

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

Ellen de Carvalho

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Centrosema coriaceum* BENTH. (FABACEAE) SOBRE
NEMATOIDES ADULTOS DE *Parapharyngodon binae* PEREIRA, SOUSA &
SOUZA LIMA, 2010 E *Physaloptera* sp., PARASITOS DE *Tropidurus torquatus*
(WIED, 1820) (SQUAMATA: TROPIDURIDAE) E DEFINIÇÃO DE PADRÕES
MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS PARA OVOS E LARVAS DE *P. binae***

Juiz de Fora

2016

Ellen de Carvalho

Avaliação da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Centrosema coriaceum* Benth. (Fabaceae) sobre nematoides adultos de *Parapharyngodon binae* Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 e *Physaloptera* sp., parasitos de *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata: Tropiduridae) e definição de padrões morfológicos e morfométricos para ovos e larvas de *P. binae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Bernadete Maria de Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Carvalho, Ellen.

Avaliação da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Centrosema coriaceum* Benth. (Fabaceae) sobre nematóides adultos de *Parapharyngodon binae* Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 e *Physaloptera* sp., parasitos de *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata: Tropiduridae) e definição de padrões morfológicos e morfométricos para ovos e larvas de *P. binae* / Ellen de Carvalho. -- 2016.

72 f. : il.

Orientadora: Bernadete Maria de Sousa

Coorientadora: Rodrigo Luiz Fabri

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2016.

1. Nematoda. 2. *Centrosema*. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Histologia. 5. Extrato bioativo. I. Sousa, Bernadete Maria de, orient. II. Fabri, Rodrigo Luiz, coorient. III. Título.

Ellen de Carvalho

Avaliação da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Centrosema coriaceum* Benth. (Fabaceae) sobre nematoides adultos de *Parapharyngodon bainae* Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 e *Physaloptera* sp., parasitos de *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata: Tropiduridae) e definição de padrões morfológicos e morfométricos para ovos e larvas de *P. bainae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Bernadete Maria de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Fabiano Matos Vieira
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof^a Dr^a Sueli de Souza Lima
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Aos meus pais pela dedicação, esforço e amor incondicional, meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva a mim concedida, e por tornar possível essa conquista.

Aos meus pais, pela confiança e dedicação, as minhas irmãs Karen e Vanessa pelo incentivo e companheirismo, ao irmão Robson meu exemplo de profissional competente e ético, e aos meus sobrinhos Caio e Davi, por tornar meus dias radiantes.

À minha orientadora Prof^ª Dr^ª Bernadete Maria de Sousa, pela oportunidade ímpar, amizade e confiança a mim depositada.

Ao Prof. Dr. Fabiano Matos Vieira, pela disponibilidade, orientação e dedicação.

À Prof^ª Dr^ª Sueli de Souza Lima, pelos ensinamentos e contribuições.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri pela orientação, auxílio e incentivo.

À Prof^ª Dr^ª Fátima Regina Gonçalves Salimena, pelas contribuições e disponibilidade.

Ao Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Helminhos - Odile Bain pelo suporte dado nos estudos helmintológicos.

Aos amigos do Laboratório de Herpetologia – Répteis, pela colaboração, companheirismo e consideração, por todo esse período.

Aos amigos do mestrado pela amizade e contribuições.

Aos meus amigos, por tornar meus dias mais leves.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade e estrutura oferecida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia e Comportamento Animal, pela e oportunidade de realização do estudo.

À CAPES, pelo fomento para a pesquisa.

LISTA DE TABELAS

- Tabela I-** Características morfométricas dos estágios de desenvolvimento dos ovos de *Parapharyngodon binae* cultivados em laboratório.....**60**
- Tabela II-** Parâmetros mensurados de Temperatura e Umidade relativa das coproculturas de fezes de *Parapharyngodon binae* cultivados em laboratório, no período de 36 dias.....**61**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1:** *Parapharyngodon bainae* - Microscopia eletrônica e varredura da região anterior das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. c. grupo tratado 2 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*..... **26**
- Figura 2:** *Parapharyngodon bainae* - Microscopia eletrônica e varredura da região caudal das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. c. grupo tratado 2 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.....**27**
- Figura 3:** *Parapharyngodon bainae* - Microscopia eletrônica e varredura da superfície externa da cutícula das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. c. grupo tratado 2 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.....**28**
- Figura 4:** *Parapharyngodon bainae*. - fotomicrografias de seções histológicas da parede corporal de fêmeas adultas, corados em hematoxilina-eosina (H.E.). a. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. c. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. d. grupo tratado 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. e. grupo tratado com 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. f. grupo tratado com 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. g. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. h. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. i. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*.....**30**
- Figura 5:** *Physaloptera* sp. - Microscopia eletrônica e varredura da região anterior das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina c. grupo tratado com 1 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 2mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. e. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.....**32**
- Figura 6:** *Physaloptera* sp. - Microscopia eletrônica e varredura da cauda das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina c. grupo

tratado com 2mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.d. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.....33

Figura 7: *Physaloptera* sp. - Microscopia eletrônica e varredura de parte da superfície externa da cutícula das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina c. grupo tratado com 1 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 2mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. e. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.....34

Figura 8: *Physaloptera* sp. - fotomicrografias de secções histológicas da parede corporal de fêmeas adultas, corados em hematoxilina-eosina (H.E.). a. controle solução salina 0,9%. b. controle solução salina 0,9% c. controle salina0,9%. d. controle DMSO 10% diluído em solução salina0,9%. e. controle DMSO 10% diluído em solução salina0,9%. f. grupo tratado com 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*.....36

Figura 9: *Physaloptera* sp. - fotomicrografias de secções histológicas da parede corporal de fêmeas adultas, corados em hematoxilina-eosina (H.E.). a. grupo tratado 1 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. b. grupo tratado 1 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. c. grupo tratado 1 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. d. grupo tratado 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. e. grupo tratado com 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. f. grupo tratado com 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*.g. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. h. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. i. grupo tratado com3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*.....37

CAPÍTULO II

Figura 1: Estágio de desenvolvimento para ovos de *Parapharyngodon binae*. Em a - estágio de mórula, b – estágio de blástula, c, d – estágio de gástrula, e – estágio girinoide, f – estágio de larva L1, fotografados em microscopia de luz DIC53

Figura 2: Estágio de Mórula para ovos de *Parapharyngodon binae*, fotografados em microscopia de luz . a, b, c – estágio inicial de clivagem com 6-8 células; d até g, – estágio

inicial de clivagem com 10-12 células; h – estágio inicial de clivagem maior que 12 células.....	54
Figura 3: Estágio de blástula para ovos de <i>Parapharyngodon binae</i> , fotografados em microscopia de luz. a até e – estágio inicial da blástula; f até h – estágio de transição de Blástula para início da Gástrula.....	55
Figura 4: Estágio de gástrula para ovos de <i>Parapharyngodon binae</i> , fotografados em microscopia de luz c, e, f, i, j - estágios iniciais da gastrulação, a, b, d, g, h - estágio de transição da gastrulação para o estágio girinoide.....	56
Figura 05: Estágio girinoide para ovos de <i>Parapharyngodon binae</i> , fotografados em microscopia de luz. Em a, b – estágio girinoide, c – Transição do estágio girinoide para o estágio larva L1.....	57
Figura 06: Estágio larva L1 para ovos de <i>Parapharyngodon binae</i> , fotografados em microscopia de luz. Em a, d, e – estágio de larva L1; b, c, f – estágio de transição de larva L1 para Larva L2, com região do esôfago evidente.....	58
Figura 07: Ovos de <i>Parapharyngodon binae</i> . a. ovo contendo larva de segundo estágio (L2). b. ovo contendo larva de segundo estágio (L2). c. ovo contendo larva de terceiro estágio (L3).).....	59
Figura 08: Porcentagem dos estágios de desenvolvimento de ovos de <i>Parapharyngodon binae</i> , durante 36 dias, em temperatura média de 23,4°C e umidade relativa média de 67,8%.....	62

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
Capítulo I - Estudo <i>in vitro</i> da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico das folhas de <i>Centrosema coriaceum</i> Benth. (Fabaceae) em adultos <i>Parapharyngodon binae</i> Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 (Nematoda: Oxyuroidea) e <i>Physaloptera</i> sp. (Nematoda: Physalopteridae), parasitos gastrointestinais de <i>Tropidurus torquatus</i> (Wied, 1820) (Squamata: Tropiduridae).....	17
Resumo	17
Abstract	19
I. Introdução	20
II. Materiais e Métodos	21
1. Coleta de folhas de <i>Centrosema coriaceum</i> Benth. (Fabaceae).....	21
2. Preparação do extrato vegetal.....	21
3. Preparo das concentrações para os testes de atividade anti-helmíntica.....	21
4. Coleta dos hospedeiros.....	22
5. Coleta dos nematoides.....	22
6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	23
7. Processamento histológico dos nematoides.....	24
8. Identificação dos nematoides.....	24
III. Resultados	25
1. Tempo de inibição.....	25
2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	25
3. Microscopia eletrônica de varredura em <i>P. binae</i>	25
4. Histologia da parede corporal dos adultos de <i>P. binae</i>	29
5. Microscopia eletrônica de varredura em <i>Physaloptera</i> sp.....	31

6.	Histologia da parede corporal dos adultos de <i>Physaloptera</i> sp.....	35
IV.	Discussão	38
V.	Conclusão	40
VI.	Referência Bibliográfica	41

Capítulo II - Desenvolvimento de ovos de *Parapharyngodon binae* Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 (Oxyuroidea, Pharyngodonidae) obtidos de *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata, Tropiduridae), Minas Gerais, Brasil.....

	Resumo	46
	Abstract	47
I.	Introdução	48
II.	Material e Métodos	49
1.	Coleta dos hospedeiros.....	49
2.	Coleta do material fecal, análise e identificação dos ovos.....	50
3.	Necropsia e identificação dos helmintos adultos.....	51
III.	Resultados	52
1.	Caracterização morfológica e morfométrica dos estágios de desenvolvimento de ovos de <i>P. binae</i>	52
2.	Estágio de Mórula.....	54
3.	Estágio de blástula.....	55
4.	Estágio de Gástrula.....	55
5.	Estágio de Girinoide.....	57
6.	Estágio de larva L1.....	57
7.	Estágio de larva L2.....	58
8.	Estágio de larva L3.....	59
9.	Morfometria dos estágios de desenvolvimento de <i>P. binae</i>	59
10.	Desenvolvimento de ovos de <i>P. binae</i>	61
IV.	Discussão	62

V.	Referências Bibliográficas.....	66
-----------	--	-----------

RESUMO

Objetivou-se verificar a bioatividade do extrato etanólico de folhas de *Centrosema coriaceum* contra nematoides gastrointestinais adultos de *Parapharyngodon binae* e *Physaloptera* sp., parasitos de lagartos silvestres *Tropidurus torquatus*, provenientes de uma área de afloramento rochoso no estado de Minas Gerais. Para isso, inicialmente as folhas secas de *C. coriaceum* foram extraídas por maceração estática com etanol para obter o extrato etanólico. O extrato nas concentrações de 3 mg/mL, 2 mg/mL e 1 mg/mL foram aplicados em indivíduos adultos das espécies de *P. binae* e *Physaloptera* sp., recém coletados dos hospedeiros, separadamente. Houve completa imobilização dos parasitos tratados em relação aos controles após 2 horas para *P. binae* e após 6 horas, redução da mobilidade para *Physaloptera* sp., permanecendo vivos os parasitos do grupo controle para ambas espécies. Os nematoides expostos as concentrações de 3 mg/mL e 2 mg/mL apresentaram alterações morfológicas significativas com completo descolamento e desestruturação do tegumento em relação a cutícula, quando comparadas ao controle, em análises por microscopia eletrônica de varredura. Cortes histológicos transversais da porção média do corpo dos helmintos adultos, corados com hematoxilina e eosina, de ambas as espécies, nas concentrações de 3 mg/mL e 2 mg/mL, evidenciaram descolamento total da subcutícula em relação a cutícula quando comparado ao controle, comprovando eficácia do extrato de *C. coriaceum* como agente anti-helmíntico, nas concentrações testadas. Para testes *in vitro*, adicionalmente foi determinado as fases de desenvolvimento das formas de vida livre para *P. binae* até o surgimento da larva L3, através de metodologia adaptada de coprocultura, com padronização morfológica e morfométrica para cada fase, constituindo primeiro relato em literatura para biologia do desenvolvimento de Oxyuridae de hospedeiros silvestres. Estes resultados permitem concluir que o uso do extrato das folhas de *C. coriaceum* em nematoides adultos tem efeito anti-helmíntico e estudos futuros são necessários para avaliação dos efeitos *in vitro* nos estágios de vida livre de *P. binae*.

Palavras-chave: Nematoda, histologia, microscopia eletrônica de varredura, extrato bioativo

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the bioactivity of the ethanolic extract of *Centrosema coriaceum* leaves against gastrointestinal nematodes of adult *Parapharyngodon bainae* and *Physaloptera* sp. parasites of wild lizards *Tropidurus torquatus*, from an area of rocky outcrops in the state of Minas Gerais. For this, first the dried leaves of *C. coriaceum* were extracted by static soaking with ethanol to obtain the ethanolic extract. The extract was at concentrations of 3 mg/ml, 2 mg/ml and 1 mg/ml. They were applied in adults of the species *P. bainae* and *Physaloptera* sp., which were freshly collected from hosts separately. There was complete immobilization of parasites treated, being compared to controls after 2 hours for *P. bainae* and after 6 hours for *Physaloptera* sp., which had the mobility reduced, staying alive the parasites of the control group for both species. The nematodes exposed to concentrations of 3 mg/mL and 2 mg/mL showed significant morphological changes with complete detachment and disruption of the integument over the cuticle, when compared to the control. Transverse histological sections of the middle portion of the body of adult helminths was produced and stained with hematoxylin and eosin, from both species at concentrations of 3 mg/ml and 2 mg/ml. They showed complete detachment of *hypodermis* regarding cuticle compared to the control, proving the effectiveness of the extract of *C. coriaceum* as an anthelmintic agent, in the tested concentrations. For *in vitro* tests, it was further determined phases of the development of free forms of life of *P. bainae* until the emergence of L3 larvae, through adapted coprocultures methods, with morphological and morphometric standardization for each phase, being first reported in the literature for Oxyuridae developmental biology of wild hosts. These results suggest that the use of leaves extract to *C. coriaceum* in adult nematodes has anthelmintic effect and, therefore, further studies are needed to evaluate the effects on free form of life stages of *P. bainae in vitro*.

key words: Nematoda, histology, screening electronic microscopy, bioactive extract

INTRODUÇÃO GERAL

Os répteis atuais são representados pelos clados Testudines, Archosauria e Lepidosauria, e inclui 9.300 espécies, sendo que 5.461 espécies são lagartos (ROCHA-BARBOSA et al., 2015). No Brasil, a Ordem Squamata Opperl, 1811 possui 773 espécies registradas e deste total, 42 espécies são da família Tropiduridae Bell in Darwin, 1843 (COSTA e BÉRNILS, 2016). De modo geral, os lagartos apresentam ampla diversidade etológica, morfológica e fisiológica, sendo considerados organismos modelo para estudos ecológicos e comportamentais, em relação às demais espécies de répteis (HUEY et al., 1983; BERGALLO e ROCHA, 1994; PIANKA e VITT, 2003).

Dentre as interações ecológicas e comportamentais entre espécies de animais silvestres, os estudos que envolvam a relação parasita-hospedeiro são fundamentais na reconstrução e compreensão das teias alimentares (LAFFERTY et al., 2008), uma vez que o parasito exerce uma forte influência sobre a dinâmica populacional de seus hospedeiros, seja diretamente através do controle populacional e como fator adaptativo promovendo alterações fenotípicas nas espécies parasitadas, ou indiretamente interferindo nas relações ecológicas que seus hospedeiros estabelecem com outras espécies de seu hábitat (POULIN, 1999).

A espécie *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata: Tropiduridae) é um lagarto de hábitos diurnos, terrestre, arborícola e saxícola, de relativa abundância no Brasil e habita áreas abertas do litoral e interior do continente, geralmente em grandes densidades (RODRIGUES, 1987; BERGALLO e ROCHA, 1994). Apresentam hábito alimentar oportunístico e generalista, com dieta composta principalmente de pequenos artrópodes e material vegetal (SIQUEIRA et al., 2010; GOMIDES et al., 2013; PIETCZAK et al., 2013) e pela plasticidade de forrageio, constituem potenciais hospedeiros de diversas espécies de nematoides gastrointestinais, em destaque para os gêneros *Parapharyngodon* Chatterji, 1933 (Oxyuroidea, Pharyngodonidae) e *Physaloptera* (Rudolphi, 1918) (Spirurida: Physalopteridae) (AHO, 1990; ÁVILA e SILVA, 2010; ANJOS et al., 2013).

Em estudo realizado em um afloramento rochoso no estado de Minas Gerais, Sudeste Brasil, foi observado que partes de flores de *Centrosema coriaceum* Benth. (Fabaceae) são os principais itens vegetais ingeridos por *T. torquatus*, sendo que volume e a presença deste componente na dieta dos lagartos correlacionou-se negativamente com a abundância de nematóides do gênero *Physaloptera* sp. (Nematoda: Physalopteridae) presentes no estômago e

Parapharyngodon binae Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 (Nematoda: Oxyuroidea) presentes no ceco intestinal dos hospedeiros (PEREIRA et al., 2012). Estas observações podem servir de indícios de que *C. coriaceum* apresente produtos biotivos com ação anti-helmíntica. Entretanto, a forma como esses compostos atuam nos nematoides adultos e se são ativos nas fases de vida livre dos mesmos é desconhecida.

O objetivo deste estudo foi verificar se existe influência do extrato etanólico de *C. coriaceum* sobre nematoides gastrointestinais parasitos de *T. torquatus*, bem como avaliar como o extrato atua na morfologia desses parasitos tratados em diferentes concentrações do extrato vegetal, por meio de análise qualitativa dos ensaios *in vitro* utilizando microscopia eletrônica de varredura e histologia. Teve ainda como objetivo estudar a biologia dos estágios de vida livre de *P. binae* através de descrição morfológica e morfométrica dos ovos.

REFERÊNCIAS

AHO, J. M. Helminth communities of amphibians and reptiles: comparative approaches to understanding patterns and processes. In: ESCH, G.W., A.O. BUSCH, and J. M. AHO (Eds) **Parasite Communities: Patterns and Processes**, New York, Chapman & Hall, 157-195, 1990.

ANJOS, L. A.; AVILA, R. W.; RIBEIRO, S. C.; ALMEIDA, W. O.; DA SILVA, R. J. Gastrointestinal nematodes of the lizard *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of helminthology**, v. 81, p. 443-449, 2013.

