

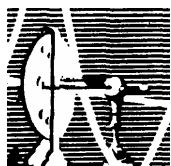
FERNANDO ANTONIO DE OLIVEIRA ADNET

MORFOLOGIA E TAXONOMIA DE *Cruzia tentaculata*

(RUD, 1819) TRAVASSOS, 1917 E *Vexillata* sp.

(TRAVASSOS, 1937) Durette-Desset, 1971

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Adnet, Fernando Antonio de Oliveira

Morfologia e Taxonomia de *Cruzia tentaculata* (Rud, 1817) Travassos, 1917 e *Vexillata* sp. Travassos, 1937 / Fernando Antonio de Oliveira Adnet - Rio de Janeiro: UFRJ-IBCCF, 2008.

viii, 73f: il.; 27,94 cm

Orientador: Reinalda Marisa Lanfredi

Dissertação (Mestrado)- UFRJ/ IBCCF/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológica (Biofísica)

Referências Bibliográficas: f. 54-62.

1. Nematoda 2. Marsupial 3. Roedores 4. *Clyomys* 5. *Didelphis*
6. Morfologia 7. MEV

I. Lanfredi, RM II. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Programa de Biologia Celular e Parasitologia.

III. Título

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Biologia de Helminhos Otto Wucherer e de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Reinalda Marisa Lanfredi e com auxílio financeiro das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB)
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)
- Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD)
- Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) / Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

*Dedico esse trabalho a minha esposa,
Gracinda da Conceição Fernandes Serra Adnet*

*Nunca ande por caminhos já traçados,
pois eles só conduzem até onde outros já foram.*

Alexander Gran Bell

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, Nossa Senhora, Santo Antonio e Frei Galvão, que sempre me socorreram e orientaram nesse percurso;

Aos meus pais, Dr. Edmundo Adnet Moreira (*in memoriam*) e Maria Alves de Oliveira Adnet e ao meu Tio João Alves, por toda sua dedicação e amizade;

Inúmeras foram às pessoas que contribuíram de forma direta e indireta para minha entrada no mestrado e o desenvolvimento deste trabalho;

A Prof. Regina Kubrusly e principalmente o Prof. Marcelo Lamas que me guiaram nos primeiros passos dentro do IBCCF. A Prof. Débora Anjos que me acolheu no Laboratório de Biologia de Helminths Otto Wucherer (LBHOW) e a Prof. e minha Orientadora Reinalda Marisa Lanfredi, que acreditou em meu potencial e ajudou a desenvolvê-lo. As alunas de iniciação científica: Luciana Diniz, Isabela Feijó, Tanny e especialmente Viviane e Denise, por toda ajuda e apoio. Aos alunos de pós-graduação: Melissa Cárdenas, Vanessa Moutinho e Eduardo Torres, e a Prof. Aleksandra Menezes, por todos os conselhos, conversas, auxílios e principalmente por durante essa caminhada terem sido bem mais que colegas, terem sido *amigos*;

Ao professor Wanderley de Souza e toda sua equipe. Ao Dr. Arnaldo Maldonado Jr e ao Dr. Paulo Sérgio D'Andréa e equipe pelo apoio nas coletas dos roedores utilizados nesse trabalho; Ao professor Ruy Cerqueira e sua equipe, em particular da doutoranda Ana Paula Decielos, pela captura dos marsupiais;

A toda equipe do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), especial Dra. Narcisa Leal e a secretária Sandra Brito e Diogo.

RESUMO

Marsupiais e pequenos roedores formam o grupo ecológico mais diversificado de mamíferos das florestas Neotropicais, com mais de 190 espécies atualmente reconhecidas no Brasil. Além de sua importância numérica, o conjunto das informações sobre a ecologia das espécies e das comunidades de pequenos mamíferos não-voadores indica que marsupiais e pequenos roedores exercem importante influência na dinâmica das florestas Neotropicais. Os marsupiais *Didelphis marsupialis* foram capturados na Colômbia, *Didelphis aurita* capturados na Mata Atlântica do Rio de Janeiro e os roedores *Clyomys laticeps* foram capturados no Pantanal Sul Mato-grossense. As análises morfométricas e morfológicas possibilitou a identificação do nematóide parasita do intestino grosso de *D. marsupialis* e *D. aurita* como *Cruzia tentaculata* e permitiu elucidar e adicionar novos caracteres taxonômicos para a espécie. A Colômbia representa uma nova ocorrência geográfica para a espécie *Cruzia tentaculata* e confirmamos a ocorrência da mesma no Rio de Janeiro, Brasil. No presente estudo, com base nas diferenças entre o número cristas cuticulares longitudinais observadas por secções ao meio do corpo e principalmente nas diferenças morfológicas e distribuição dos raios da bolsa copuladora indicam que este nematóide parasita do intestino delgado de *Clyomys laticeps* é uma nova espécie do gênero *Vexilata*. A família Echimyidae representa um novo taxa de roedor hospedeiro do gênero *Vexillata*.

ABSTRACT

Marsupials and small rodents are the more diversified ecological groups of mammals of the Neotropical forests, with more than 190 currently recognized species in Brazil. Beyond its numerical importance, the set of the information on the ecology of the species and the communities of small mammals not-flyers indicate that marsupials and small rodents have an important influence in the dynamics of the Neotropical forests. The marsupials *Didelphis marsupialis* were captured in Colombia, *Didelphis aurita* were captured in Mata Atlantica of Rio de Janeiro and the rodents *Clyomys laticeps* were captured in the Pantanal Sul Mato-Grossense. Morphometric and morphological analyses of the nematode found in the large intestine parasite of the *D. aurita* and *D. marsupialis* was identified as *Cruzia tentaculata*. Those analyses allowed us to describe better this nematode and to add new taxonomic characters for this species. Colombia is found to be a new geographical record for *Cruzia tentaculata* and its occurrence is confirmed in Brazil. In the present study, based on differences among the number of longitudinal cuticular ridges observed by cross sections in de mid body region and mainly by the differences of morphology and distribution of copulatory bursal rays indicates that this nematode parasite of the small intestine *Clyomys laticeps* is a new species of the genus *Vexilata*. The family Echimyidae represents a new taxon of rodent host to *Vexillata* genus.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1 Gênero <i>Didelphis</i> (Mammalia: Marsupialia)..... | 3 |
| 1.2 <i>Didelphis aurita</i> | 3 |
| 1.3 <i>Didelphis marsupialis</i> | 4 |
| 1.4 Gênero <i>Clyomys</i> (Rodentia: Echimyidae)..... | 5 |
| 1.5 <i>Clyomys laticeps</i> | 5 |
| 1.6 Nematóides..... | 7 |
| 1.7 Helmintos Estudados..... | 9 |
| 1.7.1 Família Cruzidae | 9 |
| 1.7.2 Gênero <i>Cruzia</i> | 10 |
| 1.8 Ordem Strongylida | 11 |
| 1.8.1 Superfamília Trichostrongyloidea..... | 12 |
| 1.8.2 Família Ornithostrongylidae..... | 12 |
| 1.8.3 Gênero <i>Vexillata</i> | 13 |
| 2. Objetivos..... | 15 |
| 3. Material e Métodos..... | 16 |
| 3.1 Hospedeiros..... | 16 |
| 3.1.1 Marsupiais..... | 16 |
| 3.1.2 Roedores..... | 16 |
| 3.2 Obtenção dos Parasitos..... | 17 |
| 3.3 Microscopia de Campo Claro..... | 17 |
| 3.4 Microscopia de Contraste Interferencial Diferencial..... | 18 |
| 3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 18 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 4. Resultados..... | 20 |
| 4.1 <i>Cruzia tentaculata</i> | 20 |
| 4.2 <i>Vexillata</i> sp..... | 37 |
| 5. Discussão..... | 46 |
| 5.1 <i>Cruzia tentaculata</i> | 46 |
| 5.2 <i>Vexillata</i> sp. | 48 |
| 5. Conclusões..... | 52 |
| 6. Referências..... | 54 |

