando apenas o espículo menor apresentava-se evertido, foi possível observar a sua concavidade em forma de “calha”, constituído pela bainha (Figura 20G). Nesta concavidade, observou-se o espículo maior encaixado, quando ambos os espículos sofreram exteriorização (Figuras 20H, 20I e 20J). Também foi possível observar detalhes da bainha do espículo maior (Figura 20J).

3.3 ANÁLISE MOLECULAR

A amplificação da região 5.8S – ITS2 – 28S do DNAr, utilizando os *primers* DIDR-F1 e DIDR-F2, resultou em uma banda única de aproximadamente 500 pb, de acordo com o DNA *Leadder* (100 pb), em todas as amostras analisadas (amostras sanguíneas positivas apresentando microfilárias circulantes, vermes adultos dos dois municípios da Ilha do Marajó e o verme adulto do município do Rio de Janeiro). Nenhuma das amostras sanguíneas negativas para a pesquisa de microfilárias utilizadas como controle negativo da PCR apresentaram amplificação de fragmento de DNA (Figura 21).

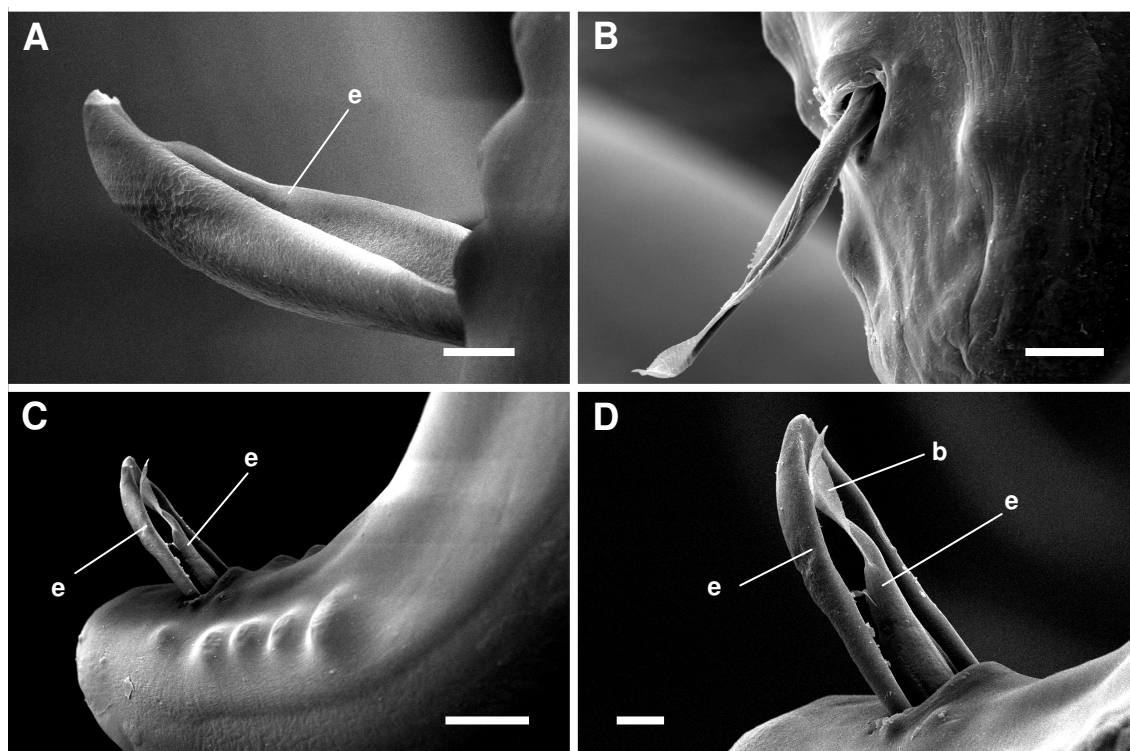


Figura 20: Detalhe da disposição dos espículos dos filarídeos machos dos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista, Ilha do Marajó, Estado do Pará. A) Detalhe do espículo pequeno (ep) evertido, evidenciando a concavidade em forma de “calha”, constituído pela bainha desta estrutura (Barra = 10 μ m). B) Detalhe dos espículos menor e maior evertidos (Barra = 15 μ m). C) Visão geral dos espículos menor (ep) e maior (eg) (Barra = 30 μ m). D) Detalhe dos espículos menor (ep) e maior (eg), evidenciando a bainha (b) do espículo maior (Barra = 10 μ m).

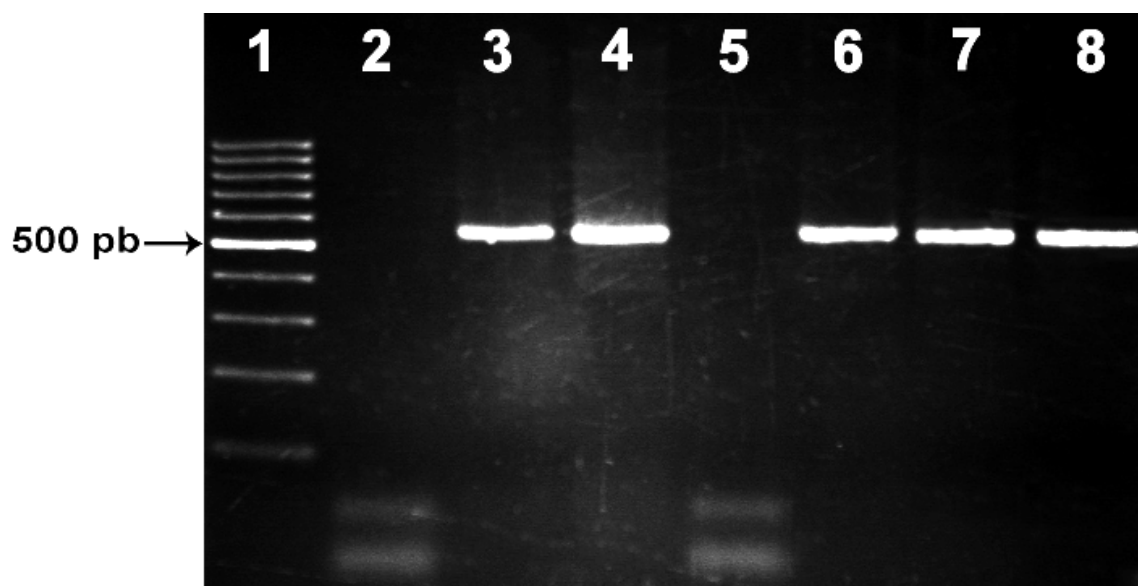


Figura 21: Produto da PCR submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,5% usando primers DIDR-F1 e DIDR-R1. 1) DNA Leadder (100 pb); 2) Amostra sanguínea sem microfilárias circulantes (Salvaterra - controle negativo); 3) Amostra sanguínea com microfilárias (Salvaterra); 4) Filarídeo adulto (Salvaterra); 5) Amostra sanguínea sem microfilárias circulantes (São Sebastião da Boa Vista - controle negativo); 6) Amostra sanguínea com microfilárias circulantes (São Sebastião da Boa Vista); 7) Filarídeo adulto (São Sebastião da Boa Vista); 8) Filarídeo adulto - *D. immitis* (Rio de Janeiro).