ÁVILA R.; SILVA R. Checklist of helminths from lizards and amphisbaenians (Reptilia: Squamata) of South America. **Journal Venom Animal Toxins Include Tropical Disease**, v. 16, p. 543-572, 2010.

BERGALLO, H. G ; ROCHA, C. F. D. Spatial and trophic niche differentiation in two sympatric lizards (*Tropidurus torquatus* and *Cnemidophorus ocellifer*) with different foraging tactics. **Australian Journal of Ecology** v. 19, p. 72–75, 1994.

COSTA, H. C. & BÉRNILS, R. S. (org.). **Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2015-03-Repteis.pdf>>. Acessado em: 15 de fev. 2016.

GOMIDES, S. C.; RIBEIRO, L. B.; PETERS, V. M.; SOUSA, B. M. Feeding and reproduction ecology of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in a rock outcrop area in southeastern Brazil. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 86, p. 137-151, 2013.

HUEY, R. B.; PIANKA, E. R.; SCHOENER, T. W. **Lizard ecology: studies on a model organism**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 501 p, 1983.

LAFFERTY, K. D.; ALLESINA, S.; ARIM, M.; BRIGGS, C. J.; LEO, G.; DOBSON, A.

P.; DUNNE, J. A.; JOHNSON, P. T. J.; KURIS, A. M.; MARCOGLIESE, D. J.; MARTINEZ, N. D.; MEMMOTT, J.; MARQUET, P. A.; MCLAUGHLIN, J. P.; MORDECAI, E. A.; PASCUAL, M.; POULIN, R.; THIELTGES, D. W. Parasites in food webs: the ultimate missing links. **Ecology Letters**, v. 11, p. 533-546, 2008.

PEREIRA, F. B.; GOMIDES, S. C.; SOUSA, B. M.; DE SOUZA LIMA, S.; LUQUE, J. L. The relationship between nematode infections and ontogeny and diet of the lizard *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata: Tropiduridae) from the Atlantic Rainforest in south-eastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2012.

PIANKA, E. R.; VITT, L. J. **Lizards: Windows to the evolution of diversity**. University of California Press, Berkeley, 333p., 2003.

PIETCZAK, C.; DE ARRUDA, J. L. S. e CECHIN, S. Z. Frugivory and seed dispersal by *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in southern Brazil. **The Herpetological Journal**, v. 23, p. 75-79, 2013.

POULIN, R. The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels? **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 903-914, 1999.

ROCHA-BARBOSA, O.; LOGUERCIO, M. F. C.; VASCONCELLOS, F. M.; LINS, G. A.; NOVELLI, I. A.; HOHL, L. S. L. Reptilia. In: E. *Benedito*. (Org.). **Biologia e Ecologia dos Vertebrados**. 1ed. Rio de Janeiro: Roca, v. 1, p. 142-172, 2015.

RODRIGUES, M.T. 1987. **Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao Sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae)**. Arquivos de Zoologia 31:105–230.

SIQUEIRA, C. C.; KIEFER, M. C.; SLUYS, M. V.; ROCHA, C. F. D. Plant consumption in coastal populations of the lizard *Tropidurus torquatus* (Reptilia: Squamata: Tropiduridae): how do herbivory rates vary along their geographic range? **Journal of Natural History**, v. 45 p.171-182, 2010.

CAPÍTULO I

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Centrosema coriaceum* Benth. (FABACEAE) EM ADULTOS DE *Parapharyngodon binae* Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 (NEMATODA: OXYUROIDEA) E DE *Physaloptera* sp. (NEMATODA: PHYSALOPTERIDAE) PARASITOS GASTROINTESTINAIS DE *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (SQUAMATA: TROPIDURIDAE)

RESUMO

Evidências quanto à automedicação em animais silvestres constitui medida comportamental adotada por animais parasitados para amenizar ou combater os efeitos da infecção. Em especial, as plantas produzem metabólitos secundários a partir de metabólitos primários, os quais desempenham um papel fundamental nas suas interações de defesa, e parte destes possui atividade terapêutica. Objetivou-se verificar a bioatividade do extrato etanólico de folhas de *Centrosema coriaceum* contra nematoides gastrointestinais adultos de *Parapharyngodon binae* e *Physaloptera* sp., parasitos de *Tropidurus torquatus*, provenientes de uma área de afloramento rochoso no estado de Minas Gerais. O extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*, nas concentrações de 3 mg/mL, 2 mg/mL e 1 mg/mL, foi aplicado em indivíduos adultos das espécies de *P. binae* e *Physaloptera* sp., recém coletados dos hospedeiros, separadamente. Houve completa imobilização dos parasitos tratados em relação aos controles após 120 minutos para *P. binae* e para *Physaloptera* sp. todos os parasitos tratados permaneceram vivos, com diminuição da mobilidade, após 360 minutos sendo que ambos os parasitos do grupo controle permaneceram vivos e ativos. Os nematoides expostos as concentrações de 3 mg/mL e 2 mg/mL apresentaram alterações morfológicas significativas com completo descolamento e desestruturação do tegumento em relação a cutícula, quando comparadas ao controle, em análises por microscopia eletrônica de varredura. Cortes histológicos transversais da porção média do corpo dos helmintos adultos, corados com hematoxilina e eosina, de ambas as espécies nas concentrações de 3 mg/mL e 2 mg/mL evidenciaram descolamento total da subcutícula em relação a cutícula quando comparado ao

controle. Estes resultados permitem concluir que o uso do extrato das folhas de *C. coriaceum* em nematoides adultos tem ação anti-helmíntica.

Palavras-chave: Automedicação, Microscopia eletrônica de varredura, histologia, Nematoda.

CHAPTER I

IN VITRO ANTHELMINTIC ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Centrosema coriaceum* Benth. (FABACEAE) LEAVES AGAINST ADULT GASTROINTESTINAL NEMATODE PARASITE, *Parapharyngodon binae* Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 (NEMATODA: OXYUROIDEA) AND *Physaloptera* sp. (NEMATODA: PHYSALOPTERIDAE), OF *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (SQUAMATA: TROPIDURIDAE)

ABSTRACT

Evidence for self-medication in wild animals is behavioral measure by infected animals to minimize or counter the effects of infection. In particular, plants produce secondary metabolites from primary metabolites which play a key role in their defense interactions, and part has therapeutic activity. The objective of this study was to verify the bioactivity of the ethanolic extract of *Centrosema coriaceum* against gastrointestinal nematodes adult of *Parapharyngodon binae* and *Physaloptera* sp., from *Tropidurus torquatus*, from an area of rocky outcrops in the state of Minas Gerais. The ethanolic extract of the leaves of *C. coriaceum* at concentrations of 3 mg/ml, 2 mg/ml and 1 mg/ml was applied to adult individuals of the species *P. binae* and *Physaloptera* sp., collected from the host. There were complete immobilization of parasites treated compared to controls after 120 minutes for *P. binae* and *Physaloptera* sp. all treated parasites remained alive, with decreased mobility, after 360 minutes while parasites of control group remained alive and active. Analysis by scanning electron microscopy showed that the nematodes exposed to concentrations of 3 mg/mL and 2 mg/mL have significant morphological changes with complete detachment and disruption of the integument over the cuticle, when compared to the control. Transverse histological sections of the middle portion of the body of the adult helminths, stained with hematoxylin and eosin, at concentrations of 3 mg/ml and 2 mg/ml, revealed that both species had complete detachment of the cuticle when compared to the control. These results indicate that the use of the extract from the leaves of *C. coriaceum* in adults nematodes has anthelmintic action.

Keywords: self-medication, scanning electron microscopy, histology, Nematoda.

INTRODUÇÃO

Plantas com propriedades medicinais têm sido utilizados por povos indígenas durante séculos para tratamento de uma variedade de patologias, incluindo as doenças causadas por parasitos, em animais e seres humanos (HAMMOND et al., 1997; WALLER et al., 2001; MULLER e MECHLER, 2005). A fim de minimizar efeitos deletérios do parasitismo, o hospedeiro exhibe mecanismos comportamentais de evitação, como evitar o forrageio em áreas contaminadas e selecionar alimentos que aumentem a resistência imunológica ou que contenham ação anti-helmíntica (LOZANO 1998; HUFFMAN et al., 2003). Ao considerar que as plantas produzem metabólitos secundários como mecanismos de defesa contra a herbivoria, autores sugerem que o consumo destes vegetais constitui medida comportamental adotada por animais parasitados para amenizar ou combater os efeitos da infecção (GLANDER, 1994; HUFFMAN, 1996; HUFFMAN et al. 1997).

A automedicação através da ingestão ou aplicação tópica de plantas por animais foi observado e descrito para diversas espécies incluindo ovinos, abelhas e primatas (HUFFMAN et al., 1996; 1997; FOWLER et al, 2007; LISONBEE, 2009; SIMONE-FINSTROM E SPIVAK, 2012). Em estudos de dieta, prevalência e intensidade parasitária de nematóides gastrointestinais de lagartos da espécie *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata, Tropiduridae), provenientes de um afloramento rochoso na localidade de Toledos, no município de Juiz de Fora, no estado de Minas Gérias, Brasil, Pereira et al. (2012) constataram que ocorria uma diminuição significativa na intensidade parasitária de duas espécies de nematoides parasitos de estômago e ceco intestinal na população de lagartos que havia ingerido partes da planta da espécie *Centrosema coriaceum* Benth. (Fabaceae), fato que indica uma possível atividade anti-helmíntica dessa planta.

O gênero *Centrosema* compreende 35 espécies herbáceas de leguminosas e os principais componentes bioquímicos produzidos por plantas deste gênero são flavonoides, isoflavonas, taninos e taninos condensados (WILLIAMS e CLEMENTS, 1990; TOSTES et al., 1997; DA SILVA et al., 2000). A espécie *C. coriaceum* é um subarbusto de ocorrência em Cerrado, mata e campo rupestre no Bioma Cerrado no Sudeste do Brasil, conhecida popularmente como Jequitirana, reconhecida pelos folíolos coriáceos, fruto falcado e corola rósea, floresce de janeiro a maio e frutifica de fevereiro a maio (BARBOSA-FEVEREIRO, 1977; MENDONÇA, 1998).

O objetivo deste estudo foi analisar a ação de diferentes concentrações do extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum* na morfologia dos nematoides *Physaloptera* sp. (Spirurida, Physalopteridae) e *Parapharyngodon bainae* Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 (Oxyurida, Oxyuroidea), parasitos gastrointestinais de *T. torquatus* coletados na região de Toledos, município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DE FOLHAS DE *Centrosema coriaceum* Benth. (Fabaceae)

As partes aéreas de *Centrosema coriaceum* foram coletadas no distrito de Toledos, município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em 04 de dezembro de 2014, às 13:00 horas. A excisata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger, da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob tombo CESJ 49986.

PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

As partes aéreas de *C. coriaceum* foram secas a sombra sobre bancada e a temperatura ambiente por 15 dias, pulverizadas a fim de obter o material vegetal seco e pesadas (58,27 g). O material seco foi separado em uma amostra de 29,23 g para extração com o solvente etanol (5 X 500 mL). O extrato foi concentrado à pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório (Heidolph – Laborota 4000).

O solvente foi evaporado e pesado obtendo rendimento final com solvente etanol de 8,39 g. A amostra foi mantida sobre refrigeração até o momento da realização dos testes *in vitro*.

PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES PARA OS TESTES DE ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA

Para preparo das soluções estoques, após pesagem o extrato etanólico seco das folhas foi diluído em 100 µL de DMSO, e adicionado 900 µL de solução salina a 0,9%, para as

concentrações finais de 1 mL, identificadas como 3 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL. Foram armazenados em eppendorfs de 2 mL e acondicionadas em refrigerador comum.

COLETA DOS HOSPEDEIROS

Foram coletados 2 espécimes de *T. torquatus*, capturados em armadilha de cola (Victor Mouse® gluetraps) (RIBEIRO-JUNIOR et al., 2006), no período diurno do mês de setembro/2015, localizados em uma área de afloramento quartizítico, com aproximadamente 5.400 m², no distrito de Toledos, município de Juiz de Fora, na Zona da Mata Mineira, sudeste do Brasil (21°48'27.5''S; 43°35'31.7''W, datum: WGS84; altitude: 697), sob licença do IBAMA (Processo 02015.010660/05-88 nº da licença 261/05-NUFAS/MG). Os espécimes foram transportados para o Laboratório de Herpetologia – Répteis, da Universidade Federal de Juiz de fora – MG, identificados de acordo com Rodrigues (1987), e eutanasiados com Tiopental®, aplicado com seringas descartáveis de 1 mL (UETANABARO et al., 2007), e após necropsia, fixados em formaldeído comercial a 10%, conservados em álcool etílico a 70%, etiquetados e depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFJF sob o número 1467 e 1468.

COLETA DOS NEMATOIDES

Os hospedeiros foram necropsiados através de uma incisão longitudinal ventral a partir da região mentoniana até a abertura cloacal. O trato digestório foi transferido para placa de Petri com solução salina 0,9% e foi dissecado à procura de parasitos. As análises do conteúdo gastrointestinal foram feitas com auxílio de estereomicroscópio binocular modelo XT-3H-BI.

Espécimes *Parapharyngodon binae* recém coletados do ceco intestinal foram acondicionados em tubos do tipo eppendorf de 2 mL, individualizados contendo 100 µL de solução salina, por 15 minutos. Após, foi realizado experimento delineado conforme abaixo:

1. Tubo controle: adição de 100 µL de solução salina
2. Tubo controle + DMSO 10%: Adição de 100 µL de solução de DMSO 10%.
3. Tubo C1: Adição de 100 µL de extrato bruto etanólico de *C. coriaceum* na concentração de 3mg/mL.

4. Tubo C2: Adição de 100 µL de extrato bruto etanólico de *C. coriaceum* na concentração de 2mg/mL.

Foi considerado tempo zero (T=0) imediatamente após a aplicação das soluções, e tempo final a ausência de motilidade do parasito, mesmo com estímulo por agitação, para os indivíduos tratados. Os nematoides foram fixados com formalina a 4% aquecida a 90°C. Após sete dias no fixador os nematoides foram acondicionados em tubos eppendorf contendo etanol 70°GL.

Cada um dos espécimes de *Physaloptera* sp. recém coletados do estômago foi imediatamente transferido para um tubo do tipo eppendorf de 2 mL contendo os seguintes tratamentos: ,:

1. Tubo controle: adição de 100 µL de solução salina
2. Tubo controle + DMSO 10%: Adição de 100 µL de solução de DMSO 10%.
3. Tubo C1: Adição de 100 µL de extrato bruto etanólico de *C. coriaceum* na concentração de 3mg/mL.
4. Tubo C2: Adição de 100 µL de extrato bruto etanólico de *C. coriaceum* na concentração de 2mg/mL.
5. Tubo C3: Adição de 100 µL de extrato bruto etanólico de *C. coriaceum* na concentração de 1mg/mL.

Foi considerado tempo zero (T=0) imediatamente após a aplicação das soluções nos tratamentos e uma vez que os nematoides não morreram nesses testes, o tempo final de experimento foi estabelecido em 360 minutos. Os nematoides foram mortos e fixados com formalina 4% aquecida a 90°C. Após sete dias no fixador os nematoides foram acondicionados em tubos eppendorf contendo etanol 70°GL.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para os estudos de MEV, foram retiradas as regiões anteriores e posteriores dos espécimes fixados em formol a 4%. Essas partes foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100% overnight). Após a desidratação as regiões anteriores e posteriores passaram pelo processo de secagem em 1,1,1,3,3,3-Hexametildisilazano à 97%, por 30 minutos. Depois de secos, as partes corpóreas foram montadas em suportes ("stubs") com fita de carbono adesiva, metalizados em ouro e

analisados em microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 3D FEI operando a 10 kV alocado no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS NEMATOIDES

Para os estudos histológicos, a região mediana do corpo dos nematoides previamente fixados em formalina 4% e acondicionados em etanol 70°GL, foi transferida para tubos contendo solução de formalina 10% por 24 horas e posteriormente processados no Processador Automático de Tecidos PT-05 LUPETEC, desidratados em álcool absoluto em 6 ciclos em um total de 8 horas, diafanizados em xilol absoluto por 3 ciclos de 1 hora e impregnados com parafina em 2 ciclos de 2 horas a 70°C para obtenção de cortes seriados de 3µm de espessura, em 3 níveis. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) em corador automático Bellatrix EP-31-05103 EASYPATH (RHEUBERT et al., 2011). Toda a técnica histológica foi realizada no Laboratório de Patologia, do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais.

A análise do material e a respectiva fotodocumentação foi realizada em microscópio Olympus BX41 acoplado com equipamento fotográfico digital Canon A3100S e ocular micrométrica, alocado no Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Helminhos - Odile Bain na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais.

IDENTIFICAÇÃO DOS NEMATOIDES

Para identificação dos nematoides, alguns espécimes foram clarificados em Lactofenol de Amann e observados em microscópio de luz Olympus BX41. Os nematoides foram identificados até gênero de acordo com Anderson et al. (2009). Os espécimes de *Parapharyngodon baina* foram identificados de acordo com o estudo de Pereira et al. (2011).

RESULTADOS

TEMPO DE INIBIÇÃO

Observou-se a morte dos espécimes de *P. baina*e em todos os tratamentos após 120 minutos, permanecendo vivos os dos grupos controle (solução salina 0,9% e DMSO 10%). Em contrapartida, em um período de 360 minutos, todos os espécimes de *Physaloptera* sp. tratados ainda permaneciam vivos, bem como dos grupos controle (solução salina 0,9% e DMSO 10%) para essa espécie.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises por MEV das regiões anterior e posterior dos nematoides do grupo controle e controle com DMSO 10% e dos tratamentos expostos as concentrações de 3 mg/mL e 2 mg/mL, para a espécie *P. baina*e (Figuras 1, 2 e 3) e 3 mg/ml, 2 mg/mL e 1 mg/mL (Figuras 4, 5 e 6), para *Physaloptera* sp. evidenciaram alterações morfológicas na cutícula e em estruturas circum-orais dos nematoides estudados.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM *P. baina*e

Os nematoides tratados nas concentrações de 3 mg/ml, 2 mg/mL e 1 mg/mL com o extrato apresentaram um visível aumento de invaginações e irregularidades da cutícula resultante da desestruturação da camada basal e da subcutícula subjacentes a cutícula, da região anterior e região caudal, mais evidente para a concentração 3 mg/mL se comparado a 2 mg/mL, quando comparados ao grupo controle e solução salina DMSO 10%, que apresentaram cutícula intacta e de morfologia regular (Figuras 1 e 2).