1. INTRODUÇÃO

Segundo a teoria de comunidade a complexidade e a heterogeneidade ambiental determinam a diversidade e a riqueza das espécies, isto é, quanto maior a complexidade e a heterogeneidade, maior será a diversidade e a riqueza de espécies naquele ambiente. Além desses fatores, a riqueza tende a aumentar em latitudes próximas aos trópicos (Stehli, Douglas & Newell, 1969; Latham & Ricklefs, 1993; Cody, 1993; Willig & Gannon 1997). Estudos realizados nos principais biomas brasileiros: Cerrado, Mata Atlântica e Amazônia, descrevem uma fauna de mamíferos bastante diversa com relação à ocupação dos ambientes (Ribeiro & Marinho Filho, 2005).

O interesse para com a conservação dos ambientes naturais tem decorrido das conseqüências, devidas à má ocupação do solo e ao uso inadequado dos recursos naturais (Melo, Bueno & Pereira, 2006). Os sistemas agrícolas modernos, como por exemplo, as monoculturas, provocam grandes alterações na composição do solo e no ambiente, principalmente pela retirada da vegetação natural e pelas queimadas (Cerri, Volkoff & Eduardo, 1985; Geraldles, Cerri & Feigl, 1995). Além disso, a prática de pecuária extensiva provoca a compactação do solo, devido ao pisoteio do gado, impedindo ou dificultando o restabelecimento da vegetação nativa (Campos, 1999). Outro fator de desequilíbrio ambiental é a inserção de espécies exóticas. Esta é a segunda maior ameaça mundial à biodiversidade, sendo responsável por 39% do total de espécies extintas. Mais de 120 mil espécies exóticas de plantas, animais e microrganismos já invadiram os Estados Unidos, o Reino Unido, a Austrália, a Índia, a África do Sul e o Brasil (Ziller, 2000).

Marsupiais e pequenos roedores formam o grupo ecológico mais diversificado de mamíferos das florestas Neotropicais, com mais de 190 espécies atualmente reconhecidas no Brasil. Além de sua importância numérica, o conjunto das informações sobre a ecologia das espécies e das comunidades de pequenos mamíferos não-voadores indica que marsupiais e pequenos roedores exercem importante influência na dinâmica das florestas Neotropicais, a exemplo da dispersão de sementes, e são bons indicadores tanto de alterações locais do habitat quanto de alterações da paisagem (Pardini, Rossi & Munare, 2006).

Tanto marsupiais quanto roedores têm importância na saúde pública, já que servem de hospedeiro intermediário e reservatórios de vírus, bactérias, protozoários e helmintos que também infectam animais domésticos e o próprio homem (Thatcher, 2006).

A ocorrência de doenças em populações de animais silvestre tem se mostrado um importante indicador da saúde do ecossistema (Nielsen, 1995). Contudo no Brasil, existem aproximadamente 40 espécies de marsupiais das quais apenas 6 foram examinadas quanto a presença de endoparasitos, sendo que deste grupo estudado foram assinaladas mais de 60 espécies de parasitos entre protozoários e helmintos (Thatcher, 2006).

O estudo das espécies que compõe um bioma é fundamental para que possamos interpretá-lo. Desta forma, o estudo de helmintos de grupos significativos para dinâmica do ecossistema, como no caso de roedores e marsupiais acrescenta novos dados contribuindo para o seu melhor entendimento. Diversos estudos sobre mamíferos reservatórios de agentes infecto-parasitários causadores de zoonoses têm sido realizados no Brasil. (Thatcher, 2006, Rey, 2007). Entretanto, considerando-se que a diversidade da fauna de mamíferos brasileiros ainda não é completamente conhecida, e que a emergência e re-emergência de zoonoses é um problema atual de saúde pública, estudos sobre ecologia, taxonomia e parasitologia dos

mamíferos silvestres são de extrema necessidade e devem ser continuamente desenvolvidos (Roque & Vaz, 2008).

1.1 O gênero *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia)

Didelphis Linnaeus, 1758 é um dos gêneros de mamíferos terrestres com maior distribuição geográfica nas Américas (Austad, 1988), desde o Canadá até a Argentina (Gardner *et al.*, 1993), ocorrendo em grande variedade de habitats (Cerqueira, 1985). Atualmente quatro espécies são reconhecidas para o gênero: três na América do Sul (*D. albiventris*, *D. aurita* e *D. marsupialis*), duas na América Central (*D. marsupialis* e *D. virginia*) e uma (*D. virginia*) estendendo-se até as regiões temperadas da América do Norte (Cáceres, 2000). As espécies do gênero *Didelphis* desempenham um importante papel na manutenção da flora dos ecossistemas onde habitam, pois promovem a dispersão de sementes (Cáceres & Monteiro-Filho, 2007).

Thatcher (2006) publicou uma lista preliminar dos endoparasitos assinalados para os marsupiais do gênero *Didelphis*. Foram listadas 37 espécies de nematóides, 18 de trematódeos, 4 de cestóides e 4 de acantocéfalos. Dentre os nematóides listados a espécie *Cruzia tentaculata*, é freqüentemente assinalada em didelfídeos na América do Sul, incluindo o Brasil. (Ruiz, 1947).

1.2 *Didelphis aurita*

Com ampla distribuição geográfica *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Fig. 1), é uma das espécies de marsupiais mais comuns na Região Neotropical (Cáceres & Monteiro-

Filho, 2000), ocorrendo do nordeste do Brasil até o Paraguai e norte da Argentina (Gardner *et al.*, 1993), são frugívoros-onívoros (Cáceres, 2004), apresentam maior atividade durante as primeiras horas da noite e hábito terrestre (Passamani, Mendes & Chiarello, 2000).

1.3 *Didelphis marsupialis*

Conhecido como gambá, saruê ou macura, *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758, (Figura, 2) possui ampla distribuição geográfica, sendo assinalados do nordeste do México até as regiões centrais da Bolívia e do Brasil (Cerqueira & Lemos, 2000). Podem ser encontrados tanto no solo como no extrato arbóreo (Patton, Silva & Malcolm, 2000).

Com relação a seus hábitos alimentares, são classificados como onívoros. Sua dieta inclui principalmente artrópodes, pequenos vertebrados, tais como cobras, e frutos, que representam em torno de 1/4 de sua dieta (Emmons & Feer, 1997). *Didelphis marsupialis* tem hábitos noturnos (Cáceres, 2004) e durante o dia se refugia em troncos ocos, entre raízes ou sob montes de folhas secas (Cabrera & Yepes, 1960).