As amostras que apresentaram amplificação de aproximadamente 500 pb foram submetidas ao seqüenciamento direto, e os nucleotídeos das regiões 5.8S (parcial) e ITS2 (parcial) do DNAr foram alinhados (Figura 22). A árvore filogenética construída a partir destas amostras, e das seqüências depositadas de DNA previamente no *Genbank*, usando o método de Máxima Parcimônia com 1000 réplicas de *bootstrap* mostrou que todas as seqüências de microfilárias, e de vermes adultos obtidas em Salvaterra (FJ263459, FJ263460, FJ263461, FJ263462, FJ263463, FJ263464, FJ263465, FJ263466, FJ263467, FJ263468), em São Sebastião da Boa Vista (FJ263456, FJ263458, FJ263457) e no Rio de Janeiro (FJ263455) foram agrupadas num clado monofilético com 98% de *bootstrap*, juntamente com a seqüência AF217800, pertencente à espécie *D. immitis* (Figura 23).

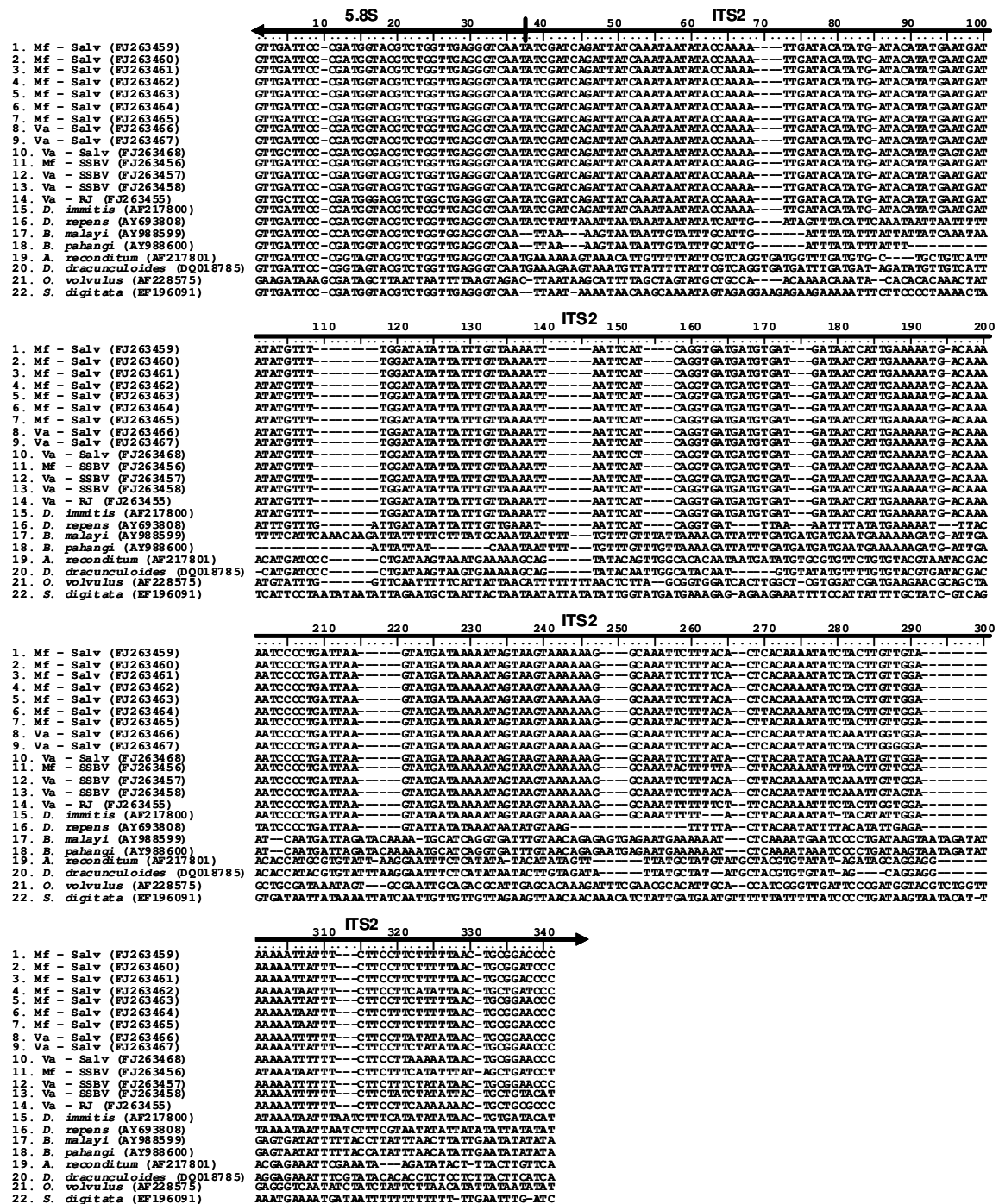


Figura 22: Alinhamento de 288 nucleotídeos obtidos das amostras de microfíliárias, de filarídeos adultos obtidos na Ilha do Marajó, do filarídeo adulto obtidos do Rio de Janeiro e das seqüências de filarídeos depositados no Genbank. Seqüência parcial da região 5.8S (seta vermelha) e seqüência parcial da região ITS2 (seta azul). Mf – Salv: microfíliária de Salvaterra; Va – Salv: verme adulto de Salvaterra; Mf – SSBV: microfíliária São Sebastião da Boa Vista; Va – SSBV: verme adulto de São Sebastião da Boa Vista; Va – RJ: verme adulto do Rio de Janeiro.