Além disso, também foi observado alteração na morfologia da cutícula da região circum oral, com a evidente perda de formato e estrutura dos seis lábios para o tratamento de maior concentração (Figura 1d), quando comparados aos lábios dos espécimes dos grupos controle. Para a concentração de 2 mg/mL a arquitetura dos seis lábios ainda são visíveis, porém não é possível distinguir as papilas, quando comparado aos controles (Figura 1c). Para os tratamentos da região caudal observa-se que as anulações transversais da cutícula se

tornaram mais proeminentes, justapostas e em maior número, quando comparado aos controles (Figura 2 c e d)

Nota-se que não houve alteração significativa da camada mais externa da cutícula nos tratamentos em relação ao controle e controle DMSO 10% em solução salina 0,9% (Figura 3)

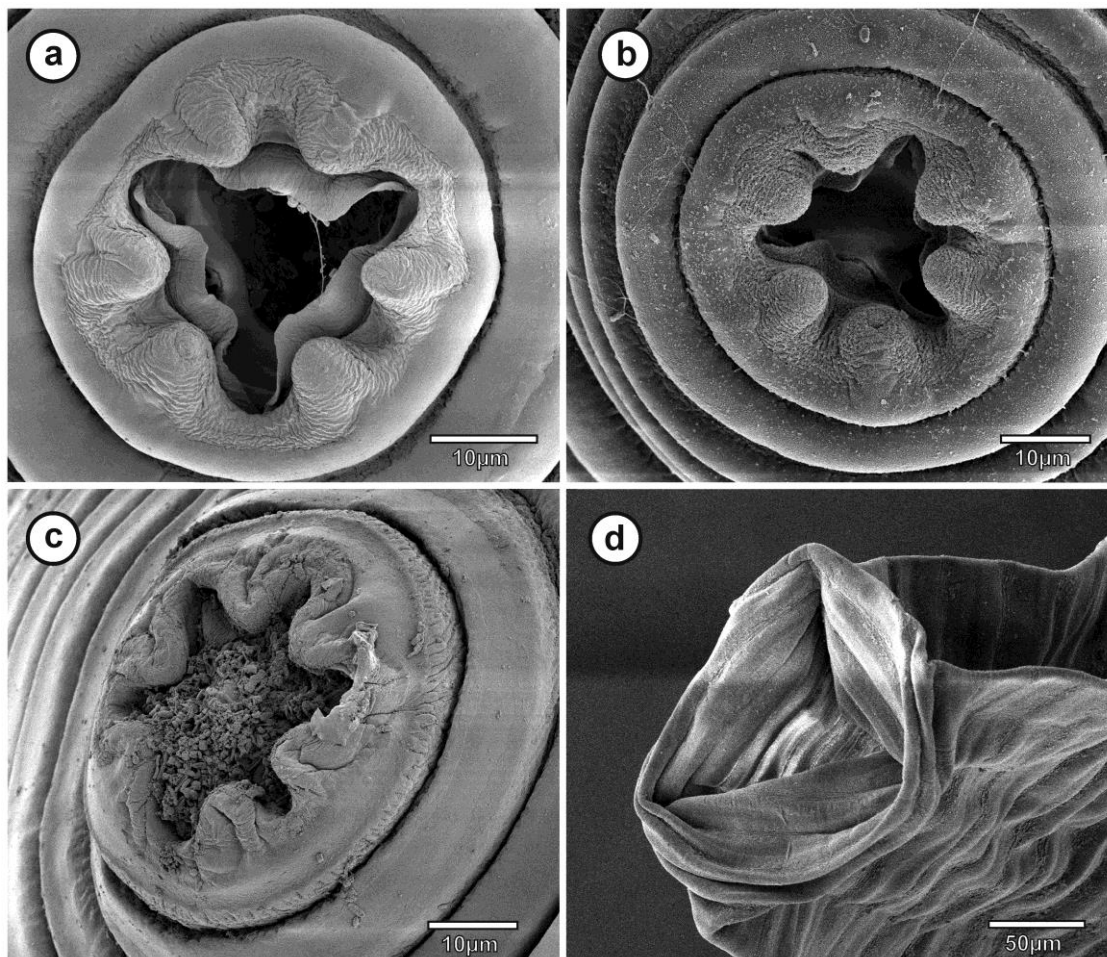


Figura 1. *Parapharyngodon binae* - Microscopia eletrônica e varredura da região anterior das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. c. grupo tratado 2 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.

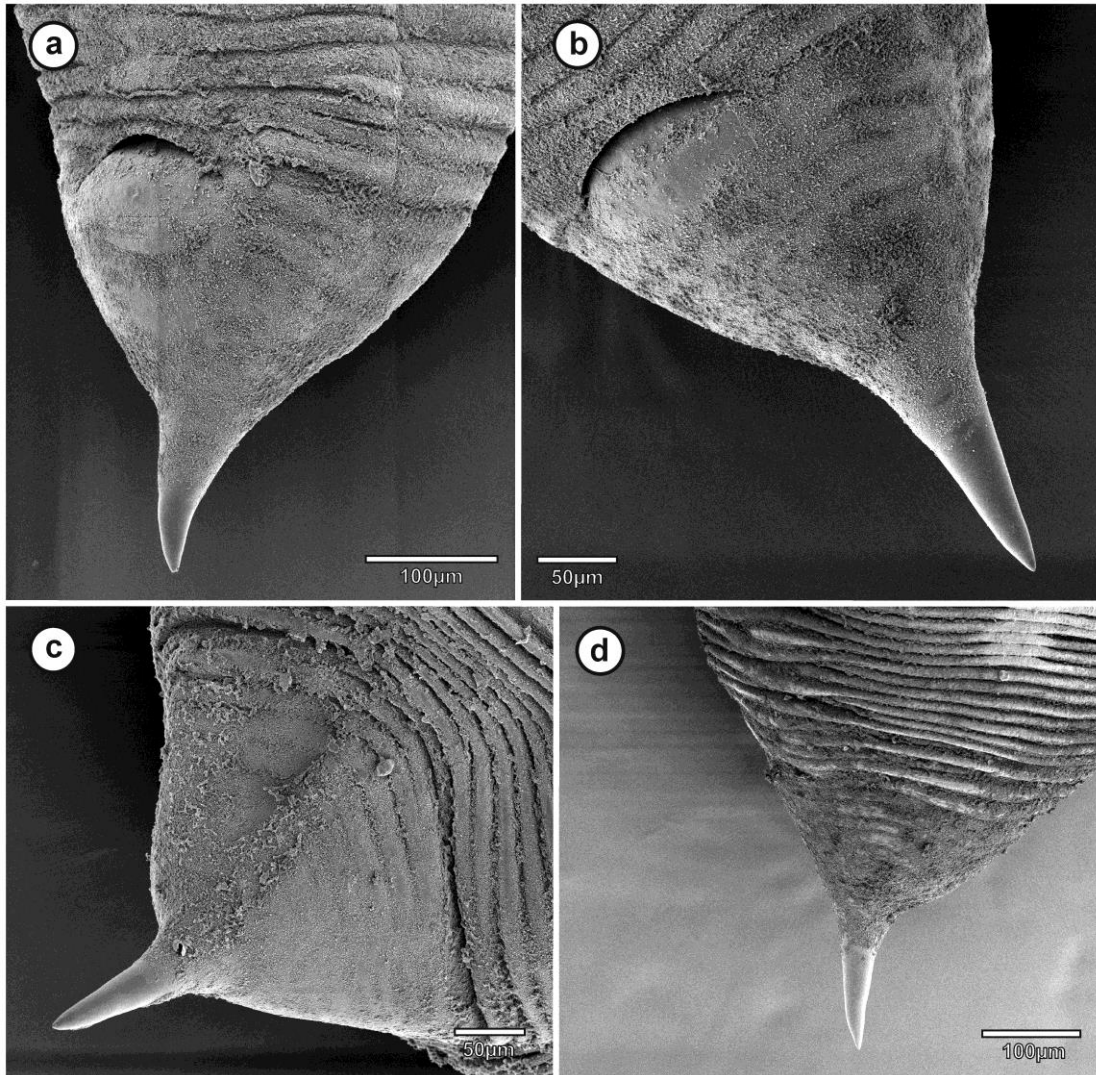


Figura 2. *Parapharyngodon binae* - Microscopia eletrônica e varredura da região caudal das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. c. grupo tratado 2 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.

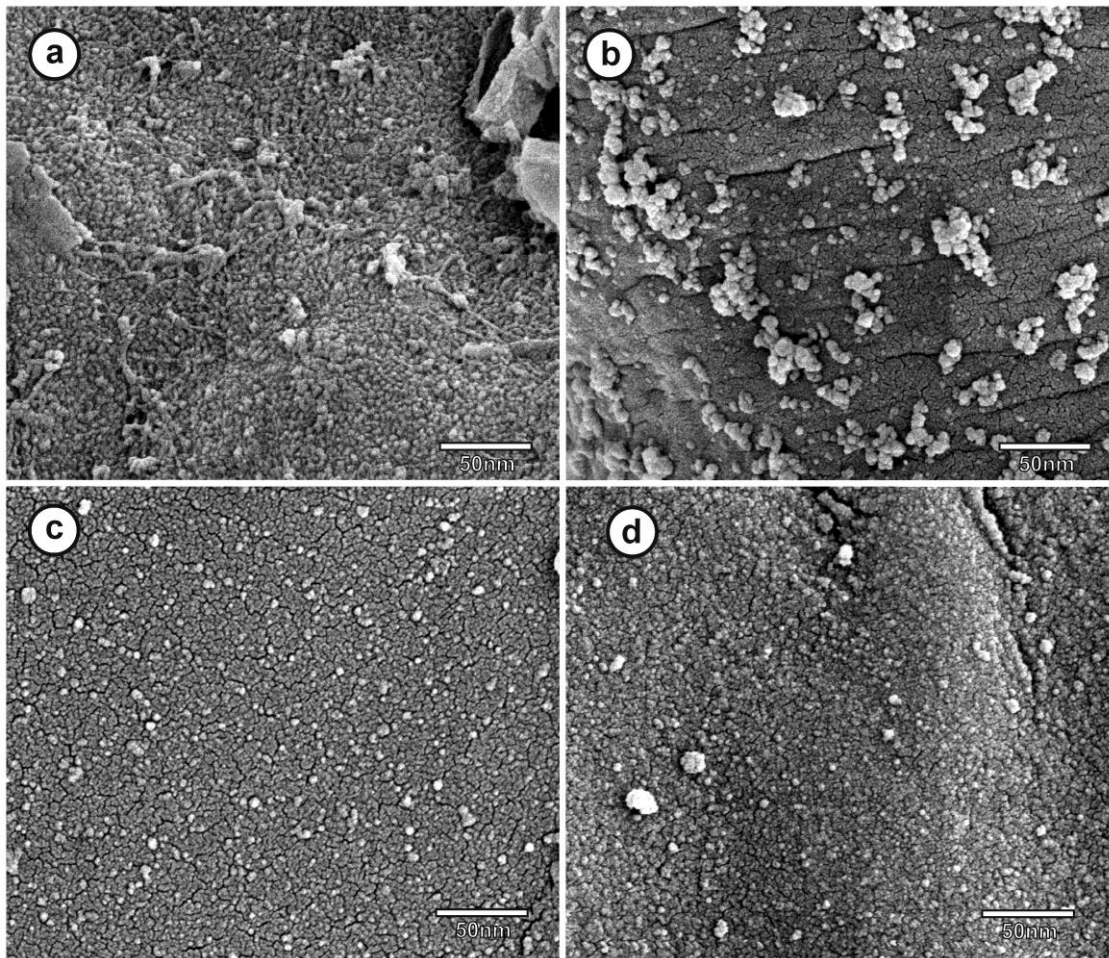


Figura 3. *Parapharyngodon baina* - Microscopia eletrônica e varredura da superfície externa da cutícula das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. %. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. c. grupo tratado 2 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.

HISTOLOGIA DA PAREDE CORPORAL DOS ADULTOS DE *P. baina*

Na figura 4 evidencia-se cortes transversais da porção média do corpo dos helmintos adultos, do grupo controle DMSO 10% em solução salina 0,9%, e grupos tratados nas concentrações de 3mg/mL e 2mg/mL, para a espécie *P. baina*. As seguintes estruturas foram observadas de fora para dentro; cutícula, células musculares com núcleo evidente e região interna (Figura 4b e 4g). Na Figura 4c, em maior aumento, foram detalhadas as camadas cortical, média e interna da cutícula do nematoide, hipoderme ou subcutícula composta por células em sincício, células musculares claviformes homogêneas que penetram o interior com núcleo evidentes.

Para os grupos tratados com extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum* na concentração 2 mg/mL evidencia-se, em menor aumento, completo descolamento da cutícula em relação a musculatura longitudinal e desarranjo das estruturas anatômicas internas (Figura 4d). Em maior aumento nota-se pontos de descolamento alternados com pontos preservados da hipoderme ou subcutícula em relação a cutícula, com conseqüente sobreposição em ondulações da cutícula (Figuras 4e e 4f). Importante destacar que as camadas cortical, média e basal da cutícula, além da morfologia das células musculares, foram preservadas, se comparadas ao grupo controle.

O tratamento com o extrato etanólico de *C. coriaceum* na concentração 3 mg/mL evidencia-se, em menor aumento, completo descolamento da cutícula em relação a musculatura longitudinal e desarranjo das estruturas anatômicas internas (Figura 4g). Em maior aumento nota-se completo descolamento da hipoderme ou subcutícula em relação à cutícula (Figuras 4i). Neste tratamento, a espessura das camadas cortical, média e interna da cutícula são menores quando comparados ao grupo controle.

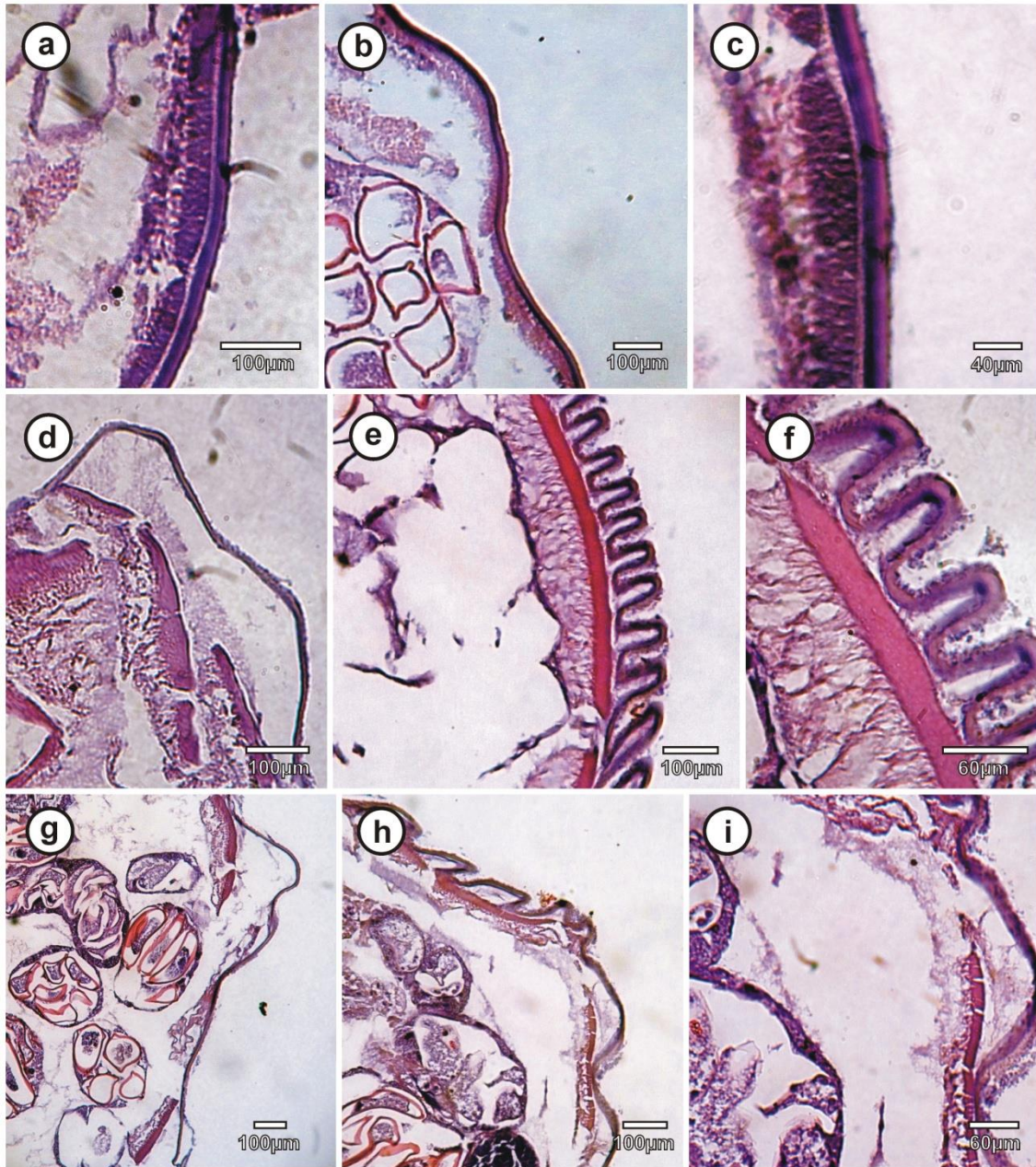


Figura 4. *Parapharyngodon binae*. - fotomicrografias de seções histológicas da parede corporal de fêmeas adultas, corados em hematoxilina-eosina (H.E.). a. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9% c. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9% .d. grupo tratado 2 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. e. grupo tratado com 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. f. grupo tratado com 2 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. g. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. h. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. i. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM *Physaloptera* sp.

Os tratamentos com o extrato etanólico de *C. Coriaceum* em *Physaloptera* sp. apresentaram desestruturação e perda significativa da morfologia externa da região anterior e região caudal para as concentrações 1 mg/mL se comparado a 2 mg/mL, e 3 mg/mL, quando comparados ao grupo controle e solução salina DMSO 10%, que apresentaram cutícula intacta e homogênea, preservando a arquitetura do par de lábios e das papilas, além da região caudal (Figuras 5 e 6).

Observam-se alterações morfológicas significativas com total transfiguração e desestruturação da morfologia de ambos os lábios que circundam a abertura bucal dos nematóides nas concentrações de 1 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL (Figura 5c, d, e). Para os tratamentos da região caudal observa-se nos tratamentos aumento do número das anulações transversais e perda da morfologia caudal (Figura 6c, d).

Nota-se que não houve alteração significativa da camada mais externa da cutícula nos tratamentos em relação ao controle e controle DMSO 10% em solução salina, evidenciados em maior aumento (Figura 7).