Figura 1: *Didelphis aurita* em seu habitat.

Fonte: www.knowyoursto.com Acesso: 10/10/2008



Figura 2: *Didelphis marsupialis* em seu habitat

Fonte: <http://cienciahoje.uol.com.br/materia/view/3603> Acesso: 10/10/2008

1.4 O Gênero *Clyomys* (Rodentia: Echimyidae)

O gênero *Clyomys* Thomas, 1916 está contido na família Echimyidae, e possui atualmente duas espécies, ambas nativas do Brasil: *C. laticeps* Thomas, 1909 e *C. bishopi* Ávila-Pires, 1981.

As espécies do gênero *Clyomys* alimentam-se de frutos e constroem suas galerias próximas aos locais de obtenção de alimentos (Bueno *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2004).

1.5 *Clyomys laticeps*

Clyomys laticeps (Fig. 3) é uma espécie semi-fossorial, passa parte do tempo em galerias cavadas no solo e outra na superfície, do Cerrado do Brasil Central, que inclui os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, a região sul de Mato Grosso, oeste e norte

de Minas Gerais, oeste da Bahia e o Distrito Federal (Becker *et al.*, 2007). Reis & Marinho-Filho (1998) sugeriram que essa espécie não é capturada frequentemente devido a seus hábitos escavadores. No entanto, estudos conduzidos no Pantanal Mato-Grossense, com armadilhas convencionais na superfície do solo indicaram que essa espécie pode ser localmente abundante e capturada com relativa facilidade na transição entre campo e mata (Lacher, Alho & Campos, 1986).

Clyomys laticeps tem sua ocorrência mais restrita às áreas de campos secos do Cerrado Central, enquanto *C. bishopi* ocorre em áreas de Cerrado em São Paulo, no sudeste do Brasil. Ambas as espécies do gênero tem o hábito de escavar galerias (Becker *et al.*, 2007).

Nascimento e colaboradores (2004) pesquisando o hábito alimentar de cutias (*Dasyprocta azaraea*) em relação ao consumo de frutos da palmeira Acuri (*Attalea phalerata*) no Pantanal Mato-Grossense notou, durante a pesquisa, que o roedor *C. laticeps* coletava os frutos diretamente da palmeira e ao contrário das cutias e outros animais que coletavam as que caíam no chão. Espécies frugívoras como *C. laticeps* são importantes dispersores de sementes (Galetti, Costa & Cazetta, 2003), o que denota sua importância para manutenção do ecossistema.



Figura 3 *Clyomys laticeps*, capturado no Pantanal mato-grossense.
Fonte: Arquivo Pessoal de E.J.L. Torres

1.6 Nematóides

Os nematóides (do grego *nematos*, fio) são vermes geralmente filiformes que apresentam um dos mais bem sucedidos planos de organização funcional desenvolvido pela natureza (Rey, 2007).

A maioria dos nematóides compreende espécies de vida livre, ocupando extensamente todos os tipos de habitats (Rey, 2007). Os hábitos alimentares são os mais variados, alguns se alimentam de microrganismos presentes no solo como o nematóide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, que habita solos de regiões temperadas (Deng *et al.*, 2004), outros como parasitos vivem na superfície das plantas e sugam sua seiva ou vivem em seu interior destruindo seus tecidos. Nos animais, eles podem parasitar praticamente todos os tecidos e órgãos como: olhos, fígado, rim, pulmão, sistema digestório, sistema circulatório e cavidades do corpo (Smith, 1992).

A maior parte dos nematóides é dióica, isto é, apresentam sexos separados com acentuado dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas geralmente são maiores e os machos apresentam a cauda curvada ventralmente em forma de gancho ou espiraladas ou com bolsa copuladora (Barnes & Ruppert, 1996; Rey, 2007). O tamanho dos nematóides pode variar entre menos de um milímetro, como no gênero *Caenorhabditis* a um metro de comprimento no gênero *Dracunculus* (Barnes & Ruppert, 1996).

Os nematóides têm como principal característica a parede do corpo, que limita, o pseudoceloma preenchido com o líquido pseudocelomático. Este conjunto gera uma pressão hidrostática no pseudoceloma que associado à musculatura da parede do corpo forma um esqueleto hidrostático, fundamental para locomoção dos nematóides (Barnes & Ruppert,

1996). Imersos no líquido pseudocelomático são encontrados, os órgãos do sistema digestório, que é completo começando em uma abertura oral de estrutura trirradiada na extremidade anterior e findo em um ânus nas fêmeas e cloaca nos machos, e do aparelho reprodutor tubular (Fig. 4).