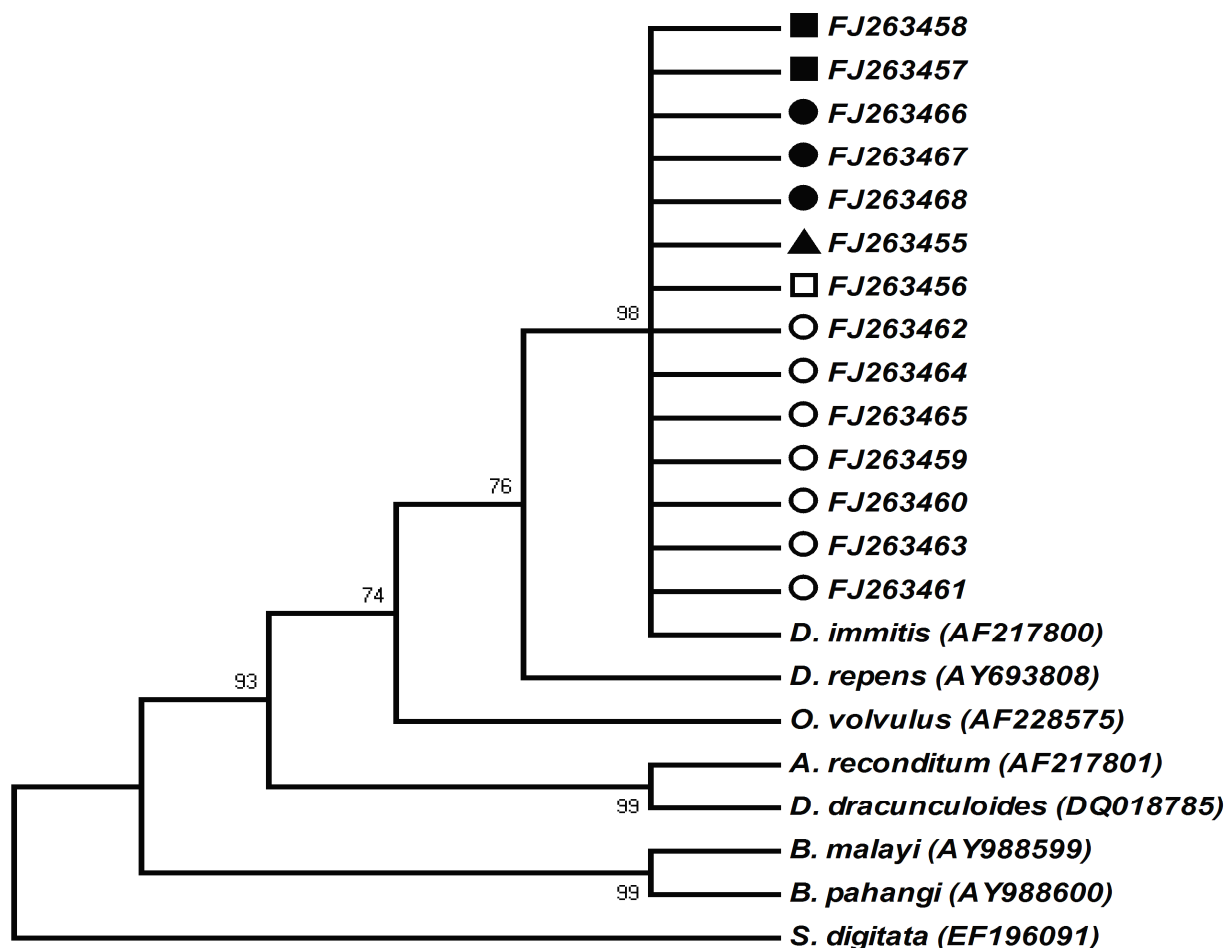


Figura 23: Relação filogenética (Máxima Parcimônia, com 1000 réplicas de *bootstrap*) entre amostras de microfilárias, vermes adultos obtidos na Ilha do Marajó, vermes adultos obtidos no Rio de Janeiro e seqüências de filarídeos depositados no *Genbank*. Amostras de microfilária (brancos), filarídeos adultos (pretos), Salvaterra (circulo), São Sebastião da Boa Vista (quadrados) e *D. immitis* do Rio de Janeiro (triângulo). Valor de *cut-off* = 74%. *Setaria digitata* (EF196091) = grupo externo.

4 DISCUSSÃO

Com base nas informações coletadas neste trabalho, identificamos que a prevalência de cães domésticos microfilarêmicos foi de 37,34% em Salvaterra e 6,67% em São Sebastião da Boa Vista. Brito *et al.* (2001) associaram a maior infecção por microfilárias em regiões litorâneas, sugerindo que a maior presença de criadores de vetores estariam relacionados com este fato. Entretanto, os municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista apresentam condições ambientais semelhantes, como clima tropical úmido e regime de chuvas periódicas.

O percentual de cães microfilarêmicos observado em Salvaterra (37,34%) foi menor do que o descrito anteriormente para este mesmo município por Garcez *et al.* (2006). Provavelmente o percentual de cães infectados observados neste trabalho seja diferente daquele apresentado por Garcez *et al.* (2006) devido à diferente abordagem metodológica. Estes autores usaram um teste imunoenzimático e obtiveram um percentual de positividade de infecção de 53,4%. Além de o número amostral ser menor do que o avaliado no presente estudo, a eficácia dos testes imunoenzimáticos é questionável, como já discutido por outros autores (Song *et al.*, 2002; Vezzani *et al.*, 2008), podem indicar cães falsos positivos, devido à reação cruzada com antígenos de outros helmintos.

Labarthe & Guerrero (2005) calcularam que a prevalência total da filariose canina no Brasil diminuiu de 7,9% em 1988 para 2% em 2001, sugerindo que esta redução estaria associada às campanhas de controle de doenças transmitidas por mosquitos aos humanos (arboviroses), à

quimioprofilaxia para tratamento da filariose canina e ao controle por antibióticos de erlichiose canina.

Os fatores descritos no parágrafo anterior não se aplicam à Salvaterra, uma vez que poucas atividades são executadas com relação aos cuidados da saúde dos cães, ficando restritas às campanhas para imunização contra o vírus da raiva e a eliminação de cães calazar - positivos.

Após agruparmos os dados coletados nos dois municípios da Ilha do Marajó, considerando a prevalência total de cães microfilarêmicos de 32,45%, percebemos a Ilha do Marajó como um dos locais de maior prevalência de cães microfilarêmicos quando comparadas com outras regiões do Brasil visto nos trabalhos de Duque-Araújo *et al.* (1995), Labarthe *et al.* (1998), Ahid *et al.* (1999), Ferreira *et al.* (1999), Fernandes *et al.* (2000); Brito *et al.* (2001) e Araújo *et al.* (2003).

O número de cães machos positivos foi maior do que o de fêmeas, mas não se observou uma diferença na distribuição da infecção por microfilárias em relação ao sexo (X^2 correção de Yates = 0,341; $p = 0,559$). Nossos dados são semelhantes aos descritos por Song *et al.* (2002), Montoya *et al.* (2006) e Boonyapakorn *et al.* (2008) que também não acharam associação entre sexo do hospedeiro e infecção por filarídeos, mas diferem dos dados observados por Montoya *et al.* (1998) e Bolio-Gonzalez *et al.* (2007) que observaram maior infecção em machos e fêmeas, respectivamente. Segundo Nzabanita *et al.* (1982), cães fêmeas estariam mais protegidas à infecção por filarídeos devido aos estrógenos que ativariam o sistema imunológico do hospedeiro.

A maior parte da população canina estudada foi de cães jovens, provavelmente devido à erradicação sistemática de cães calazar - positivos. Porém, os cães com idade a partir de quatro anos apresentavam maior probabilidade de estarem infectados ($X^2 = 32.943$; $p < 0.0001$). Cães com menos de um ano de idade residentes em áreas endêmicas são menos parasitados, provavelmente em decorrência do longo período pré-patente da filariose canina, como ressaltado por Rajamanickam *et al.* (1985). Assim, nossos resultados são semelhantes aos descritos por Montoya *et al.* (1998), Song *et al.* (2003), Montoya *et al.* (2006), Boonyapakorn *et al.* (2008) e Bolio-Gonzalez *et al.* (2007), mas diferem do descrito por Oge *et al.* (2003), que não observaram diferença de infecção com relação à idade.

Em relação às necropsias de 30 cães (20 em Salvaterra e 10 em São Sebastião da Boa Vista), dos 13 (43,33%) que apresentaram vermes nos órgãos torácicos, observamos infecção oculta em sete (53,84%). Apesar de o valor absoluto ser pequeno (sete), o percentual de infecção oculta se mostra elevado (53,84%). Elevados percentuais de infecção oculta também foram observados por Rawlings *et al.* (1982), Grieve *et al.* (1986), Reifur *et al.* (2004) e Yildirim *et al.* (2007) em cães e Labarthe *et al.* (1997) em gatos. Tasić *et al.* (2008) detectaram um baixo percentual de infecção oculta de filariose canina em cães da Sérvia, e sugeriram que este fato seria devido a origem recente do foco de infecção nesta região. Deste modo, podemos propor, então, que o foco de infecção por filaria canina na Ilha do Marajó não seja recente.