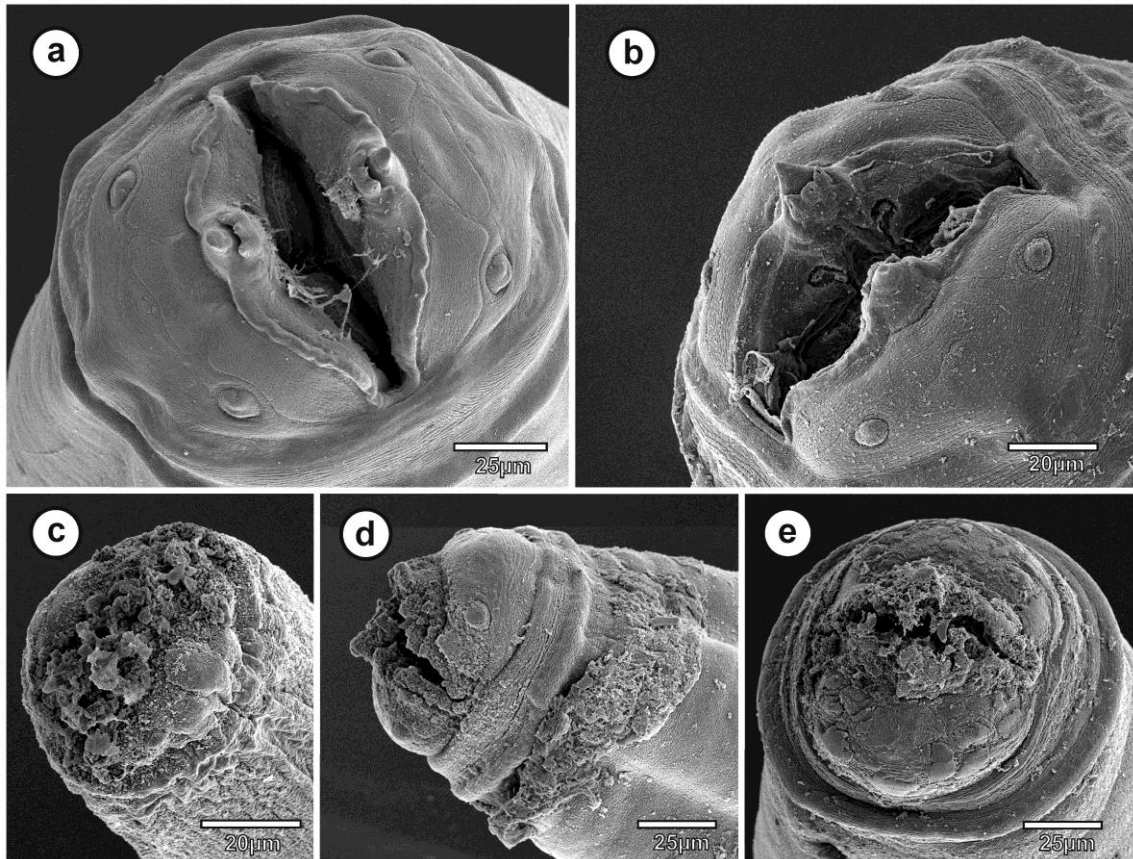


Figura 5. *Physaloptera* sp. - Microscopia eletrônica e varredura da região anterior das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina c. grupo tratado com 1 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 2mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. e. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.

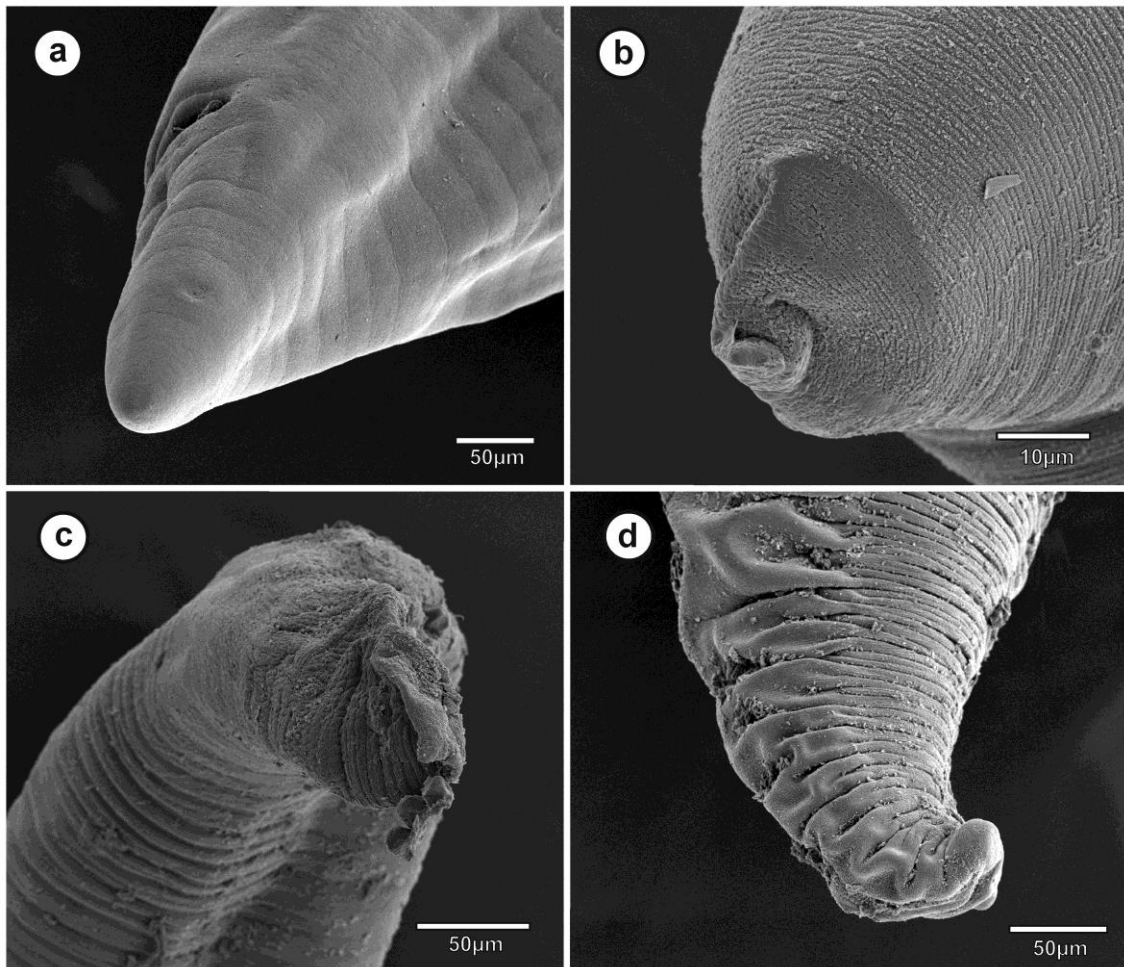


Figura 6. *Physaloptera* sp. - Microscopia eletrônica e varredura da cauda das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina c. grupo tratado com 2 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.

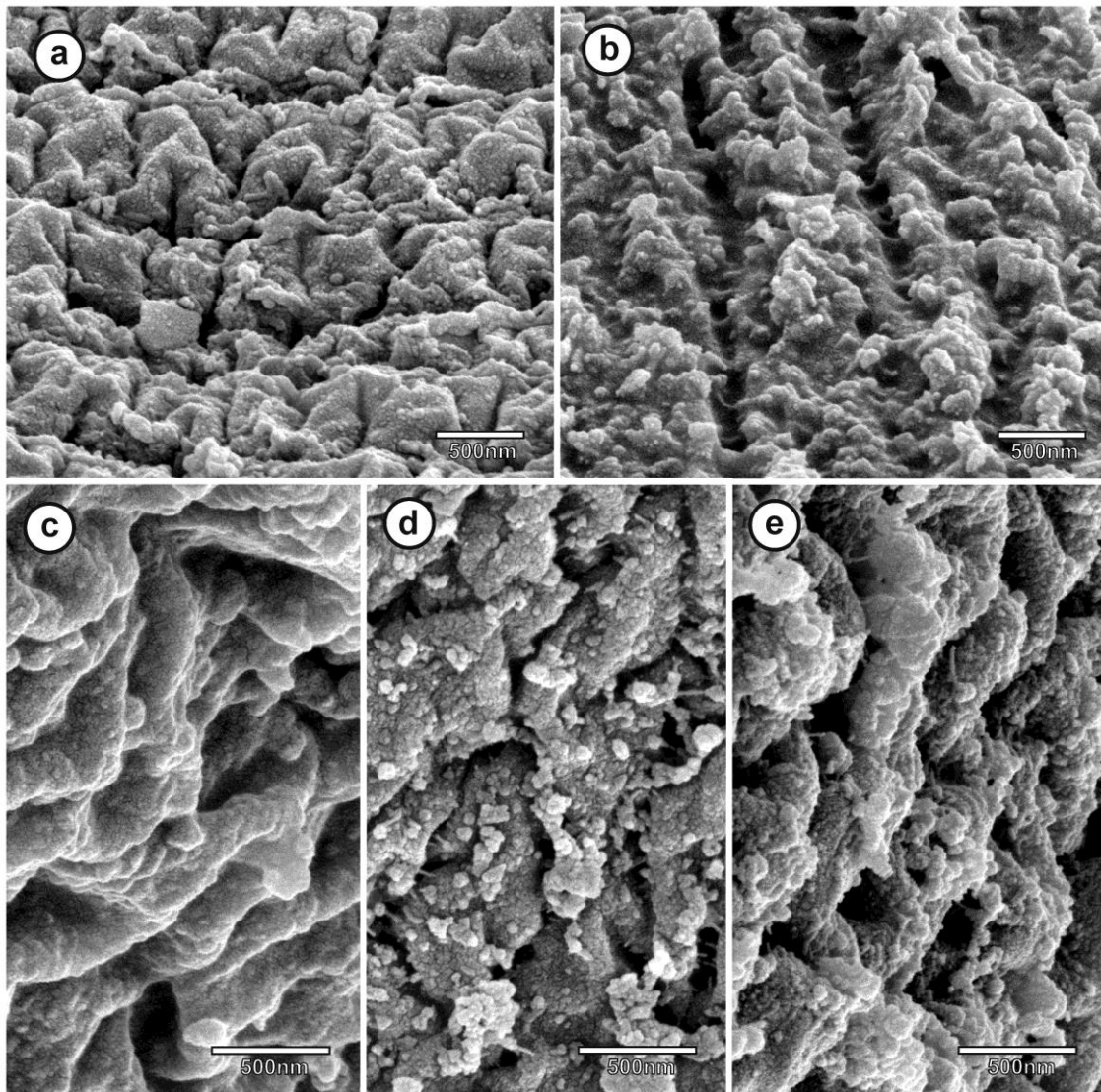


Figura 7. *Physaloptera* sp. - Microscopia eletrônica e varredura de parte da superfície externa da cutícula das fêmeas. a. controle solução salina 0,9%. b. controle DMSO 10% diluído em solução salina c. grupo tratado com 1 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. d. grupo tratado com 2mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*. e. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato bruto de *C. coriaceum*.

HISTOLOGIA DA PAREDE CORPORAL DOS ADULTOS DE *Physaloptera* sp.

Na Figura 8 em a, b e c evidencia-se cortes transversais da porção média do corpo de helmintos adultos *Physaloptera* sp., onde são observadas as seguintes estruturas de fora para dentro: cutícula, hipoderme ou subcutícula e células musculares com núcleo evidente. Na Figura 8c, em maior aumento, foram detalhadas as camadas cortical, média e interna da cutícula do nematoide, hipoderme ou subcutícula, células musculares estriadas com núcleo evidentes.

O corpo de *Physaloptera* sp. apresentou-se revestido por uma cutícula, com uma camada mais delgada externa, a epicutícula, e a camada cortical, seguida da camada média pouco visível e camada interna ou basal, mais espessa e muito evidente nesta espécie.

As células musculares deste Nematoda possuem tamanhos e formas variáveis e arranjaram-se em fileiras alongadas em paralelo ao comprimento do nematoide, que nos corte transversais, estavam dispostas em sentido transversal ao sentido do corpo. Quando coradas em HE essas células apresentaram núcleo evidente (Figura 8b e c).

Para os grupos tratados com extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum* na concentração 1 mg/mL evidencia-se, em menor aumento, que não houve alteração morfológica das estruturas internas do nematoide (Figura 9a), em maior aumento a cutícula em relação a subcutícula e a musculatura longitudinal interna permaneceram íntegras (Figura 9b e c). Para os tratamentos de 2 mg/mL observa-se descolamento parcial da cutícula em relação a musculatura longitudinal e desarranjo das estruturas anatômicas internas (Figura 9d, e, f). Importante destacar que as camadas cortical, média e basal da cutícula, além da morfologia das células musculares, foram preservadas, se comparadas ao grupo controle.

O tratamento com o extrato etanólico de *C. coriaceum* na concentração 3 mg/mL evidencia-se, em menor aumento, completo descolamento da cutícula em relação a musculatura longitudinal, porém as estruturas anatômicas internas continuam preservadas (Figura 9g). Em maior aumento nota-se completo descolamento da hipoderme ou subcutícula em relação à cutícula (Figuras 9h), em destaque nota-se um rompimento da camada interna ou basal, quando comparado ao grupo controle (Figura 9i)



Figura 8. *Physaloptera* sp. - fotomicrografias de seções histológicas da parede corporal de fêmeas adultas, corados em hematoxilina-eosina (H.E.). a. controle solução salina 0,9%. b. controle solução salina 0,9% c. controle salina0,9%. d. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. e. controle DMSO 10% diluído em solução salina 0,9%. f. grupo tratado com 2 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*.

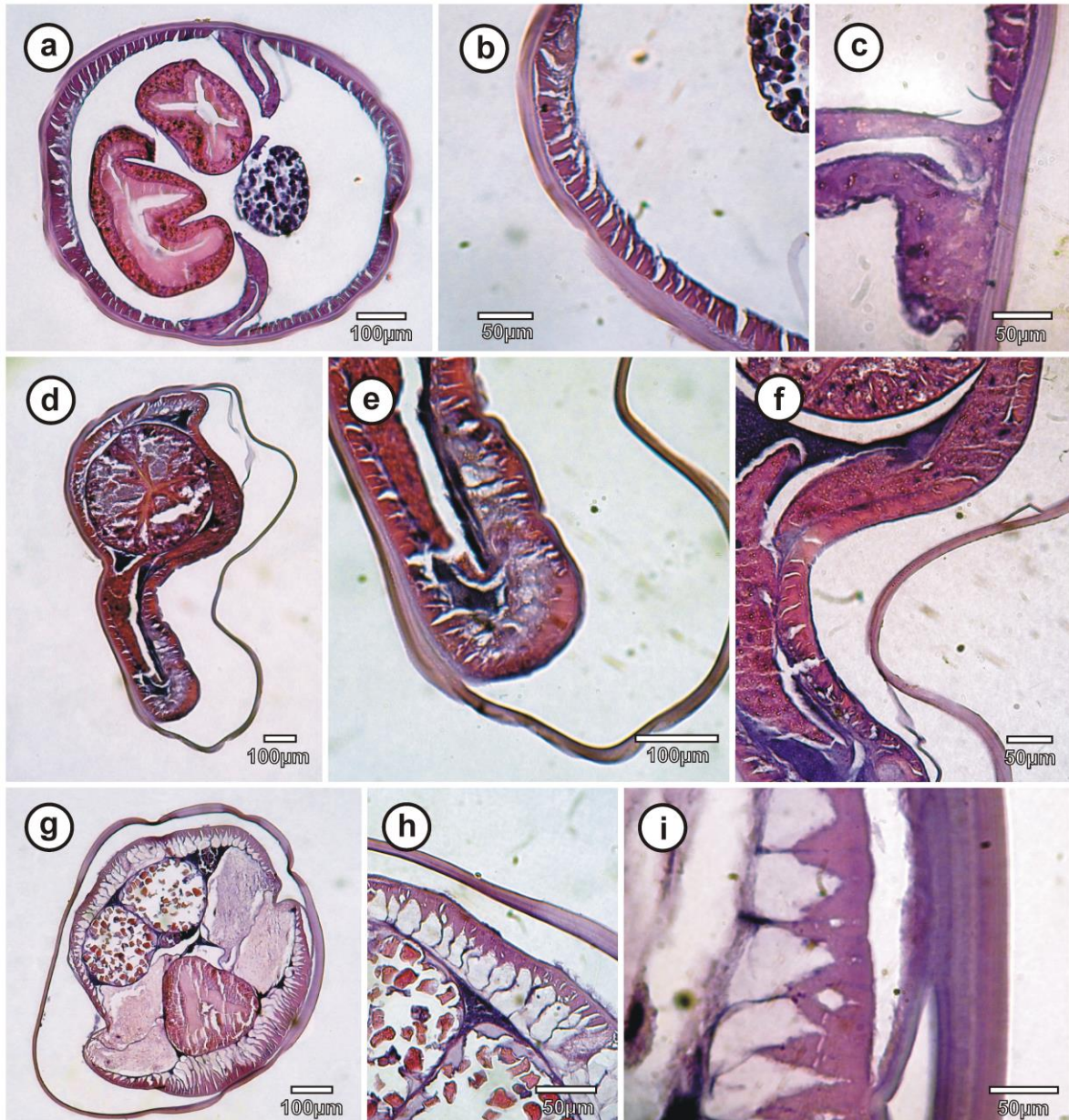


Figura 9 *Physaloptera* sp. - fotomicrografias de secções histológicas da parede corporal de fêmeas adultas, corados em hematoxilina-eosina (H.E.). a. grupo tratado 1 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. b. grupo tratado 1 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. c. grupo tratado 1 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. d. grupo tratado 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. e. grupo tratado com 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. f. grupo tratado com 2mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. g. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. h. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*. i. grupo tratado com 3 mg/mL de extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum*.

DISCUSSÃO

Espécies do gênero *Centrosema* (Candolle, 1825) Benth. 1837 (Fabaceae) são muito utilizadas para forrageio na pecuária, por serem palatáveis e de baixa toxicidade (CAMERON, 1984). Muito utilizada na medicina indiana, análises prévias dos seus constituintes químicos da espécie *Centrosema pubescens* Benth. (Fabaceae) revelaram presença de taninos, flavonoides, isoflavonoides, galactosídeos e isoflavonas, potenciais substâncias com ação anti-helmíntica (TOSTES et al., 1997; DA SILVA et al., 2000). Como plantas que possuem parentesco botânico têm uma tendência de apresentar semelhança no metabolismo secundário, bem como produzir produtos naturais de uma mesma classe química (LEITE, 2008), o extrato etanólico das folhas de *C. coriaceum* utilizadas no presente estudo provavelmente produz metabólitos secundários pertencentes às classes de flavonoides e taninos.