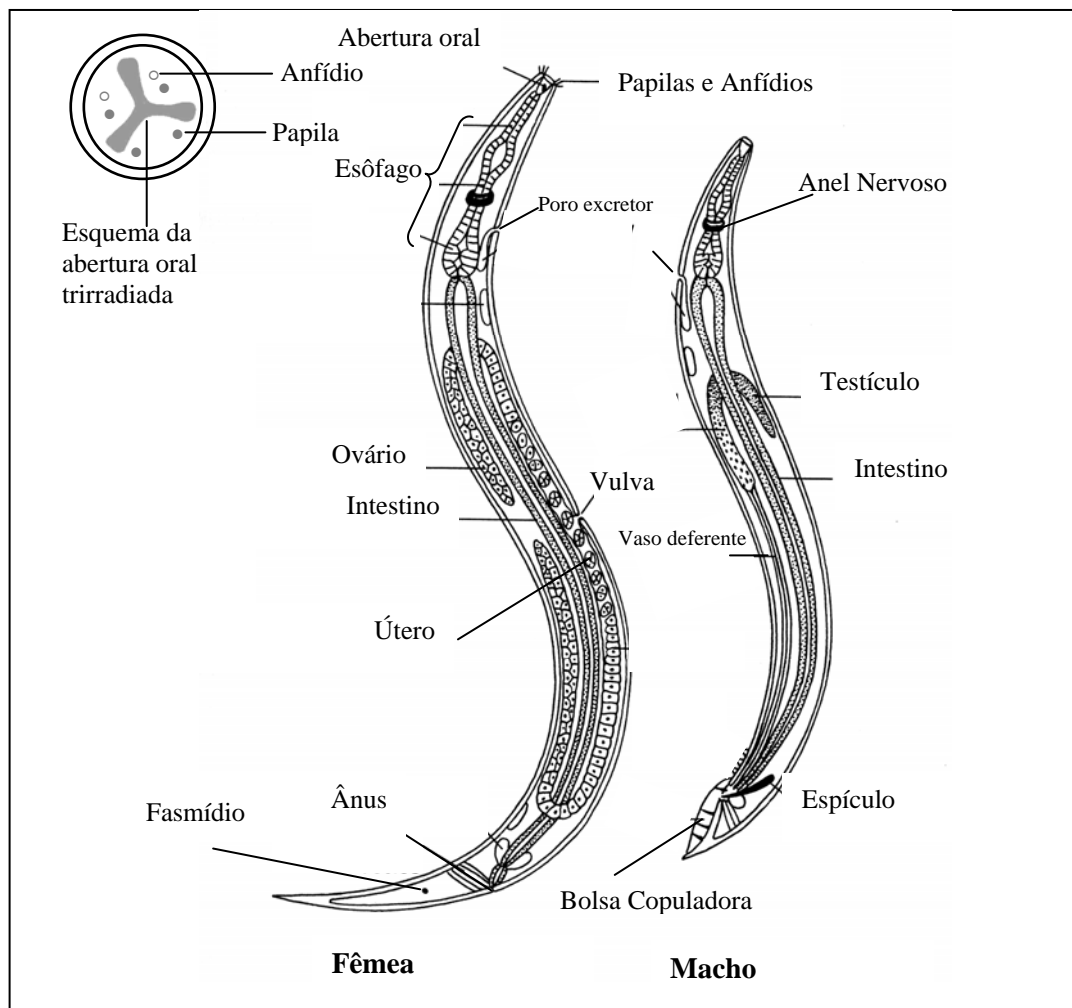


Figura 4: Morfologia geral de espécies do filo Nematoda. Adaptada de Roberts & Janovy (1996).

A parede do corpo dos nematóides compreende a cutícula, hipoderme e camada muscular (Roberts & Janovy, 1996; Rey, 2007) (Figura 5).

A cutícula é a camada mais externa da parede do corpo, e esta relacionada com a aquisição de nutrientes (Howeells & Chen, 1981) e nas relações entre o nematóide e meio externo (Johnstone *et al.*, 1996). A cutícula é dividida basicamente em epicutícula, camada cortical, média e fibrosa, sendo a epicutícula a camada mais externa (Fig. 5). O número de camadas e a morfologia podem variar de acordo com sexo, espécie e estágio evolutivo do nematóide (Bird & Bird, 1991).

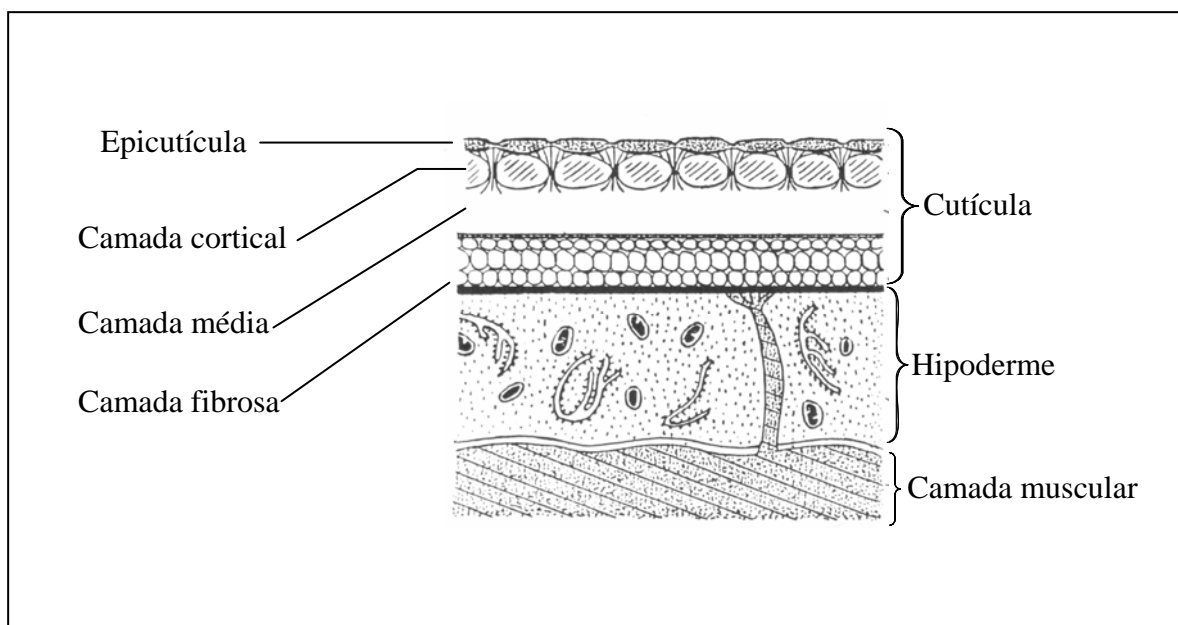


Figura 5: Corte transversal mostrando as diferentes camadas da parede do corpo.
Adaptado de Marr & Ullman (1995).

1.7 Helmintos Estudados

1.7.1 Família Cruzidae

A Família Cruzidae Travassos, 1917 encerra até o presente momento apenas o gênero *Cruzia*. Esta família tem como principais características, o divertículo intestinal dirigido para região anterior e faringe bem desenvolvida de luz trirradiada, apresentando três pares de colunas com projeções espiniformes (Ruiz, 1947).

1.7.2 O Gênero *Cruzia*

O gênero *Cruzia* Travassos, 1917 compreende 13 espécies as quais ocorrem em diferentes hospedeiros como: répteis (Ubelaker & Younus, 1965), anfíbios (Pearse, 1936; Espinoza *et al.*, 2007) e mamíferos (Ruiz, 1947).

A espécie tipo do gênero *Cruzia* foi descrita pela primeira vez por Rudolphi em 1819 com o nome de *Ascaris tentaculata*. Schneider (1866) realizou uma nova descrição e colocou a espécie em um novo gênero: *Oxysoma*. Railliet & Henry (1913) verificaram que o nome *Oxysoma* encontrava-se previamente ocupado e mudaram o nome do gênero para *Oxysomatium* (Ruiz, 1947).

Em 1917, Travassos, estudando os helmintos da coleção do Instituto Bacteriológico de São Paulo, estudou a espécie descrita por Rudolphi em 1819 e estabeleceu para ela um novo gênero, *Cruzia*, e uma nova família, Cruzidae (Travassos, 1917; Travassos, 1922; Ruiz, 1947).

Travassos (1922) fez uma redescrição da espécie, com riqueza de detalhes da espécie tipo do gênero, *Cruzia tentaculata*, e faz uma relação da sua ocorrência nos seguintes hospedeiros: *D. virginiana* Kerr, 1792, *D. philander* (= *Caluromys philander* Linnaeus, 1758), *D. opossum* (*Philander opossum* Linnaeus, 1758), *D. domestica* (= *Monodelphis domestica* Wagner, 1842), *D. murina* (*Marmosa murina* Linnaeus, 1758) e *D. nudicaudatus* (= *Metachirus nudicaudatus* Desmarest, 1817).

Cruzia tentaculata ocorre em marsupiais, contudo há registros de ocorrências em diversos membros da família Dasypodidae (tatus) (Ruiz, 1947), dentre eles *Euphractus sexcinctus* Linnaeus, 1758 e *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 no Paraguai (Fujita *et al.*, 1995).

A distribuição geográfica de *Cruzia tentaculata* abrange: Estados Unidos, México, Paraguai e Brasil (Ruiz, 1947). No Brasil sua ocorrência é ampla, Floresta Amazônica (Pinto & Gomes, 1990), Estado de Minas Gerais (Quintão & Costa, 1997), incluindo a Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro (Gomes, Vicente & Pinto, 2003).