O estudo morfológico dos vermes adultos encontrados nos órgãos torácicos dos cães de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista mostrou que

estes filarídeos apresentavam estruturas semelhantes. Por esse motivo, foram agrupados para obtenção das médias nas mensurações realizadas.

Assim, as características morfométricas destes vermes foram compatíveis ao descrito por outros autores para *D. immitis* (Leidy (1856) apud Lent e Teixeira-de-Freitas, 1937; López-Neyra, 1947; Murata *et al.*, 2003; Sano *et al.*, 2005).

A descrição morfológica por microscopia de luz das estruturas dos vermes adultos coletados neste estudo pode ser comparada com descrições de *D. immitis* em outros trabalhos, como destacado a seguir:

a) Região anterior: o formato arredondado ligeiramente afilado da extremidade cefálica, a posição terminal da abertura oral circular, a posição das papilas cefálicas, anfídeos, anel nervoso, papilas cervicais e vulva, e a forma do esôfago são semelhantes ao descrito por López-Neyra (1947), Yamaguti (1962), Yorke & Maplestone (1962) e Murata *et al.* (2003).

b) Superfície do corpo: aspectos cuticulares com finas estriações transversais foram semelhante ao descrito por Canestri-Trotti *et al.* (1997) para o subgênero *Dirofilaria*, pertencente a espécie *D. immitis*. Segundo estes autores, a descrição da superfície cuticular de filarídeos de cães auxilia na diferenciação dos subgêneros *Dirofilaria* (sem estrias cuticulares longitudinais) e *Nochtiella* (com estrias cuticulares longitudinais). No entanto, Murata *et al.* (2003) e Sano *et al.* (2005) descrevem por microscopia de luz a superfície de *D. immitis* isolada de leopardo e pingüim, respectivamente, com estrias cuticulares longitudinais curtas e pouco elevadas.

c) Região posterior: a forma arredondada da extremidade posterior da fêmea observada neste trabalho também foi descrita por Yamaguti (1962) e Yorke & Maplestone (1962). O aspecto geral da bolsa copuladora e da disposição das papilas pré-, ad-, e pós-cloacais, incluindo a variação no número de papilas pré-cloacais de nossas amostras, estão de acordo com o observado por López-Neyra (1947), Yamaguti (1962) e Yorke & Maplestone (1962). Apenas Sano *et al.* (2005) destacam a posição dos fasmídeos. Estes autores mostram que estas estruturas são terminais em *D. immitis* observada por microscopia de luz. Entretanto, usando a mesma técnica, visualizamos os fasmídeos na posição ventral.

d) Espículos: a forma e disposição dos espículos e a ausência do gubernáculo estão de acordo com o descrito por López-Neyra (1947), Yamaguti (1962), Yorke & Maplestone (1962) e Sano *et al.* (2005).

As estruturas observadas por cortes histológicos transversais dos vermes adultos de ambos os municípios são semelhantes ao descrito por Huang *et al.* (2006) em um exame histopatológico de um caso de dirofilariose humana epidérmica provocada por *D. immitis*. Estes autores ressaltam ainda a ausência de protuberâncias cuticulares representativas das estriações cuticulares longitudinais. Fato este que também observado neste trabalho com filarídeos de cães da Ilha do Marajó. Pampiglione *et al.* (1999) ressaltam que o conhecimento das estruturas de helmintos por cortes histológicos é uma importante ferramenta no diagnóstico de dirofilariose humana.

Deste modo, os caracteres observados nos filarídeos coletados nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista poderão ser úteis para diagnósticos futuros.

O aspecto geral da extremidade cefálica, com abertura oral circular terminal e sem lábios, o número e a distribuição das papilas cefálicas e dos anfídeos e a descrição do padrão de estriações transversais da cutícula observados neste trabalho são semelhantes às descrições feitas por Wong & Brummer (1978).

Dois trabalhos publicados anteriormente descrevem a superfície de *D. immitis* por MEV: Wong & Brummer (1978), que compararam a morfologia cuticular de cinco espécies de filarídeos do Gênero *Dirofilaria*, e Rodrigues-Silva *et al.* (1999), que descreveram a área rugosa desta espécie de filarídeo e a distribuição das papilas cloacais.

A caracterização da área rugosa no que se refere à posição, tamanho e distribuição das cristas observadas nos filarídeos da Ilha do Marajó são semelhantes ao descrito por Wong & Brummer (1978) e Rodrigues-Silva *et al.* (1999). Entretanto, somente o trabalho publicado em 1978 descreve as elevações cuticulares arredondadas na área de transição da área rugosa para a região latero-dorsal, assim como a disposição aleatória destas estruturas nesta área, semelhantemente ao que foi observado nos vermes macho obtidos na Ilha do Marajó.

A forma da bolsa copuladora com a disposição não pareada das papilas pré-cloacais observadas neste trabalho também são semelhantes ao descrito por Wong & Brummer (1978) e Rodrigues-Silva *et al.* (1999).

Deste modo, baseando-se nessas informações morfológicas, que incluem a observação dos vermes por microscopia de luz, cortes histológicos e a MEV, identificamos os vermes adultos encontrados nos órgãos torácicos dos cães dos dois municípios estudados na Ilha do Marajó como *Dirofilaria immitis*.

O estudo por MEV das estruturas dos vermes adultos obtidos na Ilha do Marajó contribuem para o estudo morfológico de *D. immitis*, uma vez que algumas estruturas são detalhadas pela primeira vez neste trabalho, usando esta técnica, como:

- os detalhes das estriações cuticulares na extremidade anterior e posterior;
- a observação da abertura dos anfídeos;
- a descrição detalhada dos deirídeos;
- a visualização da abertura vulvar;
- a descrição da linha lateral;
- a descrição da abertura anal, assim como do par de fasmídeos na extremidade posterior das fêmeas;
- a descrição das elevações cuticulares arredondadas na região entre as cristas da área rugosa da extremidade posterior espiralada dos machos;
- a confirmação do posicionamento ventral dos fasmídeos nos vermes machos.
- a visualização de um par de pequenas papilas latero-terminais na extremidade posterior dos vermes machos.

Algumas estruturas anatômicas do corpo dos filarídeos da Ilha do Marajó observados neste trabalho por microscopia de luz e MEV foram semelhantes, como: o posicionamento das papilas cefálicas, dos anfídeos, deirídeos e abertura vulvar; as estriações cuticulares transversais e a ausência de estriações longitudinais ao longo do corpo; a visualização da área rugosa na região espiralada dos machos; o não pareamento das papilas pré-cloacais; a diferença no formato dos espículos. Entretanto, o posicionamento das papilas pós-cloacais só foi determinado por microscopia de luz.

O fato de identificarmos os filarídeos presentes nas cavidades dos órgãos torácicos nos cães domésticos da Ilha do Marajó como *D. immitis*, não significa que todas as microfilárias observadas nos exames hemoscópicos deste trabalho pertencem a esta mesma espécie, uma vez que a co-infecção por filarídeos pode ocorrer, incluindo filarídeos teciduais.