Nas análises por MEV, confirmadas pelas análises histológicas, no presente estudo, foi observado para *P. baina* e *Physaloptera* sp. dois efeitos principais; a camada externa da cutícula dos nematóides dos tratamentos permaneceu inalterada em sua estrutura comparado aos controles (Figura 3 e 7) e houve alteração significativa da morfologia da porção anterior e caudal dos nematóides, resultantes da dissociação e descolamento da cutícula em relação a hipoderme, com conseqüente encurtamento da cutícula e aumento acentuado das anulações transversais, efeito observado também para as espécies *Raillietina echinobothrida* (Pasquale, 1890) (Cestoda: Davaineidae), *Fasciolopsis buski* (Lankester, 1857) Looss, 1899 e *Ascaris suum* Goeze 1782, tratados com genisteína (YADAV e TANDON, 1992; ROY e TANDON, 1996; PAL e TANDON, 1998). Nestes testes *in vitro*, a genisteína, um flavonoide isolado de *Flemingia vestita* (Fabaceae), provocou espasmos da musculatura dos parasitos, seguida de paralisia flácida com alterações evidentes do tegumento, para as espécies de parasitos testadas.

Após aplicação do extrato para os indivíduos da espécie *P. baina* dos tratamentos nas concentrações preconizadas, houve redução progressiva da motilidade dos nematoides, até a morte decorridos 120 minutos de aplicação do extrato, e para *Physaloptera* sp. houve redução progressiva da motilidade 360 minutos da aplicação dos extratos, permanecendo vivos todos os parasitos ao final do teste. Efeitos negativos sobre a motilidade larval foram observados em estudos *in vitro* para as espécies *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) Cobb 1898

(Nematoda: Trichostrongylidae), *Ostertagia ostertagi* Stiles, 1892 (Nematoda: Trichostrongylidae) e *A. suum*, utilizando isolados de taninos condensados de extratos de plantas da família Fabaceae (BRUNET et al., 2008; NOVOBILSKÝ et al. 2011; WILLIAMS et al. 2014). Devido à capacidade destes compostos formarem complexos com proteínas (MUELLER-HARVEY e ALLAN, 1992; BRAVO, 1998; WATERMAN, 1999) pode-se supor que compostos da mesma classe presentes no extrato de *C. coriaceum* interagiram com proteínas da camada interna da cutícula de nematoides, gerando um processo de encurtamento das fibras proteicas, o que pode explicar as alterações morfológicas em ondulações observadas nos cortes histológicos para *P. baina*e e *Physaloptera* sp. no presente estudo, resultando em diminuição da motilidade e morte dos indivíduos tratados.

O objetivo da comparação de como os extratos atuam em *P. baina*e e *Physaloptera* sp. foi avaliar a eficácia do consumo de partes de *C. coriaceum* pelo *T. torquatus* como ação anti-helmíntica para ambos nematoides, por possuírem sítios de infecção específicos e não sobrepostos. As análises ultraestruturais por MEV sugerem que o extrato das folhas de *C. coriaceum* atua em maior intensidade na região anterior, com total transfiguração morfológica dos lábios e papilas de ambas espécies nas fêmeas submetidas aos tratamentos, bem como a área da vulva, semelhante fato de alteração da morfologia externa das porções anteriores e posteriores, também observado em testes com *R. echinobothrida*, quando incubados com extratos de *F. vestita* por Roy e Tandon (1996) e Pal e Tandon (1998).

Em consequência das lesões na região bucal e vulva de fêmeas, provocando alterações em sua arquitetura, quadros degenerativos na musculatura e em células intestinais, pode haver redução da motilidade do indivíduo, em virtude de alterações metabólicas advindas de quebras estruturais da cutícula. A nutrição do parasito pode ser afetada em decorrência das alterações na extremidade anterior, também ocorrendo prejuízos na liberação de ovos em fêmeas que tenham seu apêndice reprodutivo desestruturado conforme sugerido por Brunet et al. (2011) e Hoste et al. (2012). Alterações semelhantes foram observadas por Brunet et al. (2008) e Martínez-Ortiz-de-Montellano(2010) em testes *in vivo*, em *H. contortus* (Rudolphi) e *O. ostertagi* obtidos de ovelhas e cabras, pelo consumo do extrato de *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth. (Fabaceae).

Importante destacar que para a espécie *P. baina*e os tratados apresentaram perda de integridade de estruturas internas, com alterações das células intestinais e musculares sugestivas de necrose celular, evidenciados nos cortes histológicos (Figura 4). Estas

observações sugerem que a incubação dos parasitos nos extratos etanólicos de *C. coriaceum* causam degeneração e a morte destas células, resultando na morte dos indivíduos adultos, por dano celular direto. Em contraste nos cortes histológicos para *Physaloptera* sp. foi observado que as células musculares e intestinais permaneceram íntegras, com preservação morfologia interna dos parasitos tratados, em comparação com os parasitos dos grupos controle (Figura 8). Nesta espécie, o extrato etanólico de *C. coriaceum* atuou diretamente e em maior intensidade na camada sincicial da hipoderme ou subcutícula, resultando em total descolamento da cutícula em relação à musculatura dos nematoides.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que o extrato bruto de *C. Coriaceum* causou alterações morfológicas em ambas espécies de nematoides estudadas, indicando que nas condições metodológicas realizadas *C. coriaceum* apresentou atividade anti-helmíntica nesses parasitos. Este estudo é o primeiro que demonstra por microscopia eletrônica de varredura e análises histológicas, alterações morfológicas provenientes do tratamento com extrato bruto de plantas em nematoides sob condições *in vitro*, oriundos de uma espécie de réptil silvestre. Dessa forma pode-se constatar e afirmar que o presente modelo de estudo pode ser aplicado para estudos com o mesmo enfoque outras espécies de nematoides parasitos de animais silvestres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. C.; CHABAUD, A. G., **CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates**, Farnham Royal, England, 2009.

BARBOSA-FEVEREIRO, V. P. *Centrosema* (A. P. de Candolle) Bentham do Brasil – **Leguminosae – Faboideae**. *Rodriguésia*, v. 29, p.159-219. 1977.

BRUNET S.; JACKSON F.; HOSTE H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. **International Journal Parasitology**, v. 38, p.783–790, 2008.

BRUNET, S. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary parasitology**, v. 157, p. 81-88, 2008.

BRUNET, S.; FOURQUAUX, I.; HOSTE, H. Ultrastructural changes in the third stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sanfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. **Parasitology International**, v. 60, p. 419-424, 2011.

CAMERON, D. G. Tropical and subtropical pasture legumes. 2. Centro (*Centrosema pubescens*): a legume for the wet tropical coast. *Old. Agriculture Journal*, v. 110, p. 2221-2225, 1984.

DA SILVA, B. P.; TOSTES, J. B. F; PARENTE, J. P. Immunologically active polysaccharides from *Centrosema pubescens*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 516-521, 2007.

FOWLER, A.; KOUTSIONI, Y.; SOMMER, V. Leaf-swallowing in Nigerian chimpanzees: evidence for assumed self-medication. **Primates**, v. 48, p. 73–76, 2007.

GLANDER, K. E. Nonhuman primate self-medication with wild plant foods. In: ETKIN, N. L. (ed.) **Eating on the wild side: The pharmacologic, ecologic, and social implications of using cultigens**. University of Arizona Press, Tuscon, 227-239, 1994.

HAMMOND J. A.; FIELDING D.; BISHOP S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Community**, v. 21, p. 213-228, 1997.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 253-261, 2006.

HOSTE, H.; MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 18-27, 2012.

HUFFMAN, M. A.; PAGE, J. E.; SUKHDEO, M. V.; GOTOH, S.; KALUNDE, M. S.; CHANDRASIRI, T.; TOWERS, G. N. Leaf-swallowing by chimpanzees: a behavioral adaptation for the control of strongyle nematode infections. **International Journal of Primatology**, v. 17, p. 475–503, 1996.

HUFFMAN, M. A. Current evidence for self-medication in primates: a multidisciplinary perspective. **Yearbook of Physical Anthropology**, v. 104, p. 171–200, 1997.

HUFFMAN, M. A. Animal self-medication and ethnomedicine: exploration and exploitation of the medical properties of plants. **Primate Nutricional Society**, v. 63, p. 371-381, 2003.

LEITE, J. P. V. Química de produtos naturais: uma abordagem biossintética. In.: **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, p. 47-98, 2008.

LISONBEE, L. D.; LISONBEE, L. D.; VILLALBA, J. J.; PROVENZA, F. D.; HALL, J. O. Tannins and self-medication: implications for sustainable parasite control in herbivores. **Behavioural processes**, v. 82, p. 184-189, 2009.

LOZANO, G. A. Parasitic stress and self-medication in wild animals. **Advances in the Study of Behaviour**, v. 27, p. 291-318, 1998.

MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C.; VARGAS-MAGAÑA, J. J.; CANUL-KU, H. L.; MIRANDA-SOBERANIS, R.; CAPETILLO-LEAL, C.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary parasitology**, v. 172, p. 283-290, 2010.

MENDONÇA, R. D.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. D.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; ALMEIDA, S. D. **Flora Vascular do Bioma Cerrado. Cerrado, Ambiente e Flora**, Embrapa, Brazil, p. 289-556, 1998.

MUELLER-HARVEY I.; ALLAN A. B. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. **Advance Plant Cell Biochemistry Biotechnology**, v. 1, p. 151–217, 1992.

MUELLER, M. S.; MECHLER, E. **Medicinal plants in tropical countries. Traditional use-experience-facts**. Georg Thieme Verlag, Thieme, 2005.

NOVOBILSKÝ A.; MUELLER-HARVEY I. THAMSBORG, S. M. Condensed tannins act against cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 182 ,p. 213–220, 2011.

PAL, P.; TANDON, V. Anthelmintic efficacy of *Flemingia vestita* (Fabaceae) genistein-induced alterations in the ultrastructure of the tegument in the cestode, *Raillietina echinobothrida*. **Journal Parasitic Disease**, v. 22, p. 104-109, 1998.

PEREIRA, F. B.; SOUSA, B. M.; DE SOUZA LIMA, S. A new species of Pharyngodonidae (Nematoda) of *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) from Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 97, n. 2 p. 311-317, 2011.

PEREIRA, F. B.; GOMIDES, S. C.; SOUSA, B. M.; DE SOUZA LIMA, S.; LUQUE, J. L. The relationship between nematode infections and ontogeny and diet of the lizard *Tropidurus*

torquatus (Wied, 1820) (Squamata: Tropiduridae) from the Atlantic Rainforest in south-eastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2012.

RHEUBERT, J. L.; SIEGEL, D. S.; VENABLE, K. J.; SEVER, D. M.; GRIBBINS, K. M. Ultrastructural description of spermiogenesis within the Mediterranean Gecko, *Hemidactylus turcicus* (Squamata: Gekkonidae). **Micron**, v. 42 n. 7, p. 680-690, 2011.

RIBEIRO-JÚNIOR, M. A.; GARDNER, T. A.; ÁVILA-PIRES, T. C. S. The effectiveness of glue traps to sample lizards in a tropical rainforest. **South American Journal of Herpetology**, v. 1 n. 2, p. 131-137, 2006.

RODRIGUES, M.T. Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao Sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia** v. 31, p. 105–230, 1987.

ROY, B.; TANDON, V. Effect of root-tuber extract of *Flemingia vestita*, a leguminous plant, on *Artyfechinostomum sufrartyfex* and *Fasciolopsis buski*: a scanning electron microscopy study. **Parasitology research**, v. 82 n. 3, p. 248-252, 1996.

SIMONE-FINSTROM M. D.; SPIVAK M. Increased Resin Collection after Parasite Challenge: A Case of Self-Medication in Honey Bees? **PLoS ONE**, v. 7 n. 3, p. 34601, 2012.

TOSTES, J. B. F; DA SILVA, A. J. R; PARENTE, J. P. Pubescidin, an isoflavone glycoside from *Centrosema pubescens*. **Phytochemistry**, v. 45 n. 5, p. 1069-1072, 1997.

UETANABARO, M.; SOUZA, F. L., FILHO, P. L.; BEDA, A. F.; BRANDÃO, R. A. Anfíbios e répteis do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 279-289, 2007.

WALLER, P. J.; BERNES, G.; THAMSBORG, S. M.; SUKURA, A.; RICHTER, S. H.; INGEBRIGTSEN, K. Höglund: Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic Countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, p. 31-44, 2001.

WATERMAN, P. G. The tannins—an overview. In: Brooker JD, editor. **Tannins in livestock and human nutrition**. Proceedings of an International Workshop Adelaide, Canberra: ACIAR. v. 10, p.3, 1999.

WILLIAMS, A. R.; FRYGANAS, C.; RAMSAY, A.; MUELLER-HARVEY, I.; THAMSBORG, S. M. Direct anthelmintic effects of condensed tannins from diverse plant sources against *Ascaris suum*. **PLoS One**, v. 9 n. 5, p. 97053, 2014.

WILLIAMS, R. J.; CLEMENTS, R. J. **Taxonomy of *Centrosema*. *Centrosema*: Biology, agronomy, and utilization**. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, p. 1-27, 1990

YADAV, A. K.; TANDON, V.; RAO, H. S. P. In vitro anthelmintic activity of fresh tuber extract of *Flemingia vestita* against *Ascaris suum*. **Fitoterapia**, v. 63, p. 395-398, 1992.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE *Parapharyngodon binae* PEREIRA, SOUSA & SOUZA LIMA, 2010 (OXYUROIDEA, PHARYNGODONIDAE) OBTIDOS DE *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (SQUAMATA, TROPIDURIDAE), MINAS GERAIS, BRASIL

RESUMO

Tropidurus torquatus é uma espécie de lagarto que apresenta ampla distribuição pelo Brasil e ocupa habitats diversificados nos biomas Cerrado e Caatinga e em áreas urbanas. Sua dieta é composta em grande parte por artrópodes, e apresentam uma comunidade parasitária caracterizada por baixa riqueza de espécies, alta prevalência e intensidade. Um total de 440 ovos do parasito intestinal *Parapharyngodon binae* foram recuperados de coproculturas mantidas por 36 dias, obtidas de fezes de *T. torquatus* provenientes de uma área de afloramento rochoso, estado de Minas Gerais, Brasil, a fim de estabelecer padrões morfológicos e morfométricos do desenvolvimento dos estágios de vida livre do parasito. Estágios de mórula apresentaram percentual de 55%, 45% e 25% respectivamente nos 3 primeiros dias cultura, sendo ausente após o 13º dia. Estágios de gástrula e girinoide exibiram padrão constante e persistente, com percentuais abaixo de 40% para ambos e estágios tardios de desenvolvimento prevaleceram em alta porcentagem a partir do 13º dia de cultura. Um total de 75 ovos foram mensurados, apresentando médias de comprimento e largura de 93,49 e 50,79 µm; 92,11 e 49,91 µm; 93,11 e 49,47 µm; 93,78 e 48,83 µm, respectivamente para os estágios de mórula, blástula, gástrula, girinoide e para os estágios larvais L1, L2 e L3 foram mensurados comprimento e largura dos ovos e das larvas, apresentando médias de 90,91 e 50,26 µm; 90,63 e 47,6 µm; 90 e 50 µm para ovos e 59,1 e 25,38 µm; 72,63 e 26,5 µm; 77,5 e 25 µm para as larvas, respectivamente para larva L1, larva L2 e larva L3. Para *P. binae*, as fêmeas liberam os ovos para o ambiente ainda nos estágios iniciais de clivagem e o desenvolvimento dos embriões é lento comparado a outras espécies de oxiurídeos, o que sugere uma estratégia evolutiva de sobrevivência para grupo em relação ao seu hospedeiro.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário, Oxyurida, morfologia, morfometria

CHAPTER II

DEVELOPMENT OF THE FREE-LIVING STAGES OF *Parapharyngodon binae* PEREIRA, SOUSA & SOUZA LIMA, 2010 (OXYUROIDEA, PHARYNGODONIDAE) OBTAINED FROM *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (SQUAMATA, TROPIDURIDAE), OF MINAS GERAIS, BRAZIL

ABSTRACT

Tropidurus torquatus is a lizard with widely distribution throughout Brazil and occupying diverse habitats in the Cerrado and Caatinga biomes and urban areas. Their diet consists largely of arthropods, having also a parasite community characterized by low species richness, a high prevalence and intensity. A total of 440 eggs of intestinal parasite from *Parapharyngodon binae*, recovered from cultures were maintained for 36 days, obtained from *T. Torquatus* from an area of rocky outcrops, state of Minas Gerais, Brazil. In order to establish morphological and morphometric patterns of development of the free-living stages of the parasite. Morula stages showed a percentage of 55%, 45% and 25% respectively in the first 3 days culture and absent after the 13th day. Gastrulation and tad pole stages exhibited constant and persistent pattern, with percentages below 40% for both. Early and late stages of development prevailed in high percentage from the 13th day of culture. A total of 75 eggs were measured, with the average length and width 93,49 and 50,79 μm ; 92,11 and 49,91 μm ; 93,11 and 49,47 μm ; 93,78 and 48,83 μm , respectively to the stages of morula, blastula, gastrulation and tad pole. The length and width of the eggs and larvae stages L1, L2 and L3 were measured, showing means of 90,91 and 50,26 μm ; 90,63 and 47,6 μm ; 90 and 50 μm and 59,1 and 25,38 μm ; 72,63 and 26,5 μm ; 77,5 and 25 μm , respectively for larvae L1, L2 and L3. In *P. binae*, females release eggs into the environment even in the early stages of cleavage. The embryo development is slow compared to other species of Oxyurida, suggesting an evolutionary survival strategy for the group in relation to its host.

Keywords: embryo development, Oxyurida, morphometric patterns, morphological patterns

INTRODUÇÃO

Atualmente, parasitos de animais silvestres são estudados tanto no contexto de saúde e bem estar animal, como no da saúde pública humana (GULLAND, 1995; DASZAK et al., 2000; AGUIRRE, 2009) e muitas vezes tem como foco a morbidade e mortalidade dos seus hospedeiros (PRICE, 1986; GULLAND, 1995). A diversidade faunística e da flora que compõe os biomas no Brasil torna os estudos sobre o parasitismo um importante tema a ser abordado para caracterizar e compreender seu papel na conservação de populações viáveis de espécies silvestres nos diferentes biomas existentes, e pode ser considerado um fator importante que influencia a organização e evolução da vida dos seres vivos, uma vez que grande parte das relações ecológicas entre parasito-hospedeiro sugerem eventos co-evolutivos entre as espécies ao longo do tempo (ADAMSON, 1994; PATERSON, 2010)

Os helmintos parasitos apresentam uma biodiversidade oculta e atuam como reguladores da população hospedeira (POULIN, 1999), e a variedade de mecanismos de dispersão e superação das barreiras ao parasitismo impostas pelos hospedeiros, demonstram estratégias adaptativas dos parasitos ao seu ambiente (PRICE, 1986; CLARK, 1994; POULIN, 2014). Uma das adaptações do ciclo de vida parasitário é o aumento da probabilidade do estágio infectante alcançar o próximo hospedeiro, o que geralmente está relacionado com o aumento no número dos agentes infectantes que resistam às condições ambientais ou desenvolvimento de padrões comportamentais que otimizem o contato entre o estágio infectante e o hospedeiro (ROGERS, 1962).

