



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ANÁLISES CLÍNICAS (PROFISSIONAL)

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DE POLIPARASITISMO NATURAL POR
HELMINTOS EM INTESTINO DE *Rhinella marina* DE BELÉM, PARÁ**

FABIO JOSÉ DOS SANTOS ROCHA

BELÉM-PARÁ
2017

FABIO JOSÉ DOS SANTOS ROCHA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DE POLIPARASITISMO NATURAL POR
HELMINTOS EM INTESTINO DE *Rhinella marina* DE BELÉM, PARÁ**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador:
Prof.Dr. Francisco Tiago de Vasconcelos Melo

BELÉM-PARÁ
2017

FABIO JOSÉ DOS SANTOS ROCHA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DE POLIPARASITISMO NATURAL POR
HELMINTOS EM INTESTINO DE *Rhinella marina* DE BELÉM, PARÁ**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Tiago Vasconcelos Melo

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias
Laboratório de Biotecnologia Molecular, ICB-UFPA

Profa. Dra. Andrea Luciana Soares da Silva
Laboratório de Genética Humana, ICB-UFPA

Prof. Dra. Maria Cristina dos Santos Costa
Laboratório de Zoologia de Vertebrados, ICB-UFPA

Profa. Dra. Maria Helena Thomaz Maia
(Suplente)
Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo,
ICB-UFPA

Belém, 28 de Agosto de 2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Rocha, Fábio José dos Santos

Análise histológica de poliparasitismo natural por helmintos em intestino de *Rhinella marina* de Belém, Pará / Fábio José dos Santos Rocha ; Orientador, Francisco Tiago de Vasconcelos Melo. - 2017.

33 f.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, Belém, 2017.

1. Anfíbio – histopatologia - Pará. 2. Helminto – Pará. 3. Parasitos intestinais. I. Melo, Francisco Tiago de Vasconcelos, orientador. II. Título.

CDD – 22 ed. 597.8098115

“Para atingir a grandeza: comece onde você está, use o que tem, faça o que puder.”
Arthur Ashe

Dedico este trabalho aos meus pais, toda minha família e amigos, que me apoiaram durante o longínquo caminho deste mestrado. Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Agradeço a Deus e aos meus pais, os maiores responsáveis por esta vitória.

...**Minha mãe**, sem ela nada disso seria possível, foi ela que por vontade da vida e destino teve que assumir o papel de pai, já não bastava ter seu papel de mãe, foi ela que segurou a barra dentro e fora de casa, foi ela que nos últimos anos foi minha mãe e meu pai, sei que temos nossas brigas mais em nenhum momento da minha vida deixei de ama-la, lamento em uma única coisa em não dizer todos os dias que a amo. Minha mãe Marinete por mais belas e sinceras que sejam as palavras ditas neste momento, serão sempre insuficientes para externar minha gratidão, só quero que saiba que lhe amo que e que essa vitória seria impossível sem a senhora.

...**Meu pai**, que falta o senhor me faz, nunca senti ate hoje uma dor tão grande quando foi o dia em que o senhor partiu, mas sei que seja lá aonde estiver esta olhando por mim, e como em? Tudo o que peço acaba me atendendo, poderia dizer-lhe tanta coisa, mas me calo. Só o silêncio pode dizer o que sinto – um amor enorme e saudade! Quando subir ao palco para receber meu diploma, sentir-te-ei ao meu lado, sorrindo e feliz e lembrarei quando me dizia que seu sonho era me ver formado e hoje realizei esse sonho. Às vezes, fico imaginando como seria vê-lo sentado naquela plateia, olhando para mim com os olhos cheios de lágrimas e o coração transbordando de orgulho. Fui, sou e serei muito feliz por ter os melhores pais que uma pessoa pode ter e ter tido.

... **Aos meus avós**, que deram inicio a minha família.

... **Aos meus familiares**, Padrinho, madrinha, tios, tias, primos e primas que sempre estiveram presentes, mesmo que distantes, um muito obrigado.

... **Aos meus amigos**, em especial Rodrigo, Rafael, Thiago, Elton, João, Barbara, Bruna, Mayrla, Cássio, Layz,

... **Ao meu orientador, Francisco Tiago**, mais do que orientador, um amigo, não tenho nem palavras para agradecer sua ajuda, horas de sonos perdidos, paciência que teve, um muito obrigado professor pela contribuição na minha vida acadêmica e por tanta influência na minha futura vida profissional e principalmente por ter acreditado no meu trabalho e potencial, mesmo quando outras pessoas haviam dito ao contrario. Sou eternamente grato por todo incentivo, companheirismo, amizade, compreensão que foi muito e dedicação.