1.8 Ordem Strongylida

A ordem Strongylida tem como principal característica a presença de uma bolsa copuladora bem definida (Fig. 6) e as superfamílias são separadas de acordo com suas estruturas cefálicas (Durette-Desset, 1971).

1.8.1 Superfamília Trichostrongyloidea

Os membros da Superfamília Trichostrongyloidea são monoxenos, isto é, possuem apenas um hospedeiro no ciclo de vida e apresentam cápsula bucal reduzida, (Durette-Desset, 1983). As larvas dependem unicamente de suas reservas vitelinas para sobreviver no meio externo e infectam o hospedeiro por via oral, dispensando uma migração pulmonar (Durette-Desset, 1971).

1.8.2 Família Ornithostrongylidae

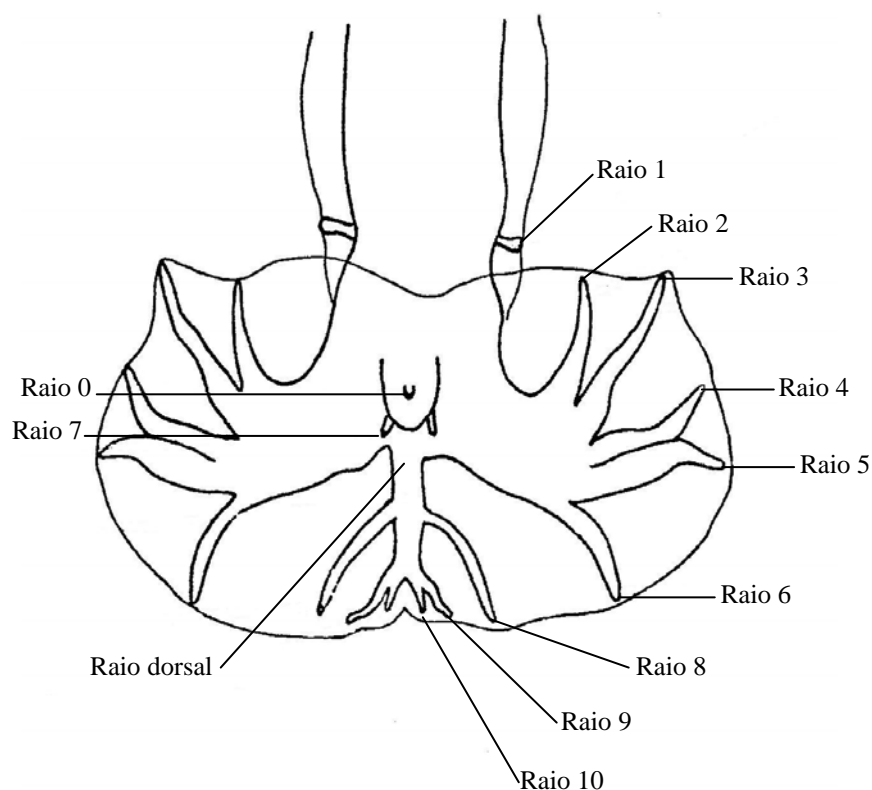


Figura 6: Esquema de uma bolsa copuladora com disposição dos raios do tipo 2-2-1 em visão ventral, mostrando o sistema de numeração dos raios da bolsa. Adaptada de Durette-Desset, 1971.

A família Ornithostrongylidae Durette-Desset & Chabaud, 1981, tem como características, lábios e cápsula bucal geralmente ausente (Vicente *et al.*, 1997), sínlofe formado por um conjunto de cristas cuticulares, sendo que duas são mais desenvolvidas formando a estrutura denominada de “carene”, apresenta o eixo de orientação frontal, quando o eixo passa pela “carene” (Fig. 7) ou sub-frontal, quando o eixo não passa pela “carene” (Durett-Desset & Digiani, 2005), bolsa copuladora com disposição dos raios no padrão 2-2-1, sendo os raios 2 e 3, 4 e 5 possuem a origem comum e raio 6 separado (Fig. 6). Fêmeas podem ser tanto monodelfas quanto didelfas (Vicente *et al.*, 1997).

Esta família compreende duas subfamílias: Inglamidinae Durette-Desset, Diaw & Murua, 1976 e Ornithostrongylinae Travassos, 1914. (Durette-Desset, 1983; 1985).

A subfamília Inglamidinae tem como caracteres taxonômicos: extremidade cefálica com cápsula bucal, dente esofágico dorsal e quatro lábios. Esta subfamília possui apenas o gênero *Inglamidum* Durette-Desset, Denke & Murua, 1976. (Durette-Desset, 1983; 1985).

A subfamília Ornithostrongylinae tem como caracteres taxonômicos. O aparelho reprodutor da fêmea é didelfo ou monodelfo, a bolsa copuladora possui distribuição dos raios no padrão 2-2-1 e sínlofe com eixo de orientação frontal ou sub-frontal. (Durette-Desset, 1983; 1985).

A subfamília Ornithostrongylinae compreende sete gêneros: *Ornithostrongylus* Travassos 1914, *Oswaldostrongylus* Lent & Freitas 1934, *Columbostrongylus* Puylaert, 1968, *Ornithonema* Travassos 1935, *Allintoshius* Chitwood, 1937 e *Vexillata* (Travassos, 1937) Durette-Desset, 1971. (Durette-Desset, 1983; 1985).

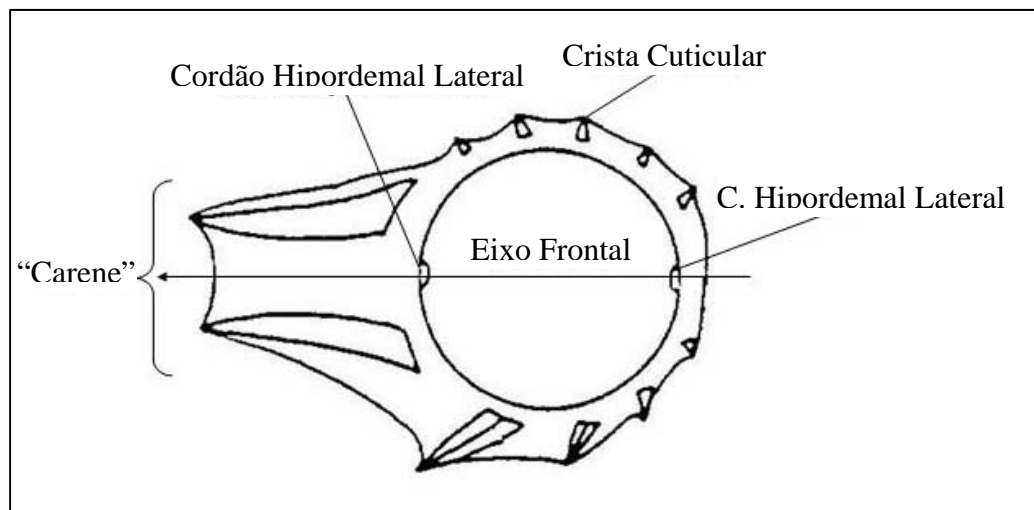


Figura 7: Esquema de um corte transversal mostrando os cordões hipodermis laterais, “carene”, cristas cuticulares e o sentido frontal do eixo de orientação. Adaptado de Durette-Desset, 1985.