Desta maneira, levamos em consideração a comparação de características moleculares entre vermes adultos obtidos na Ilha do Marajó identificados morfológicamente como *D. immitis* e as microfilárias circulantes presentes no sangue dos cães estudados.

Mar *et al.* (2002) sugeriram a região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr para ser usada na identificação molecular de filarídeos, por ser uma região que preserva similaridades dentro deste grupo de seres vivos, mas também apresenta diferenças específicas que podem ser levadas em consideração. De fato, esta região vem sendo pesquisada por diversos autores que desenvolvem estudos filogenéticos por seqüenciamento nucleotídico e, mais recentemente,

por análise da estrutura secundária desta região do rDNA de diversos seres vivos, como Dassanayake *et al.* (2008), Keller *et al.* (2008) e Miao *et al.* (2008).

Nos estudos moleculares, utilizamos os *primers* DIDR-F1 e DIDR-R1 que, segundo Rishniw *et al.* (2006), amplificam a região 5.8S-ITS2-28S do DNAr, diferenciando espécies de filarídeos pelo tamanho em pb dos fragmentos amplificados.

Como parâmetro de comparação (controle positivo), utilizamos um exemplar de filarídeo fêmea obtido de um cão domiciliado no Estado do Rio de Janeiro. A PCR com o DNA total extraído deste exemplar e das amostras de sangue positivas para microfilárias obtidas na Ilha do Marajó resultaram num fragmento único que apresentou um perfil de migração eletroforética em torno de 500 pb.

Resultado semelhante foi observado em todas as amostras de vermes adultos obtidos nos municípios da Ilha do Marajó, sugerindo que todas estas amostras pertencem à mesma espécie. Deste modo, nossos dados são semelhantes ao observado por Rishniw *et al.* (2006), os autores dos *primers* usados neste trabalho, que mostraram um fragmento amplificado de 542 pb para *D. immitis*.

Vale ressaltar que a observação de uma banda única nas amostras sanguíneas positivas sugere que os cães estudados neste trabalho não apresentavam infecção mista.

Lee *et al.* (2004) sugerem que a PCR seja o método mais sensível para detecção de microfilárias presentes no sangue de cães infectados por filarídeos, pois, amostras que apresentaram resultados negativo para a

pesquisa de microfilárias pelos métodos convencionais, mostraram-se positivas pela análise molecular. Entretanto, no presente estudo, nenhuma das amostras sanguíneas negativas para microfilárias da Ilha do Marajó, submetidas a PCR, mostrou a formação de banda.

A árvore filogenética feita a partir das seqüências nucleotídicas obtidas neste trabalho e com seqüências de filarídeos depositadas previamente no Genbank mostra um clado monofilético, com 98% de *bootstrap*, que inclui as amostras da Ilha do Marajó, do Rio de Janeiro e a seqüência AF217800 (*D. immitis*).

Assim, concluímos que as microfilárias observadas nas amostras de sangue canino que foram submetidas ao seqüenciamento de nucleotídeos são da espécie *D. immitis*.

Diversos estudos sobre filogenia molecular de filarídeos do ponto de vista evolutivo já foram realizados, como os desenvolvidos por: Xie *et al.* (1994a), Xie *et al.* (1994b), Chansiri *et al.* (1999), Casiraghi *et al.* (2001), Pradeep-Kumar *et al.* (2002), Casiraghi *et al.* (2004), Krueger *et al.* (2007), Fong *et al.* (2008). Estes trabalhos foram desenvolvidos utilizando diversas regiões do genoma (nuclear e mitocondrial). Entretanto, nenhum destes estudos inclui a região ITS2 em suas análises.

Optamos em não analisar os dados apresentados na árvore filogenética neste trabalho sob o ponto de vista evolutivo, pois as seqüências obtidas foram pequenas quando comparadas com outros trabalhos. No entanto, o estudo filogenético apresentado aqui corrobora a identificação dos

vermes adultos coletados na Ilha do Marajó, feita a partir do estudo morfológico.

Segundo Ferri *et al.* (2009), a identificação clássica de nematóides (a partir de características morfológicas) e a identificação molecular (baseada no seqüenciamento do DNA) convergem para os mesmos resultados. Estes autores propõem a caracterização molecular como uma ferramenta importante que deveria se tornar rotina na identificação de nematodas parasitas.

Mesmo com algumas diferenças morfológicas entre nossos resultados e os obtidos por Murata *et al.* (2003), Sano *et al.* (2005) e Rodrigues-Silva *et al.* (1999), os resultados apresentados neste trabalho apontam a presença de *D. immitis* infectando cães nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista. Neste último município, este trabalho realiza a primeira descrição de cães infectados por filarídeos.

As diferenças morfológicas citadas anteriormente podem ser artefatuais, uma vez que o estudo molecular mostrou semelhanças moleculares entre os filarídeos caninos dos dois municípios da Ilha do Marajó, do Rio de Janeiro e de outras partes do mundo. Contudo, estudos moleculares futuros, com outras regiões do genoma destes helmintos, podem elucidar essa questão.

Vale ressaltar que, nossos dados descrevem também pela primeira vez, seqüências gênicas de *D. immitis* obtidas no Brasil (Ilha do Marajó e Rio de Janeiro).

A alta prevalência de *D. immitis* em cães na Ilha do Marajó e a possibilidade de infecção humana reforçam a necessidade de estudos

contínuos nesta região, incluindo a pesquisa de filarídeos em cães silvestres. Até o presente momento, não existem informações nesta região a respeito da infecção por filárias em carnívoros silvestres, e devido à diversidade de seres vivos encontrados na Região Amazônica, não se pode descartar esta possibilidade.

Em outras partes do mundo, alguns trabalhos propõem que espécies de mamíferos silvestres estariam funcionando como reservatório de *D. immitis*, como: Snyder *et al.* (1989), Wixsom *et al.* (1991), Marks & Bloomfield (1998), Magi *et al.* (2008). Assim, desde que existe a possibilidade de transmissão de infecções entre cães domésticos e selvagens (Sillero-Zubiri, *et al.*, 2004), o ciclo de transmissão de filariose canina na Ilha do Marajó pode ser mais complexo do que aqueles observados nos centros urbanos de grandes cidades e incluir infecção mista de cães por filarídeos ainda desconhecidos pela ciência.

5 CONCLUSÕES

- A prevalência total da dirofilariose nos dois municípios pesquisados na Ilha do Marajó é elevada, quando comparada com outras regiões do Brasil, ressaltando a importância de pesquisas a respeito do ciclo zoonótico desta infecção.

- Os cães domésticos domiciliados nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista – Ilha do Marajó – PA apresentam filarídeos adultos no coração (ventrículo direito), artéria pulmonar, pulmão e veias cava.

- Os filarídeos adultos encontrados no coração (ventrículo direito), artéria pulmonar veias cava e pulmões dos cães domésticos domiciliados nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista – Ilha do Marajó – PA são da espécie *D. immitis*, identificados por características morfológicas e moleculares.