Obrigado a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa e para o Fabio Rocha que sou hoje.

SUMÁRIO

ARTIGO	1
RESUMO:	1
MATERIAL E MÉTODOS	3
RESULTADOS	4
Interação <i>Mesocoelium lanfrediae</i> x <i>Rhinella marina</i>	5
Interação <i>Lanfrediella amphicirrus</i> x <i>Rhinella marina</i>	6
Interação Nematódeos x <i>Rhinella marina</i>	7
DISCUSSÃO	8
Interação <i>Platelmintos</i> x <i>Rhinella marina</i>	9
Interação Nematódeos x <i>Rhinella marina</i>	12
AGRADECIMENTOS	15
REFERÊNCIAS	16
ANEXO I	33

RESUMO

Rhinella marina é uma espécie que encontra - se distribuída amplamente na região Neotropical e apresenta parasitismo por uma grande diversidade de helmintos, refletindo assim a diversidade local. No entanto, poucos são os trabalhos que abordam aspectos histopatológicos e sobre a interação helminto-hospedeiro para esta espécie de anfíbio. Baseado nessas premissas, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar os diferentes aspectos histopatológicos da interação de nematódeos e Platyhelminthes intestinais de *R. marina* naturalmente poliparasitada. Foram coletados três exemplares de *Rhinella marina* na área urbana do município de Belém e em seguida necropsiados e sexados. O intestino do hospedeiro foi separado e posteriormente fixados, desidratados, incluídos em historesina, posteriormente seccionados e corados para análise microscópica. Os três exemplares de *R. marina* analisados estavam parasitados por mais de uma espécie de helminto (*Capillaria* sp. 33 %, *Oswaldocruzia belenensis* 33 %, *Lanfrediella amphicirrus* 100 %, *Mesocoelium lanfrediae* 100%), tendo sido identificados ao longo dos segmentos intestinais (inicial, médio e final). Os trematódeos da espécie *M. lanfrediae* foram encontrados aderidos em diferentes níveis de profundidade na mucosa intestinal, desde a região mais externa dos vilos até a região mais basal da mucosa a fixação mecânica do helminto não causou lesão epitelial ou celular aparente, nem tão pouco solução de descontinuidade com a lâmina própria ou mesmo com a submucosa. Os cestódeos da espécie *L. amphicirrus* se fixa às glândulas intestinais através de suas ventosas, as quais realizam leve apreensão e sucção do epitélio de revestimento do epitélio glandular. Esta fixação mecânica não causou lesão epitelial ou celular aparente, nem solução de descontinuidade com a lâmina própria ou mesmo com a submucosa. Nematódeos da espécie *Capillaria* sp. estão inseridos diretamente nas células da mucosa intestinal causando discreta hemorragia em direção ao lúmen do órgão, discreta infiltração leucocitária adjacente à superfície cuticular do nematódeo. A interação de exemplares de *Oswaldocruzia belenensis* aparentemente não causa fixação mecânica estando livres no lúmen e à superfície do epitélio de revestimento e não foi observado infiltrados inflamatórios ou aglomerações e formações de centros de melanomacrófagos. Os achados do presente trabalho não evidenciam alterações teciduais que estejam relacionadas com possíveis alterações patológicas. No entanto, baseado no tamanho e quantidade de moléculas imunogênicas liberados pelas mais variadas espécies de helmintos em um mesmo ambiente, esperava-se uma reação imunológica exacerbada do hospedeiro. Produtos estes derivados de atividades metabólicas de seus processos digestivos/reprodutivos próprios, no entanto, parecem haver um convívio harmonioso entre quatro espécies distintas de helmintos no mesmo microambiente de seu hospedeiro: o intestino.