1.9.3 Gênero *Vexillata*

Travassos (1937) faz uma revisão da família Trichostrongylidae na qual cria o subgênero *Vexillata*, no gênero *Longistriata* Schulz, 1926, cuja espécie tipo: *Longistriata* (*Vexillata*) *vexillata* (Hall, 1916) Travassos, 1937. Durette-Desset (1971) eleva o subgênero *Vexillata* a categoria de gênero baseando-se nas seguintes características: bolsa caudal sub-simétrica com lóbulos laterais bem desenvolvidos e lóbulo dorsal relativamente reduzido, raio 6 separado do 5, raio 8 delgado e espículos simples e finos.

O gênero *Vexillata* é parasita de roedores da superfamília Geomyidae (Durette-Desset, 1985; Gardner *et al.*, 1994; Falcón-Ordaz, Chen & Lamothe-Argumedo, 2006) e Leporidae (Digiani *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

- Identificar e re-descrever os nematóides coletados do intestino grosso dos marsupiais *Didelphis marsupialis* capturados na Colômbia e *Didelphis aurita* capturados na Mata Atlântica do Rio de Janeiro utilizando microscopias de luz (campo claro), interferencial diferencial Normaski (DIC) eletrônica de varredura.
- Analisar comparativamente as amostras coletadas em cada espécie de hospedeiro (*D. marsupialis* e *D. aurita*).
- Analisar morfológicamente e identificar especificamente o nematóide encontrado em *Clyomys laticeps* capturado no Pantanal Mato-grossense, com uso de microscopia de luz (campo claro) e contraste interferencial diferencial Normaski (DIC).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Hospedeiros

3.1.1 MARSUPIAIS

Os marsupiais da espécie *Didelphis marsupialis* foram capturados por colaboradores do Dr. Vernon Thatcher, no período entre 1964 a 1970 na região do Valle del Rio Melendez, Valle del Cauca, Colômbia (3° 25' 0" Norte e 76° 28' 60" Oeste).

Os marsupiais da espécie *Didelphis aurita* foram capturados pelo Dr. Marcus Vinicius Vieira e pela doutoranda Ana Claudia Delciellos, ambos da equipe do Laboratório de Vertebrados do Instituto de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro chefiado pelo Dr. Ruy Cerqueira Silva. A captura ocorreu no mês maio de 2007, em um fragmento da Mata Atlântica no município de Cachoeiras de Macacu (22° 17' 52,8" Sul e 41° 41' 53,5" Oeste), Rio de Janeiro, Brasil. Licença IBAMA: 099/06-RJ.

3.1.2 Roedores

Os roedores *Clyomys laticeps* foram capturados pela equipe do Dr Paulo Sergio D'Andrea, do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz, em expedição realizada ao Pantanal Sul-Mato-Grossense, Mato Grosso do Sul, Brasil.

A captura dos roedores se deu no período de julho de 2002 a agosto de 2005, nas Fazendas Rio Negro (19° 15' 01" Sul, 57° 01' 29" Oeste) na sub-região Aquidauana e Alegria

(19° 34' 54" Sul, 56° 14' 62" Oeste) na sub-região Nhecolândia. Licença do IBAMA: CGFAU\LIC 009\02, 032\02, 297\02 e 091\04,

3.2 Obtenção dos Parasitos

Os marsupiais coletados na Colômbia foram necropsiados e os nematóides coletados do intestino grosso foram fixados em AFA (Ácido acético glacial, formol 37% e álcool etílico 70%). Os nematóides coletados foram acondicionados em frascos contendo etanol glicerinado, devidamente etiquetados e passaram a integrar à coleção helmintológica do Dr. Vernon Thatcher, que posteriormente foram gentilmente cedidos a Dra. Reinalda Marisa Lanfredi, chefe do Laboratório de Biologia de Helminhos Otto Wucherer- IBCCF-UFRJ.

Os marsupiais capturados pelo Dr. Ruy Cerqueira e equipe, foram encaminhados ao Laboratório de Biologia de Helminhos Otto Wucherer, onde foram realizadas as necropsias. Os nematóides coletados do intestino grosso dos marsupiais foram lavados em solução salina (NaCl a 0,9%) e fixados em AFA.

Os roedores *Clyomys laticeps*, capturados pela equipe do Dr. Paulo D'Andrea foram necropsiados durante a expedição e os nematóides coletados do intestino delgado foram fixados em AFA e acondicionados em frascos individuais por hospedeiro, devidamente etiquetados e contendo o mesmo fixador. Os nematóides foram encaminhados para estudo no Laboratório de Biologia de Helminhos Otto Wucherer.

3.3 Microscopia de Campo Claro

Os nematóides fixados, como já mencionado, e foram clarificados e montados em lactofenol, entre lamínula e lâmina, para análise através do microscópio de luz (ML) Zeiss Standard 20, acoplado a câmara clara, para obtenção dos dados morfológicos e morfométricos.

Para os nematóides provenientes do roedor *C. laticeps* houve a necessidade de efetuar cortes transversais do corpo, para uma análise do sínlofe.

Os cortes foram realizados manualmente com auxílio de microscópio estereoscópico e lâmina de corte fino. Cada corte foi colocado delicadamente sobre uma lâmina de vidro e montado entre duas lamínulas e coberto por outra (Figura: 8).

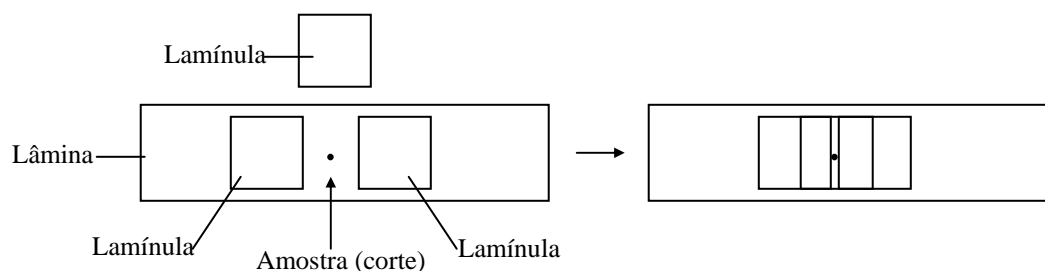


Figura 8: Esquema de montagem dos cortes transversais

3.4 Microscopia de Contraste Interferencial Diferencial Normaski

Após passarem pela microscopia de campo claro alguns espécimes foram selecionados para realização de fotomicrografia, para tanto não foi necessária nenhuma modificação no preparo previamente realizado para microscopia de campo claro. Os espécimes foram analisados com auxílio do microscópio Olympus BX 51, utilizando DIC, as imagens capturadas através da câmera digital Olympus DP 12.

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os espécimes após a fixação, como descrita anteriormente, foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 por três vezes de 10 minutos cada, após a lavagem seguiu-se a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% (OsO_4) e ferrocianeto de potássio a 0,8% ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) pH 7.2, por 40 minutos.