- As microfilárias circulantes encontradas no sangue periférico de cães domésticos domiciliados nos municípios de Salvaterra e São Sebastião da Boa Vista – Ilha do Marajó – PA são da espécie *D. immitis*, identificados por características moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHID, S.M., LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R., SARAIVA, L.Q. Canine heartworm on São Luis Island, Northeastern Brazil: a potential zoonosis. **Cad Saude Publica**, **15**: 405-12. 1999.
- ANDERSON, R.C., BAIN, O. Keys to Genera of the Order Spirurida. In: **Keys to Nematode Parasites of Vertebrates**. Anderson, R.C., Chabaud, A.G. & Willmott, S., England, C.A.B. Commonwealth Agricultural Bureaux, 1976. p. 59 – 116.
- ARAUJO, R.T., MARCONDES, C.B., BASTOS, L.C., SARTOR, D.C. Canine dirifilariasis in the region of Conceicao Lagoon, Florianópolis, and in the Military Police kennel, São Jose, State of Santa Catarina, Brazil. **Vet Parasitol**, **113**: 239-42. 2003.
- BOLIO-GONZALEZ, M.E., RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., SAURI-ARCEO, C.H., GUTIERREZ-BLANCO, E., ORTEGA-PACHECO, A., COLIN-FLORES, A.F. Prevalence of the *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Merida, Yucatan, Mexico. **Vet Parasitol**, **148**: 166 - 169. 2007.
- BOONYAPAKORN, C., SRIKITJAKARN, L., MORAKOTE, N., HOERCHNER, F. The epidemiology of *Dirofilaria immitis* infection in outpatient dogs at Chiang Mai University Small Animal Hospital, Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, **39**: 33 - 38. 2008.
- BOWMAN, D.D. **Georgi's Parasitology for Veterinarians**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1990. 429p.

- BRITO, A.C., VILA-NOVA, M.C., MARTINS-ROCHA, D.A., GOMES COSTA, L., PINHEIRO DE ALMEIDA, W.A., DA-SILVA-VIANA, L., RAMALHO-LOPES, R.JR., FONTES, G., DA ROCHA, E.M., REGI, L. Prevalence of canine filariasis by *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in Maceió, Alagoas State, Brazil. **Cad Saude Publica**, **17**: 1497 - 1504. 2001.
- CANESTRI-TROTTI, G., PAMPIGLIONE, S., RIVASI, F. The species of the genus *Dirofilaria*, Railliet & Henry, 1911. **Parassitologia**, **39**: 369 - 374. 1997.
- CASIRAGHI, M., BAZZOCCHI, C., MORTARINO, M., OTTINA, E., GENCHI, C. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). **Vet Parasitol** **141**: 368 - 372. 2006.
- CHALIFOUX, L., HUNT, R.D. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. **J Am Vet Med Assoc**, **158**: 601 - 5. 1971.
- CHANSIRI, K., KAWAZU, S., KAMIO, T., TERADA, Y., FUJISAKI, K., PHILIPPE, H., SARATAPHAN, N. Molecular phylogenetic studies on *Theileria* parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Vet Parasitol**. **83**: 99 - 105. 1999.
- CIFERRI, F. Human pulmonary dirofilariosis in the United States: a critical review. **Am J Trop Med Hyg**, **31**: 302 - 308. 1982.
- DASSANAYAKE, R.S., GUNAWARDENE, Y.I., SILVA, B.D. ITS-2 secondary structures and phylogeny of *Anopheles culicifacies* species. **Bioinformation**, **2**: 456 - 560. 2008.
- DUQUE-ARAUJO, A.M., LABARTHE, N. LUVISÁRIO, S.L., REIDA, D.

- Filariose canina no estado de São Paulo – Brasil. In IV Congresso Ibérico de Parasitologia. 1995. **Anais.** 93-94. Santiago de Compostela: Sociedade Ibérica de Parasitologia. 1995.
- FERNANDES, C.G.N., MOURA, A.T., DIAS, A.R., VIEIRA-FILHO, W.S. Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, Estado de Mato Grosso-Brasil. **Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci**, **36**: 258-261. 2000.
- FERREIRA, F.A., BARBOSA, F.C, MASTRANTONIO, E.C, FARACIO, A.D. Ocorrência da dirofilariose canina na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **Veterinária Notícias, Uberlândia**, **5**: 57-61. 1999.
- FERRI, E., BARBUTO, M., BAIN, O., GALIMBERTI, A., UNI, S., GUERRERO, R.A., FERTE, H., BANDI, C., MARTIN, C., CASIRAGHI, M. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda) **Front Zool**, **6**. 2009. (no plero).
- FLIEDER D.B., MORAN, C.A. Pulmonary Dirofilariasis: A Clinicopathologic Study of 41 Lesions in 39 Patients. **Hum Pathol**, **30**: 251 – 256. 1999.
- FONG, M.Y., ASHA, T., AZDAYANTI, M., YEE, L.L., SINNADURAI, S., ROHELA, M. Inferring the phylogenetic position of *Brugia pahangi* using 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene sequence. **Trop Biomed**, **25**: 87 - 92. 2008.
- FOREYT, W.J. **Parasitologia Veterinária: manual de referência**. São Paulo, Roca, 2005. 240p.

- FURLANELLO, T., CALDIN, M., VEZZONI, A., VENCO, L. & KITAGAWA, H.
 Patogenesi. In: **La Filariosi Cardiopolonare del Cane e del Gatto**.
 Genchi, C., Venco, L., Vezzoni, A. (eds). Cremona, SCIVAC, 1998. p. 31-46.
- GARCEZ, L.M., DE-SOUZA, N.F., MOTA, E.F., DICKSON, L.A., ABREU, W.U., CAVALCANTI, V. de F., GOMES, P.A. Focus of canine heartworm disease in Marajo Island, North of Brazil: A risk factor for human health. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **39**: 333-6. 2006.
- GASSER, R.B, LEGOFF, L., PETIT, G., BAIN, O. Rapid delineation of closely-related filarial parasites using genetic markers in spacer rDNA. **Acta Tropica**, **62**: 143-150. 1996.
- GENCHI, C., GUERRERO, J., MCCALL, J.W., VENCO L. Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats. In: **Mappe Parassitologiche 8: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections**. Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (eds.). Nápoles. Rolando Editore. 2007a. p. 145 – 161.
- GENCHI, C. VENCO, L., GENCHI, M. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. In: **Mappe Parassitologiche 8: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections**. Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (eds.). Nápoles. Rolando Editore. 2007b. p. 137 – 144.

- GORTÁZAR C., VILLAFUERTE R., LUCIENTES J., FERNÁNDEZ-DE-LUCO D. Habitat related differences in helminth parasites of red foxes in the Ebro valley. **Vet Parasitol**, **80**: 75-81.1998.
- GRANDI, G., ŽIVIČNJAK, T., BECK, R. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. Infections. In: **Mappe Parassitologiche 8: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections.** Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (eds.). Nápoles. Rolando Editore. 2007. p. 60 – 66.
- GRIEVE, R.B., GLICKMAN, L.T., BATER, A.K., MIKA-GRIEVE, M., THOMAS, C.B., PATRONEK, G.J. Canine *Dirofilaria immitis* infection in a hyperenzootic area: examination by parasitologic findings at necropsy and by two serodiagnostic methods. **Am J Vet Res**, **47**: 329 - 332. 1986.
- HAMIR, A. N. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) in the brain of a dog. **Vet Rec**, **28**: 207-208. 1987.
- HIRANO, H., KIZAKI, T., SASHIKATA, T., MATSUMURA, T. Pulmonary Dirofilariasis, Clinicopathological Study. **Kobe J Med Sci**, **48**: 79 – 86. 2002.
- HUANG, S.L., LIU, Y.H., CHEN, W. Subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria immitis* mimicking a large epidermal cyst. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, **20**: 477 - 478. 2006.
- KELLER, A., SCHLEICHER, T., FÖRSTER, F., RUDERISCH, B., DANDEKAR, T., MÜLLER, T., WOLF, M. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales). **BMC Evol Biol**, **8**: 218. 2008.