Palavras-Chave: Interação helminto-hospedeiro, histopatologia de anfíbios, Bufonidae

ABSTRACT

Rhinella marina is a species that is distributed widely in the Neotropical region and can be found parasitized by a great diversity of helminths, which reflecting the local diversity. However, few studies have addressed histopathological aspects and the helminth-host histopathological aspects of the interaction of nematodes and intestinal Platyhelminthes of *R. marina* found naturally parasitized. Three specimens of *Rhinella marina* were collected in the urban area of Belém and then necropsied and sexed. The intestines were to be later fixed, dehydrated, included in historesin, then sectioned and stained for microscopic analysis. The three specimens of *R. marina* analyzed were parasitized by more than one species of helminth (*Capillaria* sp. 33%, *Oswaldocruzia belenensis* 33%, *Lanfrediella amphicirrus* 100%, *Mesocoelium lanfrediae* 100%) and were identified along the intestinal segments. *M. lanfrediae* were found attached at different levels in the intestinal mucosa, from the surface of the villi to the most basal mucosal region, mechanical fixation of the helminth did not cause any apparent epithelial or cellular lesion, nor any solution discontinuity with the lamina propria or even with the submucosa. *L. amphicirrus* attached to the intestinal glands through their suckers, which carry out mild apprehension and suctioning of the glandular epithelium. This mechanical fixation did not cause apparent epithelial or cellular lesion, nor discontinuity solution with the lamina propria or even the submucosa. The nematodes *Capillaria* sp. are inserted directly into the cells of the intestinal mucosa causing slight hemorrhage towards the lumen of the organ, a discrete leukocyte infiltration adjacent to the cuticular surface of the nematode. *Oswaldocruzia belenensis* specimens apparently does not cause mechanical fixation and can be found free in the lumen and the surface of the epithelium and no inflammatory infiltrates or agglomerations and formation of melanomacrophages centers have been observed. The findings of the present study do not show any evident tissue changes that are related to possible pathological alterations. However, based on the size and quantity of immunogenic molecules released by the most varied species of helminths in the same environment, an exaggerated immune reaction of the host was expected. These products derive from metabolic activities of their own digestive/reproductive processes; however, there seems to be a harmonious coexistence between four distinct species of helminths in the same microenvironment of their host: the intestine.

Key words: Helminth-host interaction, histopathology of amphibians, Bufonidae

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta Dissertação será apresentada em formato de artigo científico, o qual aborda os aspectos histopatológicos da interação entre helmintos e seu hospedeiro, utilizando como modelo o sapo cururu (*Rhinella marina*)

TÍTULO DO ARTIGO:

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DE POLIPARASITISMO NATURAL POR HELMINTOS
EM INTESTINO DE *Rhinella marina* DE BELÉM, PARÁ**

Autores:

Fábio José dos Santos Rocha, Jeannie Nascimento dos Santos & Francisco Tiago de Vasconcelos Melo

Revista Pretendida:

The Journal of Parasitology (a submeter – normas em ANEXO I)

ISSN (Online): 1937-2345

ISSN (Impresso): 0022-3395

Fator de Impacto: 1.3

Qualis CAPES: B1

ARTIGO

R.H.: ROCHA ET AL. – PATOLOGIA INDUZIDA POR HELMINTOS EM *R. MARINA*

ANÁLISE HISTOLÓGICA DE POLIPARASITISMO NATURAL POR HELMINTOS EM INTESTINO DE *Rhinella marina* DE BELÉM, PARÁ

FÁBIO J. S. ROCHA, JEANNIE NASCIMENTO DOS SANTOS & FRANCISCO

TIAGO DE VASCONCELOS MELO¹

Laboratório de Biologia Celular e Helminologia “Profa. Dra. Reinalda Marisa Lanfredi,”
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará Augusto Corrêa, 01 - Guamá.
Belém – Pará – Brasil, CEP 66075-110.

Autor correspondente: Francisco Tiago de Vasconcelos Melo ftiago@ufpa.br

RESUMO: O presente trabalho tem como objetivo caracterizar os diferentes aspectos histopatológicos da interação de nematódeos e Platyhelminthes intestinais de *Rhinella marina* naturalmente poliparasitada. Foram coletados três exemplares de *Rhinella marina* na área urbana do município de Belém e em seguida necropsiados, sexados para serem posteriormente fixados, desidratados, incluídos em historesina, posteriormente seccionados e corados para análise microscópica. Os três exemplares de *R. marina* analisados estavam parasitados por mais de uma espécie de helminto (*Capillaria* sp. 33 %, *Oswaldocruzia belenensis* 33 %, *Lanfrediella amphicirrus* 100 %, *Mesocoelium lanfrediae* 100%), tendo sido identificados ao longo dos segmentos intestinais (inicial, médio e final). Os trematódeos da espécie *M. lanfrediae* foram encontrados aderidos em diferentes níveis de profundidade na mucosa intestinal, desde a região mais externa dos vilos até a região mais basal da mucosa a fixação mecânica do helminto não causou lesão epitelial ou celular aparente, nem tão pouco solução de continuidade com a lâmina própria ou mesmo com a submucosa. Os cestódeos da espécie *L. amphicirrus* se fixa às glândulas intestinais através de suas ventosas, as quais