Após a pós-fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão utilizado acima e desidratação em uma série de etanol, de 30 a 100%, por uma hora cada, sendo a última concentração repetida por 3 vezes.

Após a desidratação em etanol, as amostras foram submetidas à secagem por meio do método do ponto crítico com CO_2 . Em seguida, foram montadas sobre um suporte metálico, específico para MEV, metalizadas com uma camada ouro de 20 nanômetros de espessura e observadas ao microscópio eletrônico Jeol JSM 5310.

4. RESULTADOS

4.1 *Cruzia tentaculata*

Geral: Machos e fêmeas com região anterior similar, apresentam na região anterior a abertura oral circundada por três lábios, um dorsal com um par de papilas laterais e dois latero-ventrais com uma papila e um anfídio cada (Figs. 9 , 10, 16 , 26 e 27), um par de estruturas dentiformes é encontrado na margem interna da cada lábio (Fig. 27). A cápsula bucal apresenta três colunas duplas serrilhadas, com dez pares de estruturas dentiformes com tamanho decrescente da anterior para posterior, que se projetam para o lúmen (Figs. 10 e 17). O esôfago é longo e apresenta uma pequena dilatação pré-bulbar e bulbo bem desenvolvido (Figs. 9, 16 e 19), o anel nervoso foi observado no final do primeiro quarto do esôfago (Figs. 9 e 16). O divertículo intestinal é projetado para região anterior, ultrapassando o bulbo esofagiano (Figs. 9 e 19). Os deirídeos são localizados sobre a linha lateral (Figs. 26 e 26a) e o poro excretor é ventral (Figs. 16, 18, 26 e 26b), ambos estão na porção anterior do corpo (Fig. 26). A cutícula ao longo do corpo é transversalmente estriada, mas nos lábios, em torno das papilas e anfídios, em ambos os sexos, e na região ventral dos machos, apresenta um padrão cuticular diferente (Figs. 27, 30 e 32).

Fêmea (medida tomada em quatro espécimes) - Fêmeas com corpo alongado medindo 11,40 - 12,20 mm de comprimento e 0,50 - 0,55 mm de largura; a cápsula bucal bem desenvolvida medindo 0,17 - 0,26 mm em comprimento; esôfago longo com uma pequena dilatação pré-bulbar e bulbo bem desenvolvido medindo 1,59 - 2,16 mm em comprimento (com o bulbo) e 0,09 - 0,14 mm em largura (sem o bulbo); bulbo medindo 0,25 - 0,27 mm de comprimento e 0,25 - 0,32 mm em largura; divertículo intestinal nítido e projetado para região

anterior medindo 0,39 - 0,45 mm em comprimento e 0,17 - 0,28 mm em largura; anel nervoso e poro excretor a 0,40 - 0,54 mm e 1,04 - 1,26 mm da extremidade anterior do corpo respectivamente. A abertura vulvar esta situada em torno do meio do corpo a 5,54 - 5,83 mm da extremidade posterior (Fig. 13) e apresenta 1 par de papilas em sua lateral (Figs. 28 e 28a). Nas fêmeas fecundadas foi observada deposição de *cementum*, pelo macho, na abertura vulvar (Fig. 28). O útero é anfidelfo e apresenta-se repleto de ovos nas fêmeas grávidas (Fig. 13), os ovos uterinos medem 0,1 - 0,13 mm em comprimento e 0,06 - 0,07 mm em largura (Fig. 15). A região posterior das fêmeas é afilada em forma cônica, nela esta presente a abertura anal situada a 0,69 - 1,04 mm da extremidade da cauda e 1 par de fasmídeos dispostos lateralmente (Figs. 14, 24 e 25).

Macho (medida tomada em quatro espécimes) - Corpo alongado curvado ventralmente na região da cauda, medindo 11,00 - 12,05 mm de comprimento e 0,53 - 0,65 de largura; a cápsula bucal é bem desenvolvida e mede 0,17 - 0,21 mm de comprimento; esôfago é longo, apresenta uma dilatação pré-bulbar e um bulbo bem desenvolvido medindo 2,07 - 2,32 mm (com o bulbo) em comprimento e 0,10 - 0,13 mm em largura (sem o bulbo), o bulbo mede 0,29 - 0,32 mm em comprimento e 0,27 - 0,33 em largura, o anel nervoso e o poro excretor estão a 0,48 - 0,55 e 1,18 - 1,30 mm da extremidade anterior respectivamente; o divertículo intestinal é nítido e voltado para região anterior medindo 0,37 - 0,42 mm em comprimento e 0,13-0,17 mm em largura. A região posterior dos machos é ventralmente curvada, posterior a abertura da cloaca, torna-se mais fina, no terço médio posterior toma forma cilíndrica e culmina em ponta aguda, nota-se também uma discreta asa caudal (Figs. 11, 12, 20, 23, 30, 31, 32 e 33). A região caudal possui 10 pares de papilas em forma de botão dispostas ventro-

lateralmente e com simetria, sendo três pares equidistantes sobre a asa caudal (Figs. 11, 12 e 30), 3 ad-cloacais (Figs. 11, 12, 23, 30, 32, 33 e 34) e 4 pós-cloacais, sendo que cada papila do primeiro par ventral esta associada a 1 fasmídio (Figs. 11, 12, 23, 31, 32, 33 e 33a), 2 pares laterais e um par anterior a ponta da cauda (Figs. 20, 23, 31 e 33). A abertura da cloaca está a 0,15 - 0,18 mm da extremidade caudal e possui uma papila única sobre o lábio anterior (Fig. 34). O gubernáculo tem forma triangular (Figs. 11, 12, 20, 21, 22, 34 e 37) e mede 0,16 - 0,19 mm de comprimento. Os espículos são similares, longos e côncavos (Figs. 11, 12, 21, 32, 33, 34, 35, 36) medindo 0,89 - 0,96 mm em comprimento. Transversalmente os espículos apresentam aspecto poroso e um canal ao longo da porção dorsal (Fig. 35).

Não foram observadas diferenças morfológicas ou morfométricas entre os espécimes brasileiros e colombianos. As análises morfológicas feitas neste trabalho permitiram caracterizar o nematóide e incluí-lo na seguinte classificação taxonômica:

Filo: Nematoda

Classe: Secernentea

Ordem: Oxyurida

Superfamília: Oxyuroidea

Família: Cruzidae

Gênero: *Cruzia*

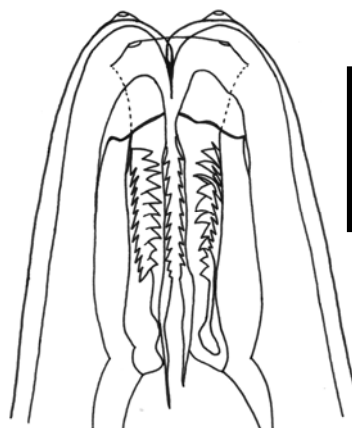
Espécie: *Cruzia tentaculata*

Figs. 9 – 12. Microscopia de campo claro de *Cruzia tentaculata* macho. Fig. 9. Região anterior mostrando cápsula bucal (C), anel nervoso (A), esôfago (E) com dilatação pré-bulbar (Db) bulbo esofagiano (B) e divertículo intestinal (Dv) (Barra: 0,5 mm). Fig. 10. Detalhe da região anterior mostrando os lábios látero-ventrais (Lv) com anfídios (Af), lábio dorsal (Ld) com papilas (P) e a cápsula bucal (C) com 3 colunas com uma dupla fileira de projeções serrilhadas (Barra: 0,1 mm). Fig. 11. Visão lateral da região posterior mostrando 1 par de espículos (E) e gubernáculo (G), asa caudal com 3 papilas pré-cloacais (Ppc) eqüidistantes, cloaca com parte do espículo exteriorizado, 3 papilas ad-cloacais (Pa), 4 papilas post-cloacais (Pp) e fasmidio (F) (Barra: 0,1 mm). Fig. 12. Visão ventral da região posterior mostrando 1 par de espículos, gubernáculo triangular, 3 pares de papilas pré-cloacais (Ppc), abertura cloacal (Ac), 3 pares de papilas ad-cloacais (Pa) e 4 pares de papilas post-cloacais e 1 par de fasmídios (Pp) (Barra: 0,1 mm).