- KELLY, J. D. Detection and differentiation of microfilariae in canine blood. **Aust Vet J**, **49**: 23 - 27. 1973.
- KOLTAS, S., ÖZCAN, K., DURAN, N. Subconjunctival infection with *Dirofilaria repens*. **Ann Saudi Med**, **22**: 75 – 76. 2002.
- KRAMER, L.H., KARTASHEV, V.V., GRANDI, G., MORCHÓN, R., NAGORNII, S.A., KARANIS, P., SIMÓN, F. Human subcutaneous dirofilariasis, Russia. **Emerg Infect Dis**, **13**: 150 - 152. 2007.
- KRUEGER, A., FISCHER, P., MORALES-HOJAS, R. Molecular phylogeny of the filaria genus *Onchocerca* with special emphasis on Afrotropical human and bovine parasites. **Acta Trop**, **101**: 1 - 14. 2007.
- LABARTHE, N., FERREIRA, A.M., GUERRERO, J., NEWCOMB, K., PAES-DE-ALMEIDA, E. Survey of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in random source cats in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil, with descriptions of lesions. **Vet Parasitol**, **71**: 301 - 306. 1997.
- LABARTHE, N., SERRAO, M.L., MELO, Y.F., DE OLIVEIRA, S.J., LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niteroi, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **93**: 145-54. 1998.
- LABARTHE, N., GUERRERO, J. Epidemiology of heartworm: What is happening in South America and Mexico? **Vet Parasitol**, **133**: 149 – 156. 2005.
- LENT, H., TEIXEIRA-DE-FREITAS, J.F. Dirofilariose sub-cutaneas dos cães no Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **32**: 443-448. 1937.

- LÓPEZ-NEYRA, C.R. **Helmintos de los Vertebrados Ibéricos, Tomo II.** Espanha, CSIS, 1947. 802 pp.
- MAGI, M., CALDERINI, P., GABRIELLI, S., DELL'OMODARME, M., MACCHIONI, F., PRATI, MC., CANCRINI, G. *Vulpes vulpes*: a possible wild reservoir for zoonotic filariae. **Vector Borne Zoonotic Dis**, **8**: 249-252. 2008.
- MANFREDI, A. DI CERBO, M. GENCHI. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In: **Mappe Parassitologiche 8: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections.** Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (eds.). Nápoles. Rolando Editore. 2007. p. 39 – 45.
- MAR, P.H., YANG, I.C., CHANG, G.N., FEI, A.C.Y. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). **Vet Parasitol**, **106**: 243–252. 2002.
- MARKS, C.A., BLOOMFIELD, T.E. Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban Melbourne. **Vet Parasitol**, **78**: 147 - 154. 1998.
- MARSHALL, B.G., WILKINSON, R.J., DAVIDSON, R.N. Pathogenesis of tropical pulmonary eosinophilia: parasitic alveolitis and parallels with asthma. **Respir Med**, **92**: 1 - 3. 1998.
- MIAO, M., WARREN, A., SONG, W., WANG, S., SHANG, H., CHEN, Z. Analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of scuticociliates and related taxa (Ciliophora, Oligohymenophorea) to infer their evolution and phylogeny. **Protist**, **159**: 519 - 533. 2008.

- MIYOSHI, T., TSUBOUCHI, H., IWASAKI, A., SHIRAISHI, T., NABESHIMA, K., SHIRAKUSA, T. Human pulmonary dirofilariasis: a case report and review of the recent Japanese literature. **Respirology**, **11**: 343 - 347. 2006.
- MONTOYA, J.A., MORALES, M., FERRER, O., MOLINA, J.M., CORBERA, J.A. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). **Vet Parasitol**, **75**: 221 - 226. 1998.
- MONTOYA, J.A., MORALES, M., JUSTE, M.C., BAÑARES, A., SIMON, F., GENCHI, C. Seroprevalence of canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) on Tenerife Island: an epidemiological update. **Parasitol Res**, **100**: 103 - 105. 2006.
- MORCHÓN, R., LÓPEZ-BELMONTE, J., BAZZOCCHI, C., GRANDI, G., KRAMER, L., SIMÓN, F. Dogs with patent *Dirofilaria immitis* infection have higher expression of circulating IL-4, IL-10 and iNOS mRNA than those with occult infection. **Vet Immunol Immunopathol**, **15**: 184-8. 2007.
- MURATA, K., YANAI, T., AGATSUMA, T., UNI, S. *Dirofilaria immitis* infection of a snow leopard (*Uncia uncia*) in a Japanese zoo with mitochondrial DNA analysis. **J Vet Med Sci**, **65**: 945-947. 2003.
- MURO, A., GENCHI, C., CORDERO, M., SIMÓN F. Human Dirofilariasis in the European Union. **Parasitol Today**, **15**: 386-9.1999.
- NUCHPRAYOON, S., JUNPEE, A., NITHIUTHAI, S., CHUNGPIVAT, S., SUVANNADABBA, S., POOVORAWAN, Y. Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. **Vet Parasitol**, **140**: 366–372. 2006.

- NUCHPRAYOON, S., JUNPEE, A., POOVORAWAN, Y., SCOTT, A.L.
Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis. **Am J Trop Med Hyg**, **73**: 895–900. 2005.
- NZABANITA, E., PRIESTER, W., FERVER, T. Distribution of canine filariasis. **Calif Vet**, **36**: 24–28. 1982.
- OGE, H., DOĞANAY, A., OGE, S., YILDIRIM, A. Prevalence and distribution of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs from Ankara and vicinity in Turkey. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, **110**: 69 - 72. 2003.
- OLMEDA-GARCÍA, A.S., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.A., ROJO-VÁZQUEZ, F.A. Experimental transmission of *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold 1870) by *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806). **Vet Parasitol**, **47**: 339-42, 1993.
- ORIHIEL, T.C. Morphology of the larval stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. **J Parasitol**, **47**: 251 - 62. 1960.
- ORIHIEL, T.C., EBERHART, M.L. Zoonotic filariasis. **Clin Microbiol Rev Abr**, **11**: 366 - 381. 1998.
- OTTESEN, E.A., NUTMAN, T.B. Tropical pulmonary eosinophilia. **Annu Rev Med**, **43**: 417-424. 1992.
- PAMPIGLIONE, S., RIVASI, F., CANESTRI-TROTTI, G. Pitfalls and difficulties in histological diagnosis of human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Noctiella) repens*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, **34**: 57 - 64. 1999.