realizam leve apreensão e sucção do epitélio de revestimento do epitélio glandular. Esta fixação mecânica não causou lesão epitelial ou celular aparente, nem solução de descontinuidade com a lâmina própria ou mesmo com a submucosa. Nematódeos da espécie *Capillaria* sp. estão inseridos diretamente nas células da mucosa intestinal causando discreta hemorragia em direção ao lúmen do órgão, discreta infiltração leucocitária adjacente à superfície cuticular do nematódeo. A interação de exemplares de *Oswaldocruzia belenensis* aparentemente não causa fixação mecânica estando livres no lúmen e à superfície do epitélio de revestimento e não foi observado infiltrados inflamatórios ou aglomerações e formações de centros de melanomacrófagos. Os achados do presente trabalho não evidenciam alterações teciduais que estejam relacionadas com possíveis alterações patológicas. No entanto, baseado no tamanho e quantidade de moléculas imunogênicas liberados pelas mais variadas espécies de helmintos em um mesmo ambiente, esperava-se uma reação imunológica exacerbada do hospedeiro. Produtos estes derivados de atividades metabólicas de seus processos digestivos/reprodutivos próprios, no entanto, parecem haver um convívio harmonioso entre as quatro espécies distintas de helmintos no mesmo microambiente de seu hospedeiro: o intestino.

Rhinella marina (Linnaeus, 1758), anfíbio comumente encontrado nas Américas do Norte, Central e do Sul e Austrália, apresenta parasitismo por helmintos que reflete a diversidade local, a inespecificidade alimentar e as interações ecológicas do nicho onde se encontra. Como exemplo disto; somente na Amazônia oriental brasileira, nos últimos anos já foram descritos alguns helmintos que ainda não haviam sido relatados em *R. marina*, no Brasil, como: os nematódeos *Oswaldocruzia belenensis*, observado no intestino delgado (Santos et al., 2008) e *Rhabdias paraensis* parasitando os pulmões (Santos et al., 2011); o cestódeo *Lanfrediella amphicirrus* (Melo et al., 2011) e o trematódeo *Mesocoelium lanfrediae* ao longo do intestino (Gomes et al., 2013) e, ainda, diferentes estágios larvares dos

nematódeos *Ortleppascaris* sp. no fígado (Silva et al., 2013a) e *Eustrongylides* sp. na cavidade abdominal (Melo et al., 2016).

Embora a diversidade da helmintofauna de *R. marina* venha sendo constantemente registrada ao longo das Américas e Austrália, poucos são os trabalhos que abordam aspectos histopatológicos da interação helminto-hospedeiro nesta espécie de anfíbio. Análises dos aspectos de infecção experimental de helmintos em *R. marina* foram realizadas por: Pizzato and Shine (2011) analisando a dinâmica de infecção de pulmões de *R. marina* com *Rhabdias pseudosphaerocephala* e Nelson et al., (2015) avaliando a dinâmica de infecção por *Rhabdias* spp. em pulmões de diversas espécies de anfíbios incluindo *R. marina*.

Por outro lado, estudos sobre aspectos histopatológicos de infecções naturais entre helmintos e *R. marina* foram realizados por: Pizzato et al., (2010) analisando pulmões infectados por *Rhabdias pseudoesphaerocephala*. Silva et al., (2013b) caracterizaram a infecção hepática por larvas de *Ortleppascaris* sp.; Kelehear et al., (2015) descreveram a infecção por Acanthocephala em bexiga urinária e Santos et al., (2016) descrevendo a interação de *Rhabdias paraensis* com pulmões de *R. marina*. Kelehear and Jones (2010) caracterizaram sete espécies diferentes de larvas de nematódeos encistadas no estômago deste e de outros anfíbios. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar os diferentes aspectos histopatológicos da interação de nematódeos e Platyhelminthes no intestino de *R. marina* naturalmente poliparasitada.

MATERIAL E MÉTODOS

No mês de abril do ano de 2015, foram coletados por busca ativa, três (03) exemplares de *Rhinella marina* em região peridomiciliar na área urbana do município de Belém (01°24'S, 48°28'W), Estado do Pará, na Amazônia oriental brasileira. Os anfíbios foram coletados sob a licença SisBio/ICMBIO N° 53557. Esses exemplares foram levados ao laboratório de biologia celular e helmintologia, anestesiados com cloridrato de lidocaína a 2% pesados em balança

analítica FILIZOLA® (Beyond Technology, Campos Grande/MS, N° 10454) e em seguida necropsiados, sexados e seus órgãos foram analisado para busca de helmintos.