Em relação a helmintos de répteis, apesar da riqueza e diversidade do grupo, são poucos os estudos quanto ao estabelecimento de padrões de comportamento entre parasito-hospedeiro, bem como aspectos morfológicos, morfométricos e de desenvolvimento de ovos desses helmintos, e isto se deve em parte à dificuldade em estabelecer metodologias e padrões experimentais para as espécies silvestres (BIRD e STYNES, 1981; GUZEEVA e SPIRIDONOV, 2012).

Em especial, o gênero *Parapharyngodon* Chatterji, 1933 (Oxyuroidea, Pharyngodonidae) possui 58 espécies descritas (BURSEY e GOLDBERG 2015). Há controvérsias em relação à classificação do gênero entre autores, devido a similaridades morfológicas entre espécies de *Parapharyngodon* e *Thelandros* Wedl, 1862 (Oxyuroidea, Pharyngodonidae), porém, atualmente são reconhecidos como dois gêneros distintos devido a

diferenças morfológicas no padrão de distribuição, presença ou ausência além do número de papilas caudais e a asa lateral, a morfologia das papilas e espículas cloacais em machos, bem como a localização do ovário e a morfologia caudal nas fêmeas, posição do opérculo e estágios de desenvolvimento dos ovos (FREITAS, 1957; SHARPILO, 1976; ADAMSON, 1983; RAMALLO et al., 2002; BURSEY e GOLDBERG, 2015). Para a espécie *Parapharyngodon binae* Pereira, Sousa & Souza Lima, 2010 (Nematoda, Oxyuroidea), parasitos de *Tropidurus torquatus*, aspectos quanto riqueza, intensidade e abundância relativa foram elucidados em estudos anteriores, contudo as formas de transmissão, ciclo de vida e aspectos da biologia do desenvolvimento de estágios de vida livre ainda são desconhecidos.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo elucidar aspectos do desenvolvimento de estágios de vida livre, sob condições de laboratório de *P. binae*, parasito intestinal de espécimes de *T. torquatus* provenientes de uma área de campo rupestre na Zona da Mata Mineira, sudeste do Brasil, assim como estabelecer padrões morfológicos e morfométricos para cada estágio de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DOS HOSPEDEIROS

Para a realização dos estudos de desenvolvimento, ovos de *Parapharyngodon binae* foram obtidos de amostras de fezes de espécimes de *Tropidurus torquatus* coletados em uma área de afloramento quartizítico, com aproximadamente 5.400 m², localizadas no distrito de Toledos, município de Juiz de Fora, na Zona da Mata Mineira, sudeste do Brasil (21°48'27.5''S; 43°35'31.7''W, datum: WGS84; altitude: 697), entre os meses de maio a dezembro de 2015. Esta área apresenta um clima tropical de altitude com duas estações bem definidas ao longo do ano, uma quente e chuvosa de outubro a abril e outra fria e seca de maio a setembro. As temperaturas anuais médias oscilam em torno de 19,4°C e a umidade relativa do ar varia de 75% a 81%. A pluviosidade média anual é de 1.787,17 mm, onde os meses mais secos são julho a agosto, e os mais chuvosos dezembro e janeiro (Plano Diretor/JF-Ippplan/JF, Anuário 2014).

Foram coletados três espécimes de *T. torquatus* (duas fêmeas e um macho), capturados em armadilha de cola (Victor Mouse[®] gluetraps) (RIBEIRO-JUNIOR et al., 2006), no

período diurno, entre os meses de maio e julho de 2015, durante a estação seca e quatro espécimes entre agosto e dezembro de 2015, durante a estação chuvosa, sob licença do IBAMA (Processo 02015.010660/05-88 n° da licença 261/05-NUFAS/MG). Os espécimes foram transportados para o Laboratório de Herpetologia – Répteis, da Universidade Federal de Juiz de fora – MG e imediatamente necropsiados.

COLETA DO MATERIAL FECAL, ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DOS OVOS

As fezes foram coletadas imediatamente após a defecação espontânea dos animais, e acondicionadas em frascos plásticos para análise fecal, identificadas e mantidos sob refrigeração (aprox. 7°C). Para o estudo do desenvolvimento embrionário dos ovos de *P. bairae* foi utilizado a Técnica de Roberts e O'Sullivan (1950), com modificações.

As fezes recuperadas foram pesadas e misturadas com vermiculita, na proporção de duas partes de vermiculita para uma de fezes, dentro de cubetas plásticas de volume de 30 ml e em seguida, adicionado 200 µL de água e homogeneizadas manualmente com bastão de vidro. As cubetas foram tampadas com tampa perfurada a fim de permitir a aeração e umidade da cultura, acondicionadas em temperatura ambiente com condição ambiental monitorada por termo-higrômetro digital máxima/mínima 0°/+50°C e 15/95% UR Incoterm®. Foram mensurados a temperatura e a umidade ambiental a cada 24 horas de cultivo, e adicionados à coprocultura 100 µL de água a cada 48 horas de incubação.

A recuperação dos ovos dos nematoides foi realizada pela técnica de sedimentação espontânea de Hoffmann, Pons e Janer (1934) modificado. A cada 24 horas de incubação a partir do momento da montagem das culturas, aproximadamente 40 mg de cada coprocultura foi destinada a análise.

Cada amostra de cultura foi peneirada em gaze hidrofílica diretamente em cálice de sedimentação de 250 mL. Após 40 minutos de sedimentação, 2/3 do sobrenadante foi descartado e o sedimento foi pipetado com pipeta de Pasteur para montagem de lâminas provisórias, para identificação e quantificação dos ovos e seus respectivos estágios de desenvolvimento, em microscópio de luz Olympus BX41. Para cada amostra nos cálices de sedimentação foram montadas cinco lâminas. As análises foram realizadas em intervalos de 24 horas, por 10 dias seguidos, e após este período, por dias alternados, perfazendo um total de 36 dias.

Foram mensurados em cada amostra o máximo de ovos em cada um dos estágios de desenvolvimento. Os ovos foram identificados seguindo parâmetros de desenvolvimento para nematoides descritos por Chitwood e Chitwood (1950) e Von Ehrenstein e Schierenberg (1980) e padronizados em estágios de mórula, blástula, gástrula, girinóide, larva de primeiro estágio (L1), larva de segundo estágio (L2) e larva de terceiro estágio (L3) com o aparecimento da dupla cutícula.

Os registros morfométricos dos ovos foram realizados com o auxílio de microscópio Olympus BX51 equipado com ocular micrométrica. As fotografias foram realizadas utilizando-se câmara fotográfica digital Canon Power Shot SD1300 IS, 12,1 mega-pixels de resolução. Para cada ovo foi realizado o registro do estágio de desenvolvimento, do maior comprimento e da maior largura. Para os estágios larvais L1, L2 e L3 foram mensurados maior comprimento e maior da largura dos embriões e dos ovos.

NECROPSIA E IDENTIFICAÇÃO DOS HELMINTOS ADULTOS

Após a coleta das fezes os hospedeiros coletados foram eutanasiados com Tiopental[®], aplicado com seringas descartáveis de 1 mL (UETANABARO et al., 2007), e após necropsia, fixados em formalina a 4%, conservados em álcool etílico 70% GL, etiquetados e depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFJF, sob os seguintes números de tombo: 1457; 1458; 1463; 1464; 1484; 1485; 1486. A identificação dos espécimes foi feita segundo Rodrigues (1987).

A massa corpórea dos hospedeiros foi aferida em balança Pesola[®] com precisão de 0,25 g e da mensuração do comprimento rostro-cloacal (CRC) foi feito com paquímetro digital 799 Starrett[®] com 0,1 mm de precisão. As gônadas foram avaliadas para determinação do sexo dos hospedeiros.

Os hospedeiros foram necropsiados através de uma incisão longitudinal ventral a partir da região mentoniana até a abertura cloacal. O trato digestório foi transferido para placa de Petri com solução salina 0,9% e foi dissecado à procura de parasitos. As análises do conteúdo gastrointestinal foram feitas com auxílio de estereomicroscópio binocular modelo XT-3H-BI.

Assim que coletados, os nematoides ainda vivos foram fixados em solução de formalina 4% aquecida, e acondicionados em tubos do tipo eppendorf de 2 mL. Após sete

dias no fixador os nematoides foram acondicionados em tubos eppendorf contendo etanol 70°GL onde ficaram acondicionados até o momento da identificação.

Para identificação e estudo morfológico os nematoides foram clarificados em lactofenol de Amann e montados em lâminas temporárias para análise em microscópio Olympus BX51. Foram mensurados dois machos e quatro fêmeas de nematoides. O gênero e espécie dos nematoides foi identificado de acordo com Pereira et al. (2011).

Espécimes representativos desses nematoides serão depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE *P. baina*

Os ovos da espécie *P. baina* apresentam formato elipsoide assimétrico devido ao achatamento em uma das faces laterais, com uma extremidade mais estreita e a outra mais larga, composta por dupla camada (Figura 1). A casca possui superfície externa apresentando rugosidades (Figura 1, c e em f), com presença de opérculo sub-apical.

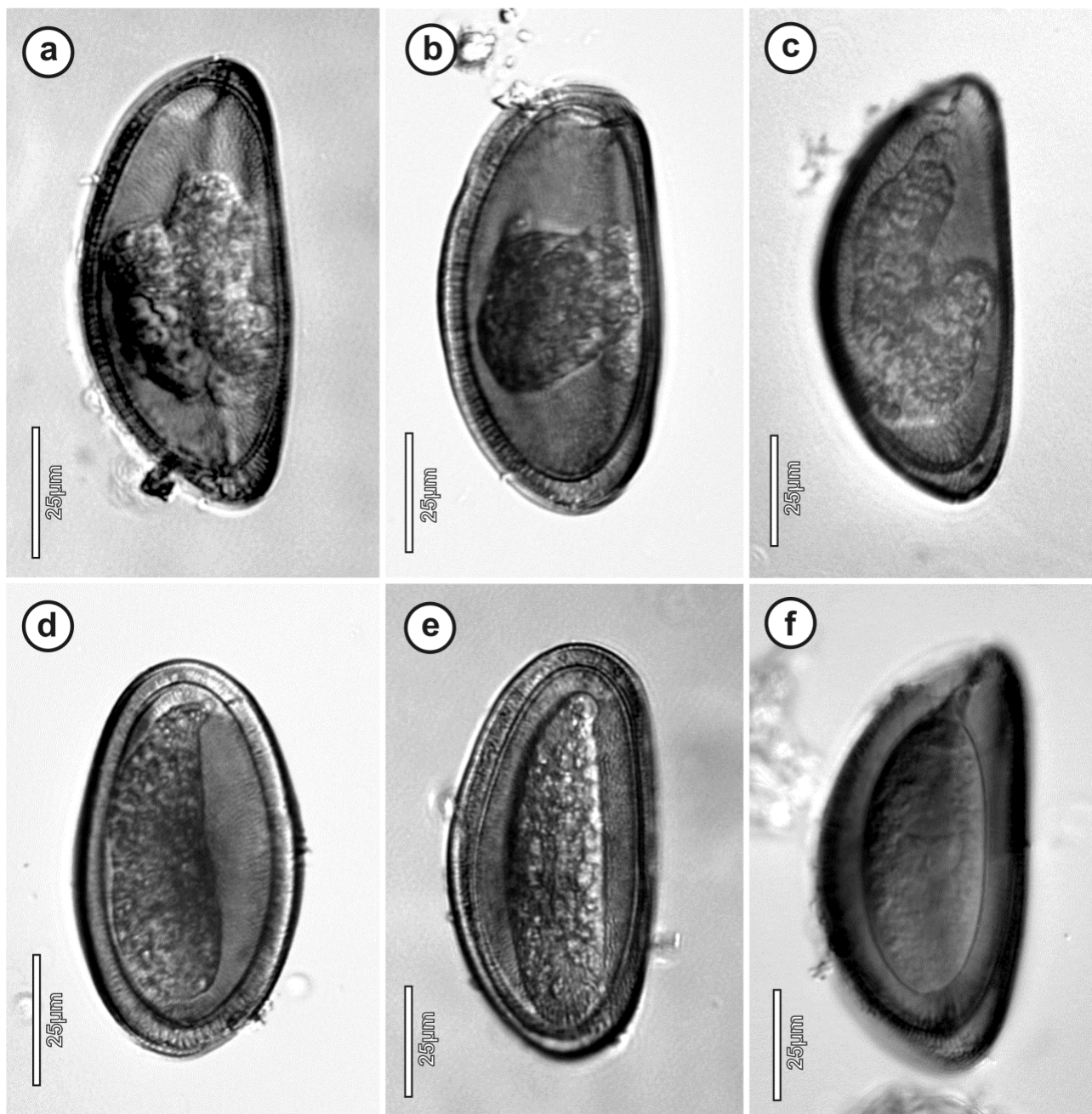


Figura 1: Estágio de desenvolvimento dos ovos de *Parapharyngodon binae*. Em a - estágio de mórula, b – estágio de blástula, c, d – estágio de gástrula, e – estágio girinóide, f – estágio de larva L1, fotografados em microscopia de luz DIC.

ESTÁGIO DE MÓRULA

Os ovos em estágio de mórula apresentaram em seu interior embrião em estágio inicial de clivagem, com formato tridimensional globoso sendo possível a mensuração de quatro, oito ou dezesseis células (Figura 2). Nesse estágio a casca dos ovos é espessa, contendo duas camadas bem definidas e um opérculo ou região de quebra mais delgada que a casca, localizado em posição sub-apical em um dos polos do ovo.

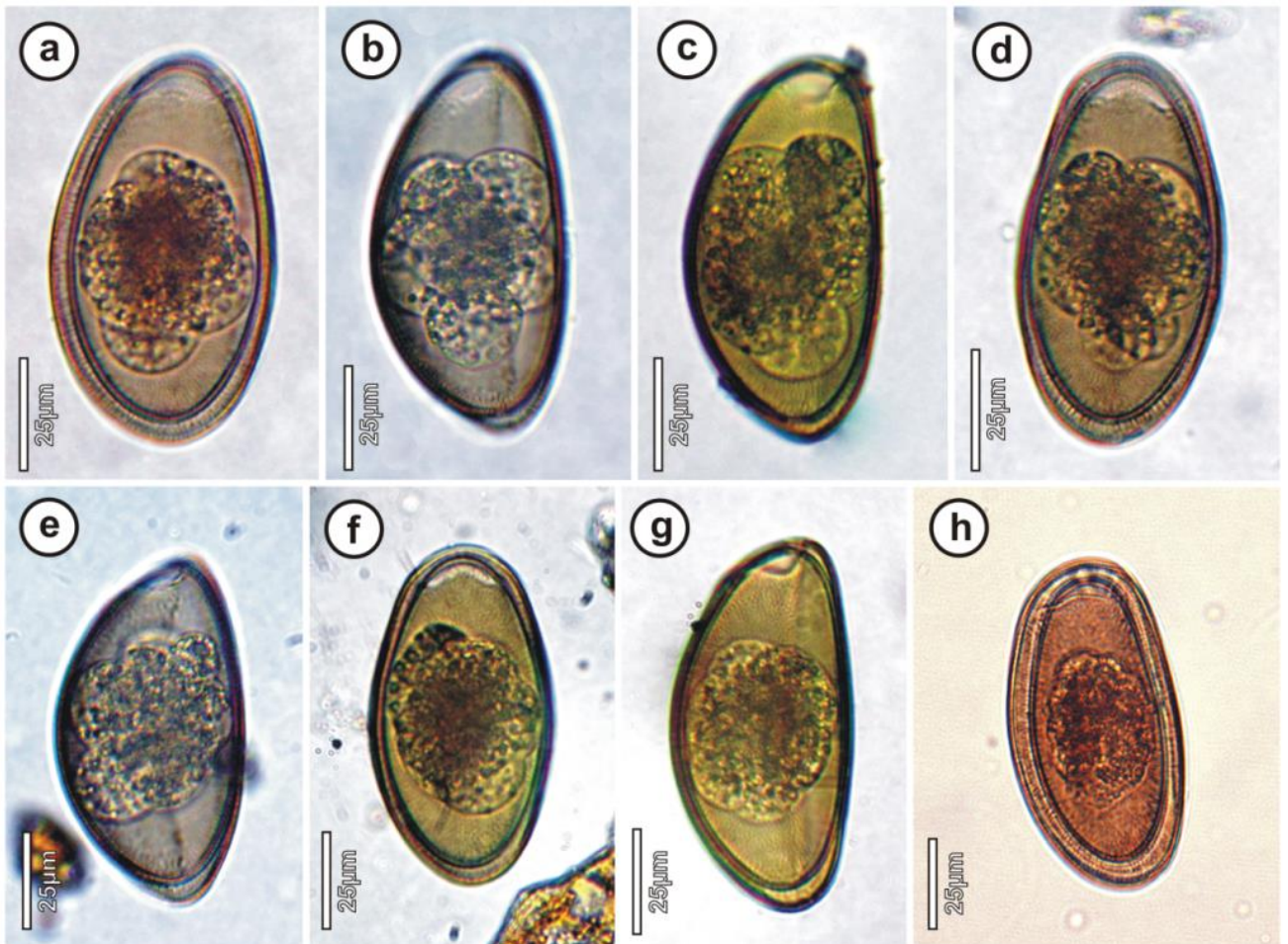


Figura 2: Estágio de Mórula dos ovos de *Parapharyngodon binae*., fotografados em microscopia de luz. a,b,c – estágio inicial de clivagem com 6-8 células; d, até g, – estágio inicial de clivagem com 10-12 células; h – estágio inicial de clivagem maior que 12 células.

ESTÁGIO DE BLÁSTULA

Os ovos em estágio de blástula se caracterizaram por possuírem um embrião no qual já não é possível contar o número de células (Figura 3). A casca dos ovos é espessa, formada por duas camadas evidentes e com a região opercular nitidamente mais delgada que o restante da casca do ovo, localizada em posição sub-apical em um dos polos .