- PERIBÁÑEZ, M.A., LUCIENTES, J., ARCE, S., MORALES, M., CASTILLO, J.A., GRACIA, M.J. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®. **Vet Parasitol**, **102**: 173–175. 2001.
- PRADEEP-KUMAR, N., PATRA, K.P., HOTI, S.L., DAS, P.K. Genetic variability of the human filarial parasite, *Wuchereria bancrofti* in South India. **Acta Trop**, **82**: 67 - 76. 2002.
- PRICHARD R. Application of molecular biology in veterinary parasitology. **Vet Parasitol**, **71**: 155 - 75. 1997.
- RAJAMANICKAM, C., WIESENHUTTER, E., ZIN, F.M., HAMID, J. The incidence of canine haematozoa in Peninsular Malaysia. **Vet Parasitol**, **17**: 151 - 157. 1985.
- RAWLINGS, C.A., DAWE, D.L., MCCALL, J.W., KEITH, J.C., PRESTWOOD, A.K. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, **180**: 1323 - 1326. 1982.
- REIFUR, L., THOMAZ-SOCCOL, V., MONTIANI-FERREIRA, F. Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Vet Parasitol**, **122**: 273 - 286. 2004.
- RISHNIW, M., BARR, S.C., SIMPSON, K.W., FRONGILLO, M.F., FRANZ, M., DOMINGUEZ ALPIZAR, J.L. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. **Vet Parasitol**, **135**: 303-14. 2006.

- RODRIGUES-SILVA, R., GUERRA, R.J., DE-ALMEIDA, F.B., MACHADO-SILVA, JR, DE-PAIVA, D.D. Human pulmonary dirofilariasis at Rio de Janeiro, Brazil: a case report. **Rev Soc Bras Med Trop**, **37**: 56 - 9. 2004.
- RODRIGUES-SILVA, R., MOURA, H., DREYER, G., REY, L. Human pulmonary dirofilariasis: a review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, **37**: 523 - 530. 1995.
- RODRIGUES-SILVA, R., LANFREDI, R.M., VICENTE, J.J., PINTO, R.M., GOMES, D.C. On the rugose area and caudal papillae distribution in *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Railliet & Henry, 1911, by Scanning Electron Microscopy. **Parasitol Res**, **85**: 867-869. 1999.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001.
- SANO, Y., AOKI, M., TAKAHASHI, H., MIURA, M., KOMATSU, M., ABE, Y., KAKINO, J., ITAGAKI, T. The first record of *Dirofilaria immitis* infection in a Humboldt penguin *Spheniscus humboldti*. **J Parasitol**, **91**: 1235 - 1237. 2005.
- SILLERO-ZUBIRI C., HOFFMANN M., MACDONALD D.W. **Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs**. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Status Survey and Conservation Action Plan, IUCN/SSC Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, 2004. 430p.
- SIMÓN, F., LÓPEZ-BELMONTE, J., MARCOS-ATXUTEGI, C., MORCHÓN, R., MARTÍN-PACHO, JR. What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? **Vet Parasitol**, **24**: 181 - 189. 2005.

- SIMÓN, F., KRAMER, L.H., ROMÁN, A., BLASINI, W., MORCHÓN, R., MARCOS-ATXUTEGI, C., GRANDI, G., GENCHI, C. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. **Vet Res Commun**, **31**: 161-71. 2007.
- SMITH, J.D. **Introduction to Animal Parasitology**. Cambridge, University Press, 1994. 549p.
- SNYDER, D.E., HAMIR, A.N., HANLON, C.A., RUPPRECHT, C.E. *Dirofilaria immitis* in a raccoon (*Procyon lotor*). **J Wildl Dis**, **25**: 130 - 131. 1989.
- SONG, K.H., HAYASAKI, M., CHO, K.W., LEE, S.E., KIM, D.H. Cross-reactivity between sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and crude extract of *Toxocara canis*. **Korean J Parasitol**, **40**: 195-198. 2002.
- SONG, K.H., LEE, S.E., HAYASAKI, M., SHIRAMIZU, K., KIMA, D.H., CHOA, K.W. Seroprevalence of canine dirofilariasis in South Korea. **Vet Parasitol**, **114**: 231 - 236. 2003.
- SOUZA, N.F., BENIGNO, R.N.M., FIGUEIREDO, M., SALIM, S.K., SILVA, D., GOLÇALVES, R., PEIXOTO, P.C., SERRA-FREIRE, N.M. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães do município de Belém – PA, com base na microfilaremia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **6**: 83-86. (1997).
- STAYERMAN, C., SZVALB, S., SAZBON, A. *Dirofilaria repens* presenting as a subcutaneous nodule in the penis. **BJU Int**, **84**: 746 - 747. 1999.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, **24**: 1596–1599. 2007.

- TASIĆ, A., ROSSI, L., TASIĆ, S., MILADINOVIĆ-TASIĆ, N., ILIĆ, T., DIMITRIJEVIĆ, S. Survey of canine dirofilariasis in Vojvodina, Serbia. **Parasitol Res**, **103**: 1297 - 1302. 2008.
- TAYLOR, A.E. The development of *Dirofilaria immitis* in the mosquito *Aedes aegypti*. **J Helminthol**, **34**: 27 - 38. 1960.
- TEZUKA, H., IMAI, S., HIDANO, S., TSUKIDATE, S., FUJITA, K. Various Types of *Dirofilaria immitis* polyproteins selectively induce a Th2-type immune response. **Infect Immun**, **71**: 3802–3811. 2003.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, **22**: 4673-4680. 1994.
- VEZZANI, D., FONTANARROSA, M.F., EIRAS, D.F. Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary results. **Res Vet Sci**, **85**: 113 – 115. 2008.
- VICENTE, J.J., RODRIGUES, H.O., GOMES, D.C., PINTO, R.M. Nematóides do Brasil. Parte V: Nematóides de Mamíferos. **Rev Bras Zool**, **14**: 1-452, 1997.
- WIXSOM, M. J., GREEN, S. P., CORWIN, R. M., FRITZELL, E. K. *Dirofilaria immitis* in Coyotes and Foxes in Missouri. **J Wildl Dis**, **27**: 166-169. 1991.
- WONG, M.M., BRUMMER, M.E. Cuticular morphology of five species of *Dirofilaria*: a scanning electron microscope study. **J Parasitol**, **64**: 108 - 114. 1978.

- XIE, H., BAIN, O., WILLIAMS, S.A. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. **Parasite**, **2**: 141 - 151. 1994a.
- XIE, H., BAIN, O., WILLIAMS, S.A. Molecular phylogenetic studies on *Brugia* filariae using Hha I repeat sequences. **Parasite**, **3**: 255 - 260. 1994b.
- YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum. vol. 3, The Nematodes of Vertebrates.** New Yorke, Interscience, 1962. 1261p.
- YILDIRIM, A., ICA, A., ATALAY, O., DUZLU, O., INCI A. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. **Res Vet Sci**, **82**: 358 - 363. 2007.
- YORKE, W., MAPLESTONE, P.A. **The Nematode Parasites of Vertebrates.** New York, Hafner, 1962. 536p.
- ZIALDI, S., TRIMECHE, M., MESTIRI, S., MOKNI, M., TRABELSI, A., BEM-ABDELKADER, A., BEN SAID, M., BEM-HADJ-HAMIDA, M., KORBI. S. La dirofilariose sous-conjonctivale humaine. À propos de deux cas tunisiens. **J Fr Ophtalmol**, **28**: 773 – 776. 2005.