O intestino foi isolado por barbantes antes de ser retirado, colocado em placa de Petri com solução fixadora de Glutaraldeído a 2,5% tamponado com Cacodilato de sódio 0,1 M a pH 7,4. A solução fixadora também foi aplicada internamente e o órgão foi fixado por 24 horas. Posteriormente à fixação o intestino delgado foi subdividido em terço inicial, médio e final; desidratado em série etanólica crescente; infiltrados em proporções decrescentes de Etanol-Historesina® (5:1 a 1:1, 24h em cada etapa) até a inclusão em Historesina® (adaptado do protocolo do fabricante LEICA®). A inclusão foi realizada em historesina conforme o protocolo do fabricante, com polimerização a 40° C, por 48 horas.

Secções seriadas de 3 µm foram realizadas em micrótomo Leica RM 2235 (Biosystems, China, N° 10034) dispostas sequencialmente em lâminas, coradas com Azul de toluidina 1% e Fucsina ácida e montadas com Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). A análise foi realizada em microscópio Olympus BX53 (Olympus America, Center Valley, Pennsylvania) equipado com câmera digital e sistema de captura de imagem Olympus *CellSens Standard* 1.9 (Olympus, Japan).

RESULTADOS

Os três exemplares de *R. marina* analisados estavam parasitados por mais de uma espécie de helminto (*Capillaria* sp. 33 %, *Oswaldocruzia belenensis* 33 %, *Lanfrediella ampicirrus* 100 %, *Mesocoelium lanfrediae* 100%), tendo sido identificados ao longo dos segmentos intestinais (inicial, médio e final), o parasitismo pelos trematódeos *Mesocoelium lanfrediae*, pelos cestódeos *Lanfrediella ampicirrus* e pelos nematódeos exemplares adultos de fêmeas de *Capillaria* sp. e formas adultas de *Oswaldocruzia belenensis*.

Deste modo, mesmo compartilhando o ambiente intestinal no poliparasitismo, cada espécie apresentou diferentes formas de interação com o órgão, como descrito a seguir:

Interação *Mesocoelium lanfrediae* x *Rhinella marina*

Os trematódeos da espécie *M. lanfrediae* foram encontrados distribuídos ao longo de toda a extensão do intestino (terços inicial, médio e final) (Figs. 1 A – C). Apresentam corpo com aspecto foliáceo, vitelário situado nos campos laterais do corpo, ventosas oral e ventral simétricas, dois testículos, numerosos ovos operculados preenchendo grande parte do corpo do helminto, e tegumento coberto por espinhos (Figs. 1E – H) .

O sítio de parasitismo deste trematódeo abrange diferentes níveis de profundidade na mucosa intestinal, desde a região mais externa dos vilos intestinais até a região mais basal da mucosa, adjacentes ou no lúmen das glândulas intestinais e (no terço inicial) uma vez dentro destas, também, próximos à desembocadura das glândulas submucosas (Figs. 1B – D).

Alguns espécimes apresentavam-se inseridos profundamente na mucosa, em estreito contato com o epitélio das glândulas intestinais, onde frequentemente se observou a secreção das células caliciformes sendo depositadas integralmente sobre o tegumento do parasito (Figs. 1F – H).

A fixação do *M. lanfrediae* aos vilos e glândulas intestinais ocorre tanto por meio da ventosa oral quanto ventosa ventral, estruturas musculares que realizam leve apreensão e sucção do epitélio de revestimento da mucosa, as quais tornam-se levemente projetadas, preenchendo toda a cavidade destas estruturas do parasito com as células epiteliais da mucosa do hospedeiro. Este tipo de fixação mecânica não causou lesão epitelial ou celular aparente, nem tão pouco solução de continuidade com a lâmina própria ou mesmo com a submucosa.

A compressão causada pela justaposição do corpo do trematódeo com o epitélio da mucosa intestinal leva à diminuição da altura do mesmo (Fig. 1B, 1H). No entanto, não foram observados aspectos estruturais da arquitetura tecidual, sugestivos de hipertensão dos plexos viloso, periglandular, quilífero ou mesmo dos vasos da submucosa. Adicionalmente não

foram observados infiltrados inflamatórios ou aglomerações e formações de centros de melanomacrófagos.