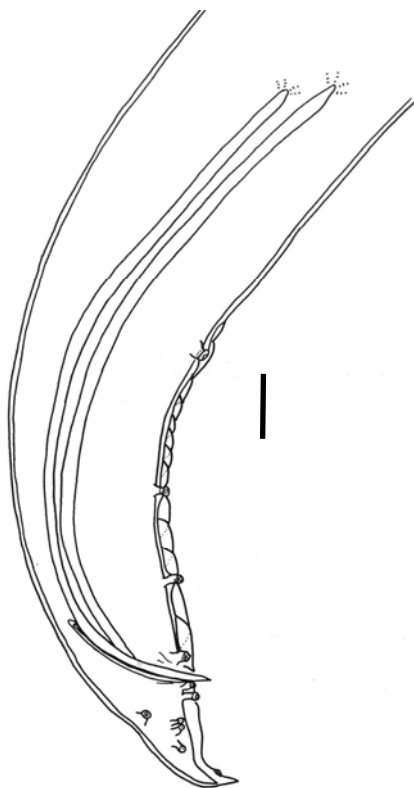
9



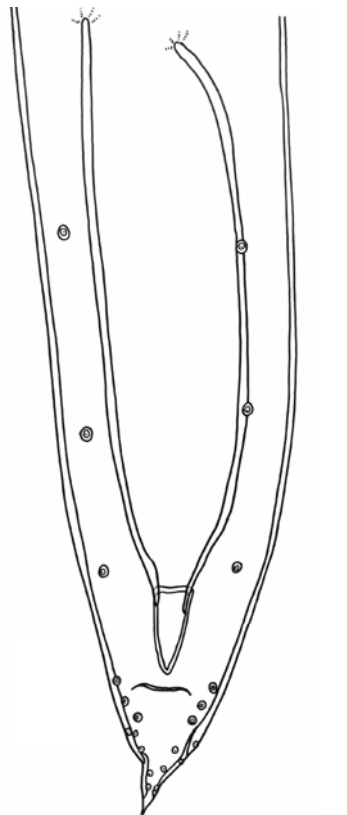
10



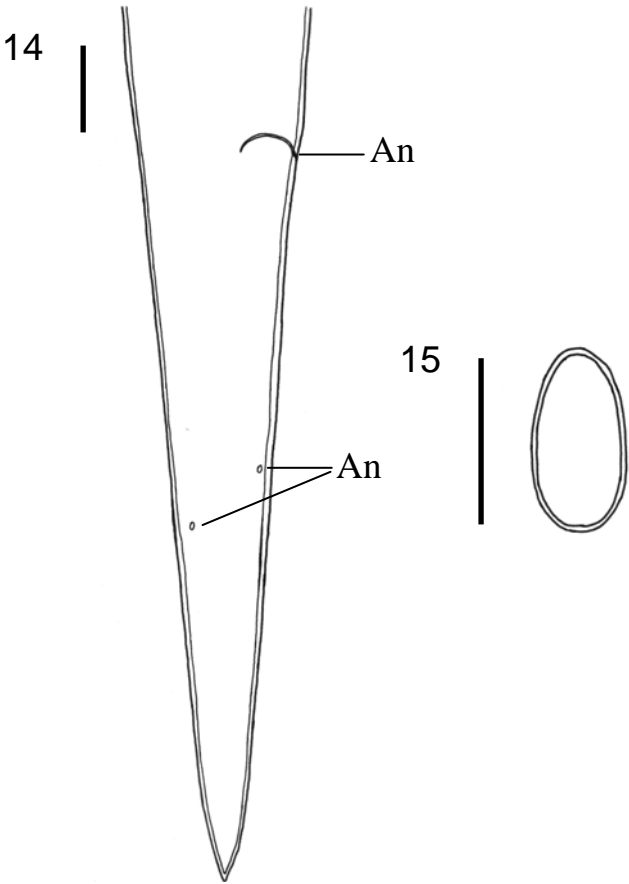
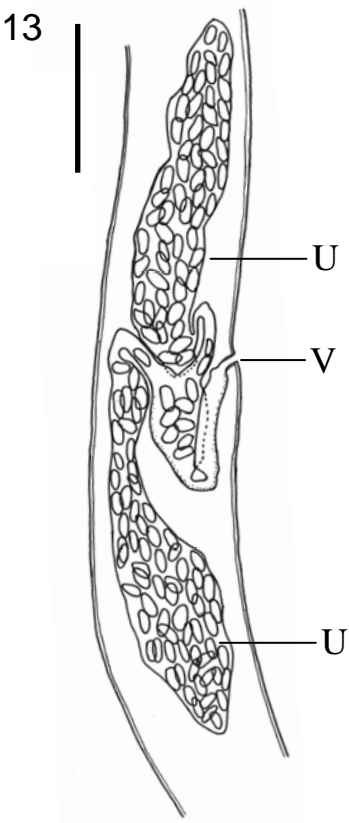
11



12



Figuras 13 – 15. Microscopia de campo claro de *Cruzia tentaculata*, fêmea. Fig. 13. Região mediana do corpo mostrando vulva (Vu) e útero com ovos (U) (Barra: 0,5 mm). Fig. 14. Cauda mostrando o ânus (An) e o par de fasmídios (F) (Barra: 0,1 mm). Fig. 15. Ovo (Barra: 0,1 mm).



Figuras 16 – 19. Microscopia de contraste diferencial interferencial (DIC) e de campo claro de *Cruzia tentaculata* macho. Fig. 16. Região anterior mostrando a cápsula bucal (Cb), anel nervoso (An) parte do esôfago (Es), poro excretor (Pe) e o divertículo intestinal (Dv) (Barra: 200 µm). Fig. 17. Detalhe da cápsula bucal mostrando 2 das 3 colunas de estruturas serrilhadas (setas) (Barra: 20 µm). Fig. 18. Detalhe mostrando o poro excretor (Pe) (Barra: 20 µm). Fig. 19. Detalhe da junção esôfago intestino, do divertículo intestinal (Dv) projetado para anterior, da dilatação pré-bulbar (Dpb) do esôfago (Es) e do bulbo (B) (Barra: 200 µm).