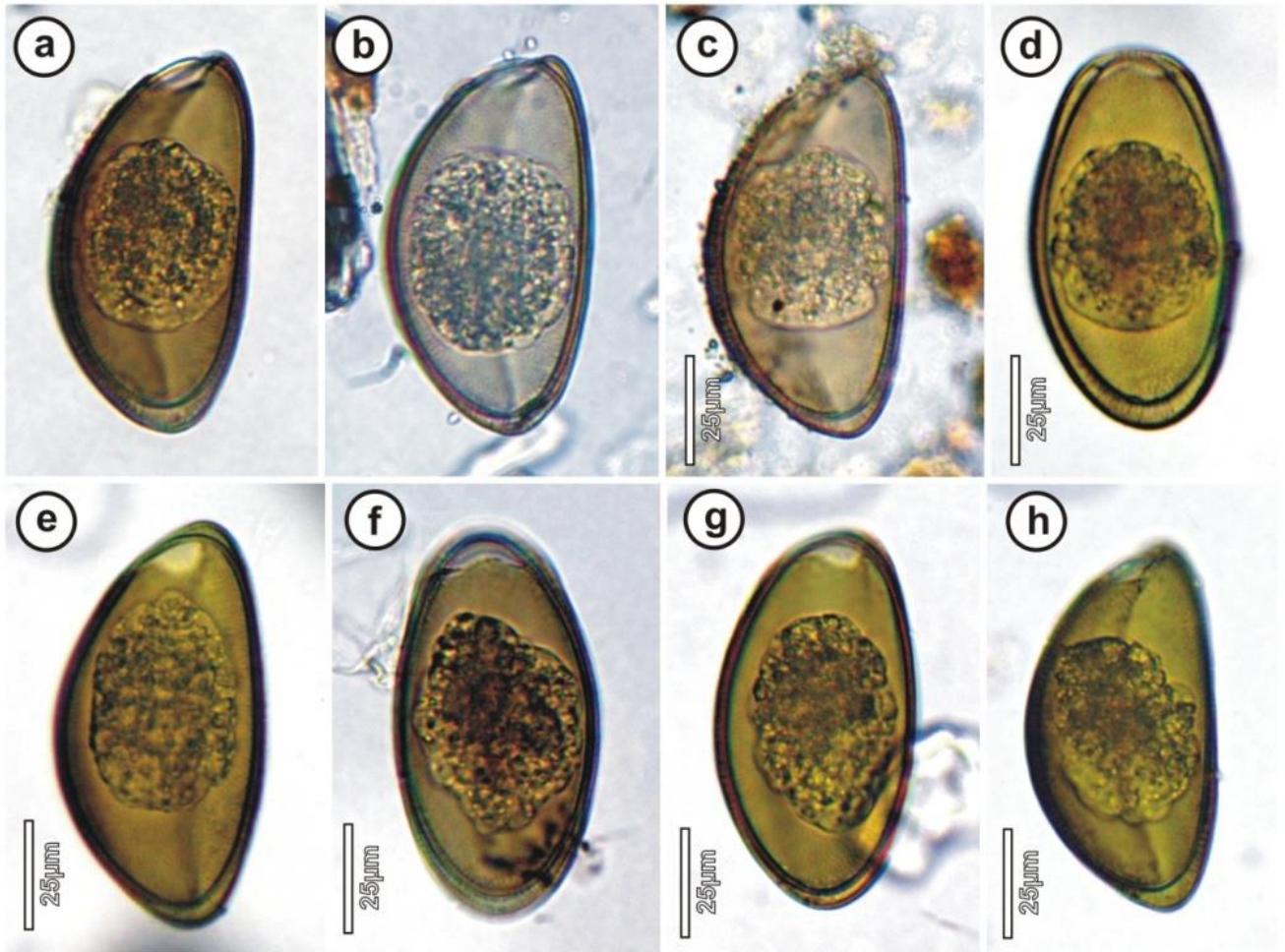


Figura 3: Estágio de blástula dos ovos de *Parapharyngodon binae*, fotografados em microscopia de luz. A até e – estágio inicial da blástula; f até h – estagio de transição de blástula para início da gastrulação.

ESTÁGIO DE GÁSTRULA

Os ovos em estágio de gástrula apresentaram em seu interior embriões em estágio intermediário de desenvolvimento, com assimetria que variava entre formato cônico, ou arqueado em aspecto de vibrião com aumento do volume embrionário (Figura 4). A casca dos ovos é espessa, contendo duas camadas bem definidas, e um opérculo ou região de quebra

mais delgada que a casca, localizado em posição sub-apical em um dos polos do ovo. Na transição do estágio de gástrula para o estágio girinóide os embriões possuem a região anterior e posterior (caudal) bem definidas (Figura 4, de d a l).



Figura 4: Estágio de gástrula para ovos de *Parapharyngodon binae*, fotografados em microscopia de luz c, e, f, i, j - estágios iniciais da gastrulação, a, b, d, g, h - estágio de transição da gastrulação para o estágio girinóide.

ESTÁGIO GIRINOIDE

Os ovos em estágio girinoide apresentaram em seu interior embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento, com formato filiforme cilíndrico (Figura 5). Nesta fase, o embrião encontra-se em maior volume e tamanho, tomando toda a extensão interna do ovo e não é possível ainda observar estruturas que formam o sistema digestório. A casca dos ovos é espessa, contendo duas camadas bem definidas, e um opérculo ou região de quebra mais delgada que a casca, localizado em posição sub-apical em um dos polos do ovo.

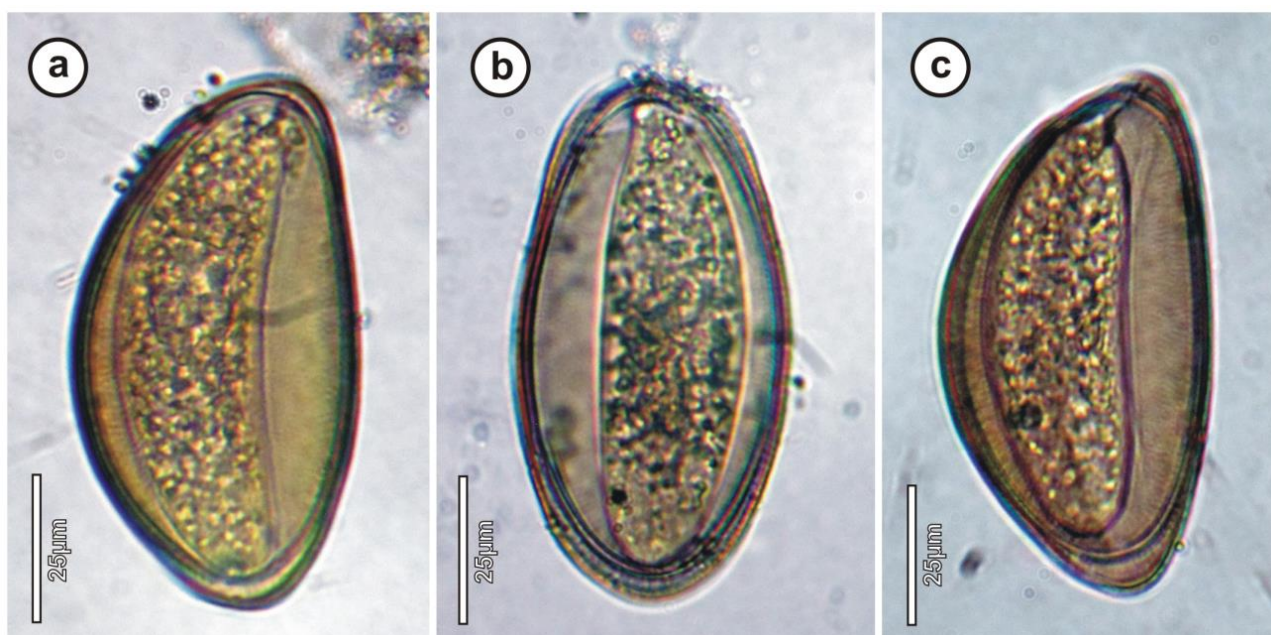


Figura 5: Estágio girinoide para ovos de *Parapharyngodon binae*, fotografados em microscopia de luz. Em a, b – estágio girinoide, c – Transição do estágio girinoide para o estágio larva L1.

LARVA DE PRIMEIRO ESTÁGIO (L1)

Os ovos contendo as larvas de primeiro estágio (L1) apresentaram em seu interior larvas com formato fusiforme, contendo uma membrana evidente delimitando o embrião. Nesta fase, o embrião encontra-se em menor tamanho e volume quando comparado ao estágio girinoide e primórdios do sistema digestório são visíveis (Figura 6). A casca dos ovos apresenta espessura menos espessa comparado as outras fases, contendo duas camadas pouco definidas, e um opérculo ou região de quebra mais delgada que a casca, localizado em posição sub-apical em um dos polos do ovo.

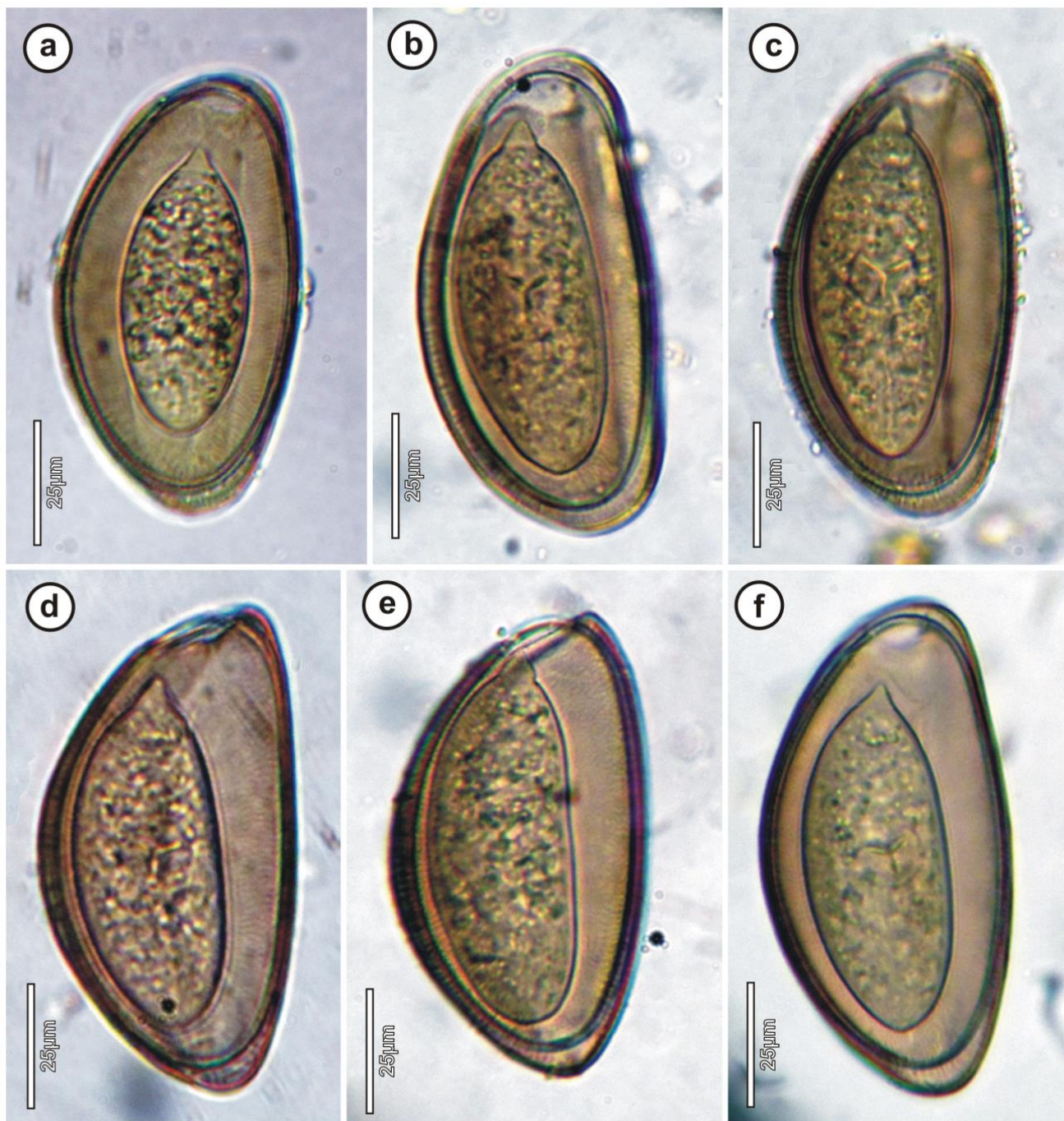


Figura 6: Estágio larva L1 para ovos de *Parapharyngodon binae*, fotografados em microscopia de luz. Em a, d, e – estágio de larva L1; b, c, f – estágio de transição de larva L1 para Larva L2, com região do esôfago evidente.

LARVA DE SEGUNDO ESTÁGIO (L2)

Os ovos com larvas de segundo estágio (L2) apresentam embriões com formato cilíndrico ocupando todo interior do ovo. Nesta fase, é possível visualizar o esôfago com a musculatura radial e o intestino médio já formado. A casca dos ovos apresenta espessura

menos espessa comparado as outras fases, contendo duas camadas pouco definidas, e um opérculo ou região de quebra mais delgada que a casca, localizado em posição sub-apical em um dos polos do ovo. Nesta fase o embrião formado apresenta maior tamanho e volume, comparado ao estágio Larva L1 (Figura 7, em a e b)

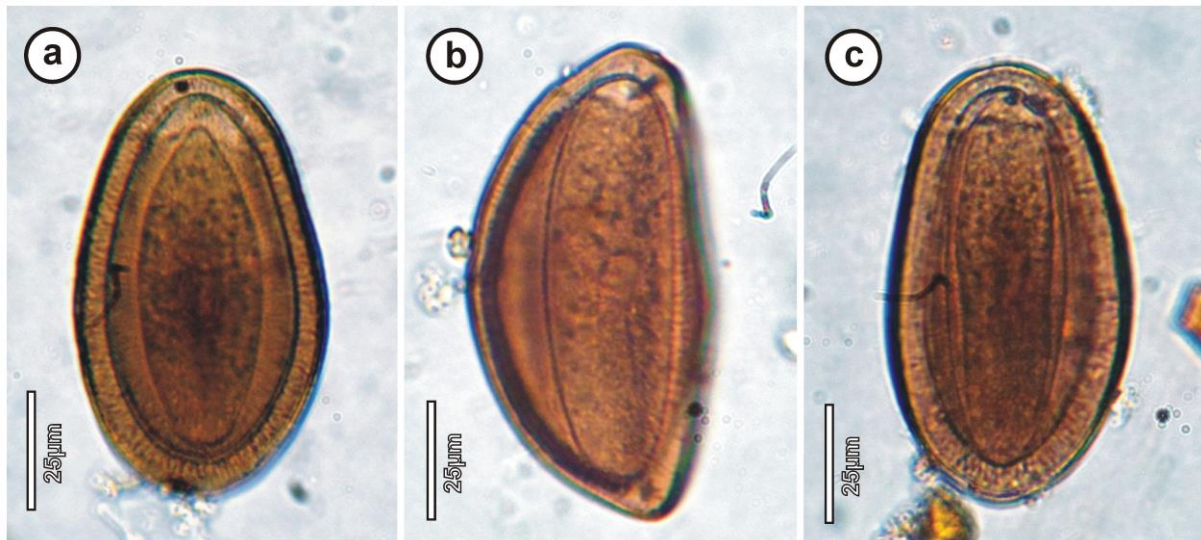


Figura 7: Ovos de *Parapharyngodon bainae*. a. ovo contendo larva de segundo estágio (L2). b. ovo contendo larva de segundo estágio (L2). c. ovo contendo larva de terceiro estágio (L3).

LARVA DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3)

Os ovos contendo larvas de terceiro (L3) apresentaram em seu interior embriões com formato cilíndrico apresentando dupla cutícula, a mais externa a cutícula, bem delimitada e de fácil visualização. Nesta fase, o embrião encontra-se em maior tamanho e volume quando comparado aos estágios anteriores e é possível visualizar e delimitar estruturas do sistema digestório (Figura 7, em c). A casca dos ovos apresenta espessura menos espessa comparado as outras fases, contendo duas camadas pouco definidas, e um opérculo ou região de quebra mais delgada que a casca, localizado em posição sub-apical em um dos polos do ovo.

MORFOMETRIA DOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *P. bainae*

Um total de 75 ovos foram mensurados e identificados em estágios de mórula (n=18), blástula (n=10), gástrula (n=13), girinoide (n=15) e estágios larvais L1 (n=10), L2 (n=8) e L3 (n=1) (Tabela I).

Tabela I- Características morfométricas dos estágios de desenvolvimento dos ovos de *Parapharyngodon bairdii* cultivados em laboratório.

ESTÁGIOS		C.O. (µm)	L.O. (µm)	C. L (µm)	L. L (µm)
MÓRULA (n=18)	Mínimo	85,8	43,24	-	-
	Máximo	102,41	55,59	-	-
	Média	93,49	50,78	-	-
	DP*	3,84	3,73	-	-
BLÁSTULA (n=10)	Mínimo	83,62	46,14	-	-
	Máximo	97,19	54,36	-	-
	Média	92,11	49,91	-	-
	DP*	4,46	4,46	-	-
GÁSTRULA (n=13)	Mínimo	87,7	45,28	-	-
	Máximo	96,26	55,2	-	-
	Média	93,11	49,47	-	-
	DP*	2,4	2,78	-	-
GIRINÓIDE (n=15)	Mínimo	86,23	46,13	-	-
	Máximo	100,37	52,42	-	-
	Média	93,78	48,83	-	-
	DP*	3,89	1,6	-	-
LARVA L1 (n=10)	Mínimo	77,76	44,57	45,94	23,22
	Máximo	99,41	58,24	65,33	29,03
	Média	90,91	50,26	59,1	25,38
	DP*	5,48	3,93	5,5	1,7
LARVA L2 (n=8)	Mínimo	87,5	42,5	65	24
	Máximo	95	50	77,5	30
	Média	90,63	47,6	72,63	26,5
	DP*	5,48	3,93	5,5	1,7
LARVA L3 (n=1)	Mínimo	90	50	77,5	25
	Máximo	90	50	77,5	25
	Média	-	-	-	-
	DP*	-	-	-	-

DP*=Desvio-padrão; C.O.= Comprimento dos ovos; L.O. = Largura dos ovos; C.L.= Comprimento das larvas L1, L2, L3; L.L. = Largura das larvas L1, L2, L3.

DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE *P. baina*

Um total de 440 ovos de *P. baina* foram obtidos de coproculturas mantidas por 36 dias, sob temperatura e umidade relativa do ar média de 23,4°C e 67,8% (Tabela II).

Tabela II- Parâmetros mensurados de temperatura e umidade relativa das coproculturas de fezes de *Parapharyngodon baina* cultivados em laboratório, no período de 36 dias.