Todos os exemplares de *M. lanfrediae* observados ao longo do intestino encontravam-se maduros e a deposição de ovos era realizada sobre a superfície do epitélio da mucosa de revestimento dos vilos e das glândulas intestinais (Figs. 1F-1H).

Interação *Lanfrediella amphicirrus* x *Rhinella marina*

Os cestódeos da espécie *L. amphicirrus* foram encontrados distribuídos entre os terços médio e final do intestino. Os helmintos possuem escólex com quatro ventosas, corpo cilíndrico, com segmentação imperceptível nas regiões anteriores do estróbilo, canais excretores nas laterais do corpo do helminto e dois grupos de estruturas reprodutivas por segmento (Figs. 2 A – D) nos proglotes grávidos foi possível observar ovos no interior de duas capsulas parauterinas (Fig. 1D).

Em seu sítio de parasitismo, a adesão do helminto limita-se à inserção profunda do escólex na mucosa intestinal; na região mais basal da mucosa adjacente ou no lúmen das glândulas intestinais. Nestes exemplares, a maior parte da extensão do corpo, projeta-se além dos vilos, ocupando o lúmen intestinal (Figs. 2A – D).

Numerosos espécimes também foram observados livres no lúmen intestinal, justapostos entre si e à extremidade dos vilos, além de estarem entremeados a trematódeos e nematódeos (Figs. 2A – C). Nos espécimes inseridos profundamente na mucosa, foi observado íntimo contato entre o epitélio das glândulas intestinais e o escólex, e consequente contato direto entre a secreção das células caliciformes e o tegumento do parasito (Fig. 2E).

A fixação de *L. amphicirrus* às glândulas intestinais ocorre por meio de suas quatro ventosas musculares, as quais realizam leve apreensão e sucção do epitélio de revestimento do epitélio glandular, gerando leve protrusão e consequente preenchimento da cavidade das ventosas (Figs. 2F, 2G). Esta fixação mecânica não causou lesão epitelial ou celular aparente, nem tão pouco solução de continuidade com a lâmina própria ou mesmo com a submucosa

(Figs. 2 I – K). Porém, causa forte compressão sobre o epitélio, levando a visível diminuição de sua altura (Fig. 2H).

Os exemplares de *L. amphicirrus* observados ao longo do terço médio e final do intestino encontravam-se em diferentes estágios de maturação ao longo de seus proglotes, sendo possível observar também a segmentação e liberação de proglotes gravídicos, na luz intestinal (Figs 1D, 5E).

Nas áreas circunvizinhas à adesão destes cestódeos não foram observadas alterações dos aspectos estruturais da arquitetura tecidual, sugestivos de hipertensão dos plexos viloso, periglandular, quilífero ou mesmo dos vasos da submucosa. Também não foram observados infiltrados inflamatórios ou aglomerações e formações de centros de melanomacrófagos próximos dos locais de adesão e fixação do parasito.

Interação Nematódeos x *Rhinella marina*

Nematódeos da espécie *Capillaria* sp. foram encontrados no terço inicial do intestino, apresentam corpo filiforme e esôfago formado por esticócitos, observando a porção inicial do esôfago inserida na camada celular que compõem o epitélio de revestimento da mucosa intestinal e nas glândulas intestinais, causando lesões que formam soluções de continuidade entre o epitélio e o lúmen intestinal, e entre o epitélio e a lâmina própria da mucosa (Figs. 3C, 3D). Os helmintos apresentam-se distribuídos por toda a extensão dos vilos intestinais, desde a extremidade luminal até a glândula intestinal (Figs. 3A, 3B).

Este tipo de fixação mecânica causa discreta hemorragia em direção ao lúmen intestinal, discreta infiltração leucocitária adjacente à superfície cuticular do nematódeo e aumento de volume dos plexos vilosos, capilar periglandular e da lâmina própria do vilo parasitado (Figs. 3C, 3D, 3G). Não foi observada a presença de melanomacrófagos, nem comprometimento da região da submucosa nas proximidades do parasito. (Figs. 3E – G).

Os nematódeos da espécie *Oswaldocruzia belenensis* possuem estriações longitudinais pela cutícula (Figs. 4A, B; 5C); em alguns cortes foi possível visualizar ainda a estrutura do

ovojector da fêmea (Fig. 4F) e região anterior com vesícula cefálica dividida em duas porções (Fig 5C, 5D).

A interação de exemplares de *Oswaldocruzia belenensis* evidenciou-se ao longo da extensão do intestino (terços inicial, médio e final) e estava, aparentemente, limitada à superfície do epitélio de revestimento da base dos vilos e das glândulas intestinais (Figs. 4A, 4B, 4C). Sua delicada adesão pode ser representada pela observação destes nematódeos livres no lúmen intestinal (Figs. 4B – D).

Próximo a estes helmintos, observou-se áreas de epitélio lesionadas, porém sem comprometimento da integridade da lâmina própria (Figs. 5B, 5D). Não foram observados infiltrados inflamatórios ou aglomerações e formações de centros de melanomacrófagos, outras lesões de comprometimento da mucosa intestinal ou deposição de ovos nas cercanias do epitélio ou lúmen intestinal (Fig. 4F).

Além das espécies *Capillaria* sp. e *Oswaldocruzia belenensis* encontradas no intestino de *R. marina*, também foram observados ovos larvados livres no lúmen intestinal, dispostos por entre exemplares de *O. belenensis* e *L. amphicirrus*. Estes ovos se caracterizaram por apresentarem casca delgada, contendo uma larva de corpo espessado com extremidade anterior arredondada e extremidade posterior afilada, o esôfago tipicamente rabditoide, um poro excretor visível (Figs. 5E – G).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi observado o parasitismo por uma espécie trematódeo, uma espécie de cestódeo e dois nematódeos adultos no intestino de *R. marina*. Os achados histológicos evidenciam características morfológicas de helmintos intestinais semelhantes a *Mesocoelium lanfrediae* descrito por Gomes et al., (2013), *Lanfrediella amphicirrus* descrito por Melo et al., (2011) e *Oswaldocruzia belenensis* descrito por Santos et al., (2008), espécies anteriormente relatadas na mesma área de estudo do presente trabalho. Observamos ainda

parasito pertencente ao gênero *Capillaria*, com características morfológicas semelhantes as observadas por Justine (1987), que relatou a ocorrência de *C. petiti* em *R. marina* no município de Belém (Estado do Pará, Brasil), contudo, não há evidências morfológicas suficientes para a identificação da espécie no presente trabalho.

Interação Platelintos x *Rhinella marina*

Os trematódeos da espécie *M. lanfrediae* foram encontrados distribuídos ao longo de toda a extensão do intestino e nos diferentes níveis de profundidade na mucosa intestinal, desde a região mais externa dos vilos até a região mais basal da mucosa. Nossos achados corroboram as observações feitas por Gomes et al. (2013) ao realizarem análise por microscopia eletrônica de varredura de segmentos intestinais contendo *M. lanfrediae*. Estes autores também observaram helmintos aderidos tanto pela ventosa oral como pela ventosa ventral em direto contato com o epitélio, além de distribuição similar ao longo do intestino.

A fixação de *M. lanfrediae* aos vilos e glândulas intestinais tanto por meio da ventosa oral quanto pelo acetábulo mostrou uma adesão mecânica pouco espoliativa na mucosa intestinal uma vez que não foram observadas lesões epiteliais ou celular, indicando que *M. lanfrediae* usa suas ventosas para se movimentar e buscar fonte de nutrientes ao longo da superfície intestinal. Este comportamento de movimentação ativa leva, portanto, e demonstra sua adesão temporária e pouco danosa, ao longo de todo o intestino. Pavanelli et al. (1997) realizaram estudos de interação de *Parauchenipterus galeatus* no Estado do Paraná (Região Sul do Brasil) e encontraram o trematódeo *Microrchis oligovitellum* aderido pela sua ventosa ventral ao intestino, de modo similar e também sem causar danos ao órgão.

Espécimes de *M. lanfrediae* foram observados inseridos profundamente na mucosa intestinal de *R. marina*, porém não foram observados infiltrados inflamatórios ou melanomacrófagos; contudo, próximo aos pontos focais de adesão, observou-se secreção de células calciformes, contatando o tegumento do parasito.

No entanto, Kook et al. (1998) e Chai et al. (2000) ao realizarem uma análise da interação entre *Neodiplostomum seoulensis* e roedores experimentalmente infectados, observam que o parasito pode causar danos aos hospedeiros, produzindo danos anatômicos funcionais a mucosa intestinal, mesmo em indivíduos com baixa carga parasitária.

Adicionalmente, Cortés et al. (2015), analisaram a interação entre *Echinostoma caproni* em hospedeiros com diferente susceptibilidade a infecção, observando que a presença do parasito em hospedeiro suscetíveis, está relacionada com o aumento da proliferação celular, hiperplasia do epitélio, enquanto hospedeiros não-suscetíveis, o parasito induz resposta inflamatória, migração celular e nenhuma alteração na estrutura do tecido, muitas vezes associada a expulsão do parasito do órgão infectado.