DIAS MENSURADOS	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE RELATIVA (%)
1°	20,1	71
2°	20,8	69
3°	19,8	73
4°	20,3	60
5°	20,4	54
6°	21,7	62
7°	21,8	67
8°	23,0	78
9°	24,3	84
10°	23,2	79
13°	22,3	54
15	25,9	70
18	27,1	66
21	27,8	57
23	25,5	72
28	26,5	67
36	28,1	70
Médias	23,4	67,8

Os estágios de mórula apresentaram porcentagem de aproximadamente 55%, 45% e 25% respectivamente nas primeiras 72 horas de desenvolvimento das fezes de *T. torquatus* em coprocultura, e menos que 25% após esse período, e ovos em estágio de blástula foram recuperados em maior porcentagem até o 10° dia de cultivo. Os estágios de gástrula e girinoide exibem padrão constante e persistente no período do experimento, com percentuais relativos aos outros estágios entre 20% e 50% para ambos. O surgimento da larva L1 foi observado a partir do 9° dia de cultura, exibindo um aumento progressivo na porcentagem na média de 30% após o 13° dia de cultura, em contraste com diminuição progressiva do estágio

girinoide até o 36º de cultivo. No 21º dia, foram observados ovos em estágios de larva L1 em percentuais acima de 60%, e visualizados os primeiros ovos em estágios larvais L2. As coproculturas foram mantidas até o 36º com o surgimento da larva L3, com presença de dupla cutícula.

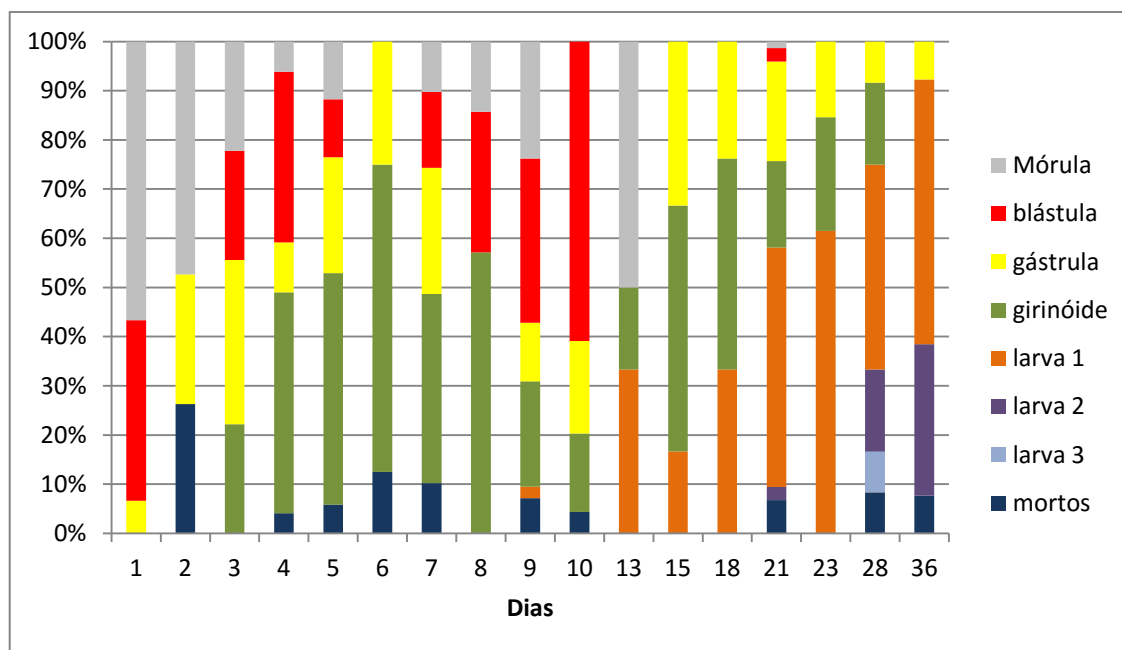


Figura 8 - Porcentagem dos estágios de desenvolvimento de ovos de *Parapharyngodon bainaie*, durante 36 dias, em temperatura média de 23,4°C e umidade relativa média de 67,8%.

DISCUSSÃO

Parâmetros como riqueza, intensidade e abundância relativa de uma comunidade parasitária variam em relação ao hospedeiro e seu hábitat (POULIN e MORAND, 2004), e uma das hipóteses que corroboram esse fato levam em consideração a biologia do parasito e como eles são transmitidos aos hospedeiros (POULIN, 2014).

Estudos anteriores realizados por Pereira et al. (2012; 2013) com *T. torquatus* originários da mesma população utilizada no presente estudo, demonstraram que a comunidade parasitária analisada de 110 hospedeiros, em relação aos nematoides gastrointestinais, são depauperadas e não interativas apresentando baixos níveis de infecção e poucas espécies de parasitos, o que foi observado também nos indivíduos coletados no

presente e um padrão típico observado em comunidades de parasitos associados a espécies de répteis segundo Aho (1990).

No que concerne a embriologia de nematoides, estudos realizados por Chitwood e Chitwood (1950) podem ser considerados os mais relevantes quanto a elucidação de aspectos da biologia do desenvolvimento para o grupo, e atualmente grande parte dos estudos utilizam a espécie *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900 como organismo modelo para a elucidação de aspectos filogenéticos, embriológicos e evolutivos (VON EHRENSTEIN e SCHIERENBERG, 1980; GUO e KEMPHUES, 1996). No presente estudo, estabeleceu-se os padrões de desenvolvimento dos estágios de vida livre de *P. baina*, utilizando como base esses autores.

Em condições ambientais de temperatura média de 23,4°C e umidade relativa do ar média de 67,8%, foi possível elucidar todo o desenvolvimento dos estágios de vida livre dos ovos de *P. baina* até a fase de larva L3. A maior parte dos ovos nos primeiros dias de cultivo estava nos estágios iniciais de clivagem do embrião, padronizados em mórula e blástula. Esses achados diferem dos que ocorrem para outras espécies da Ordem Oxyurida, como relatado para *Oxyuris equi* (Schrank, 1788) (ENIGK, 1949) e *Passarulus ambiguus* (Rudolphi, 1819) (KHARICHKOVA, 1946), cujas fêmeas depositam grande número de ovos já em estágio de gástrula e para *Enterobius vermicularis* (Linnaeus, 1758) (READON, 1938) cujo desenvolvimento dos ovos ocorre intra útero enquanto fêmeas grávidas migram para região perianal de seus hospedeiros, e depositam os ovos que eclodem em larvas L3, em um período de 6 horas após deposição.

Adamson (1981) observou que em *Gyrinicola batrachiensis* (Walton, 1929) a postura dos ovos ocorre nos estágios iniciais de clivagem de 1-8 células, semelhante ao observado para *P. baina* nos ovos em estágio de mórula, em que grande parte dos ovos recuperados os embriões apresentaram 6-8 células. Foi observado também para *G. batrachiensis* dois estágios de muda entre a mórula e o surgimento das larvas L3 em um período de 6 dias, em contraste com *P. baina*, no qual decorreu um período mínimo de 36 dias desde a mórula até o surgimento da larva L3 nas coproculturas.

É importante destacar que para *P. baina* estágios de gástrula e girinóide exibiram padrão constante e persistente de percentuais ao longo de 36 dias de análise da cultura, sugerindo que ao longo do processo de embriogênese, os embriões de *P. baina* persistem por um tempo maior nesses estágios, porém são necessários estudos posteriores para constatar

essa hipótese. O estágio tardio de desenvolvimento girinóide comparado aos outros estágios de desenvolvimento, em todo o período de análise do experimento, apresentou percentagem elevada, persistindo até o 36º de cultura, diminuindo proporcionalmente ao surgimento do estágio de larva L1, a partir do nono dia de cultura das fezes. O surgimento dos estágios larvais L2 e infectante L3 foram detectados em coprocultura a partir do 28º dia, relativamente lento se comparado a espécie *Oxyuris equi* com desenvolvimento pós postura a Larva L3 no período de 3 a 5 dias conforme Enigk (1949) e para a espécie *Passarulus ambiguus* no período de 1 a 3 dias como observado por Kharichkova (1946).

No presente estudo, os estágios de desenvolvimento estudados para *P. bainaie* se restringiram as fases de vida livre do parasito, sendo que até o surgimento das larvas L3, as formas de transmissão e o desenvolvimento até a fase adulta no hospedeiro ainda são desconhecidos.

A fase crítica do ciclo de vida dos nematoides é a forma de transmissão ao seu hospedeiro, que pode ser direta nos ciclos monoxenos e indireta nos heteróxenos segundo Levine (1980). Em oxiurídeos, Anderson (2000) concluiu que o ciclo de vida é estritamente monoxeno e as formas de infecção dos hospedeiros variam entre ingestão de material vegetal contaminado, coprofagia, geofagia ou autoinfecção. Acredita-se que *T. torquatus*, ao ingerir partículas do substrato durante o forrageio, faz a ingestão acidental dos ovos dispersos no ambiente, uma vez que ovos de oxiurídeos tendem a apresentar estrutura resistente a condições adversas ambientais.

Geralmente em nematoides as fêmeas produzem ovos com envoltório, contendo três camadas básicas secretadas pelo próprio ovo: camada lipídica interna, camada media de quitina e camada vitelina externa e uma ou duas camadas são secretadas pelo útero e são chamadas camadas uterinas quando ocorrem (BIRD e BIRD, 1991). Em Oxyurida, as duas camadas uterinas da casca dos ovos possuem espaços que se abrem parao exterior passando por poros na superfície externa do ovo, possuem formato elipsoide assimétrico devido ao achatamento em uma das faces laterais e o opérculo pode ter localização apical ou sub-apical (WHARTON, 1980; BIRD e BIRD, 1991). Para *P. bainaie*, os ovos apresentam rugosidades na camada mais externa, além de casca espessa, apresentando duas camadas bem delimitadas. Parâmetros morfométricos para os ovos apresentam media de 85-95 x 40-45 mm, e se comparado as espécies *Enterobius vermicularis* (Linnaeus, 1758) Leach, 1853, 50-60 x 20-32

mm e *Passarulus ambiguous*, 95-103 x 43 mm, o que sugere que dados morfométricos podem estar relacionados às fases de vida livre dos nematoides (LEVINE, 1980)

A padronização dos estágios de desenvolvimento para essa espécie foi proposto através da análise de características morfológicas e morfométricas observadas ao longo do período de desenvolvimento dos ovos até o surgimento da larva L3, constituindo o primeiro estudo de aspectos da biologia do desenvolvimento para espécie do gênero *Parapharyngodon* Chatterji, 1933 (Oxyuroidea, Pharyngodonidae).

Estudos ainda são necessários para relacionar os parâmetros de desenvolvimento propostos neste estudo para *P. binae* com aspectos comportamentais de *T. torquatus*. Assim, os ovos depositados em estágio iniciais de clivagem pelas fêmeas do parasito, além do desenvolvimento lento dos embriões, observados no período do experimento sugerem compor estratégia evolutiva para grupo em relação ao seu hospedeiro, hipótese que deve ser melhor investigada em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, M. "Evolutionary patterns in life histories of Oxyurida." **International journal for parasitology**, v. 24 n. 8 ,p. 1167-1177, 1994.

ADAMSON, M. L. "Development and transmission of *Gyrinicola batrachiensis* (Walton, 1929) (Nematoda: Oxyurida) Adamson, 1981 (Pharyngodonidae: Oxyuroidea). **Canadian Journal of Zoology**, v. 59, p. 1351-1367, 1981.

ADAMSON, M. L. 1983. "Ultrastructural observations on oogenesis and shell formation in *Gyrinicola batrachiensis* (Walton, 1929) (Nematoda: Oxyurida)." **Parasitology**, v. 86 n. 03, p. 489-499, 1983.

AGUIRRE, A. Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. **Parasitic Vectors**, v. 2 Suppl 1, p. S7, 2009.

AHO, J.M. Helminth communities of amphibians and reptiles: comparative approaches to understanding patterns and processes. In: ESCH, G.W., A.O. BUSCH, and J. M. AHO (Eds) **Parasite Communities: Patterns and Processes**, New York, Chapman & Hall, 157-195, 1990.

ANDERSON, R. C. **Nematode Parasites of Vertebrates**. 2nd Edition: Their Development and Transmission. New York, Cabi Publishing. 672 p., 2000.

BIRD, A. F.; BIRD, J. **The structure of nematodes**. 2nd Edition: Academic Press, New York. 317 p, 1991.

BIRD, A. F.; STYNES B. A. 1981. "The life cycle of *Anguina agrostis*: Embryogenesis." **International Journal for Parasitology**, v. 11 n. 1, p. 23-33, 1981.

BURSEY, C. R.; GOLDBERG, S. R. Description of a new species of *Parapharyngodon* (Nematoda: Pharyngodonidae) from Mexico with a list of current species and key to species from the Panamanian region. **Journal of Parasitology**, v. 101, p. 374–381, 2015.

CHITWOOD, B. G.; CHITWOOD, M. B. **Introduction to Neumatology**. University Park Press, Baltimore, Maryland, 1950.

CLARK, W. C. Origins of the parasitic habit in the Nematoda. **International journal for parasitology**, v. 24 n. 8, p. 1117-1129, 1994.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443-449, 2000.

ENIGK, K. Zur Biologie und Bekämpfung von *Oxyuris equi*. **Z. Tropenmed. Parasitol.**, v. 1, p. 259–272, 1949.

FREITAS, J. F. T. 1957. Sobre os gêneros *Thelandros* Wedl, 1862 e *Parapharyngodon* Chatterji, 1933 com descrição de *Parapharyngodon alvarengai* n. sp. (Nematoda, Oxyuroidea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 55, p. 21–45, 1957.

GULLAND, F. M. D. The impact of infectious diseases on wild animal populations: a review. Ecology of infectious diseases in natural populations. **Cambridge University Press, Cambridge**, p. 20-51, 1995.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. "Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. **Current opinion in genetics & development**, v. 6 n. 4, p. 408-415, 1996.

GUZEEVA, E. A.; SPIRIDONOV, S. E. The egg-shell ultrastructure of *Blatticola blattae* (Graeffe, 1860) (Oxyuridomorpha: Thelastomatidae). **Helminthologia**, v. 49 n. 4, p. 253-258, 2012.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis. **Puerto Rico Journal of Public Health**. v. 9, p. 281-298, 1934.

KHARICHKOVA, M. V. Biology of *Passarulus ambiguus* (Rudolphi,1819) in foxes in Russia. **Collected Papers on Helminthology Dedicated by his Pupils to K.I. Skrjabin in his 40th year of Scientific, Educational and Administrative Achievement**, p. 274-279, 1946.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Burgess Pub. Co; 2nd edition: v. 5 n. 25 p. 303-311, 1980.

PATERSON, S., VOGWILL, T.; BUCKLING A.; BENMAYOR, R.; SPIERS, A. J.; THOMSON N. J.; QUAIL, M.; SMITH, F.; WALKER, D.; LIBBERTON, B.; FENTON, A.; HALL, N.; BROCKHURS, M. A. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution. **Nature**, v. 464, n. 7286, p. 275-278, 2010.

PEREIRA, F. B.; SOUSA, B. M.; DE SOUZA LIMA, S. A new species of Pharyngodonidae (Nematoda) of *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) from Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 97 n. 2, p. 311-317, 2011.

PEREIRA, F. B.; SOUSA, B. M.; DE SOUZA LIMA, S. Helminth community structure of *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in a rocky outcrop area of Minas Gerais state, southeastern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98 n. 1, p. 6-10, 2012.

PEREIRA, F. B.; SOUSA, B. M.; DE SOUZA LIMA, S. The relationship between nematode infections and ontogeny and diet of the lizard *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820)(Squamata: Tropiduridae) from the Atlantic Rainforest in south-eastern Brazil. **Journal of helminthology**, v. 87 n. 03 03,p. 364-370, 2013.

PLANO DIRETOR DE JUIZ DE FORA. Prefeitura Municipal. Plano Diretor /JF-IPPLAN/JF - Anuário. 2014. Clima de Juiz de Fora. <http://www.pjf.mg.gov.br/acidade/clima.htm> (último acesso em 14/12/2014).

POULIN R.; MORAND S. Parasite Biodiversity. **Smithsonian Institution Press** Washington, D.C., 2004

POULIN, R. The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels? **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 903-914, 1999.

POULIN, R. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. **International journal for parasitology**, v. 44 n. 9, p. 581-589, 2014.

PRICE, P. W.; WESTOBY, M.; RICE, B.; ATSATT, P. R.; FRITZ, R. S.; THOMPSON, J. N.; MOBLEY, K. Parasite mediation in ecological interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 487-505, 1986.

RAMALLO, G.; BURSEY C. R.; GOLDBERG, S. R. *Parapharyngodon riojensis n. sp.* (Nematoda: Pharyngodonidae) from the lizard *Phymaturus punae* (Squamata: Iguania: Liolaemidae) from Northwestern Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 979-982, 2002.

READON, L. Studies on Oxyuriasis. XVI. The number of eggs produced by the pinworm, *Enterobius vermicularis*, and its bearing on infection. **Public Health Report**, v. 53, p. 978-984, 1938.

RIBEIRO-JÚNIOR, M. A.; GARDNER, T. A.; ÁVILA-PIRES, T. C. S. The effectiveness of glue traps to sample lizards in a tropical rainforest. **South American Journal of Herpetology**, v. 1 n. 2, p. 131-137, 2006.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1 n. 1, p. 99-102, 1950.

RODRIGUES, M. T. Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *torquatus* ao Sul do Rio Amazonas (*Sauria, Iguanidae*). **Arquivos de Zoologia**, v. 31, p. 105–230, 1987.

ROGERS, W. P. **The Nature of Parasitism**. The Relationship of some Metazoan Parasites to their Hosts, 287p. 1962.

SHARPILO, C. P. Parasitic worms of the reptilian fauna of the USSR: Systematics, chronology, biology. **Naukova Dumka, Kiev**, 287 p., 1976.

THOMPSON, J. N. Evolutionary ecology and the conservation of biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 7, p. 300-303, 1996.

UETANABARO, M.; SOUZA, F. L.; FILHO, P. L.; BEDA, A. F.; BRANDÃO, R. A. Anfíbios e répteis do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 279-289, 2007.

VON EHRENSTEIN, G. e SCHIERENBERG, E. Cell lineages and development of *Caenorhabditis elegans* and other nematodes. In: **Nematodes as biological models** Vol. I, Behavioral and developmental models (ed. ZUCKERMAN, B.M.). Academic Press, New York v. 1 p. 2-68, 1980.

WHARTON, D. Nematode egg-shells. **Parasitology**, v. 81 n. 02 p. 447-463, 1980.