Em nosso trabalho, a presença destes trematódeos no intestino, aparentemente é tolerada pelo hospedeiro, podendo ser um reflexo de uma somatória de fatores que incluem sua atividade de busca pelo alimento com movimentação ativa e adesão pouco ou nada danosa ao epitélio, e a presença de outras espécies de helmintos que em conjunto podem somar inúmeros produtos de excreção/secreção que modulam o sistema imune facilitando o estabelecimento e, mesmo, a multiplicação da microfauna parasitária no órgão.

Estágios parasitários e diferentes órgãos podem reagir de forma diferente à presença de determinadas espécies de helmintos. Por exemplo, Miller et al. (2009) mostraram em seu trabalho que girinos coletados de um lago de uso dos bovinos apresentavam cistos contendo metacercárias de *Echinostomum* sp. nos rins que ocasionaram processos inflamatórios leves no tecido, infiltrados de células próximo ao cisto, granulomas em órgãos múltiplos (fígado, baço e rim) e no intestino foi observado células inflamatórias dentro da parede intestinal. Estes autores sugeriram que a presença dos helmintos nestes diferentes órgãos estimula reação granulomatosa que culmina no isolamento do parasito através da formação de parede cística,

Observamos ainda que a interação de *L. amphicirrus* às glândulas intestinais ocorre de modo semelhante a *M. lanfrediae*, porém através de quatro ventosas realizando leve apreensão e sucção do epitélio de revestimento do epitélio glandular, gerando protrusão epitelial sem lesão tecidual ou celular. Regionalmente limitam-se aos terços médio e final do intestino de *R. marina*, expondo a maior parte do seu corpo à luz intestinal de onde absorve competitivamente os nutrientes fornecidos pela alimentação do hospedeiro. Acreditamos, portanto que, sua adesão limitada a estrutura simples do escólex de *L. amphicirrus* seria pouco espoliativa, atuando como um fator para a ausência de reações imunes teciduais no ponto de inserção/adesão do helminto.

De modo contrário, um exemplo de ações deletérias ao hospedeiro, causadas por instrumentos de fixação de cestódeos, pode ser visto no trabalho de Cousin et al. (2003) que mostraram a interação entre o tubarão azul da espécie *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) e o cestódeo *Hepatoxylon trichiuri* (Trypanorhynca) que possui estruturas tentaculares em seu escólex e parasita diferentes órgãos do sistema do digestivo desse hospedeiro, causando severas alterações, lesões e destruição de tecidos, com grande presença de linfócitos e células fagocitárias.

Outro grupo de cestódeos que pode apresenta alterações patológicas severas nos tecidos do hospedeiro são as espécies *Bothriocephalus gowkongensis* (Botriocephallidae) e *Monobothrium wagneri* (Caryophyllidea) encontrados no intestino de ciprinídeos (Britton et al. 2011; Williams et al. 2011). Estes autores observam que a adesão dos parasitos na mucosa do hospedeiro causa extensa área de necrose, hemorragia e inflamação, distensão tecidual e possível perfuração, alterações não observadas para a interação entre *L. amphicirrus* e *R. marina*.

Apesar de no presente trabalho termos observado, qualitativamente, a presença de uma grande quantidade de cestódeos no intestino dos hospedeiros analisados, não pudemos estimar

a carga parasitária, mas Melo et al. (2011) observam que a intensidade parasitária de *L. ampicirrus* em *Rhinella marina* é alta (aproximadamente 160 parasitos por hospedeiro). No entanto, não observamos ligação direta entre a carga parasitária, local da adesão do parasito, com alterações patológicas. No trabalho de Britton et al. (2011), os autores verificaram, no entanto, que as alterações patológicas ocorriam principalmente em regiões as quais continham a maior quantidade de proglotes maduros, que por muitas vezes causavam a oclusão intestinal distensão mecânica e compressão dos vilos intestinais e em indivíduos com alta carga parasitária, os hospedeiros apresentaram completa alteração da arquitetura normal do epitélio intestinal.

Interação Nematódeos x *Rhinella marina*

Capillaria sp. foi observada parasitando toda a extensão dos vilos intestinais no terço inicial do intestino de *R. marina*, inserida no epitélio de revestimento da mucosa intestinal e glândulas intestinais, lesionando células e abrindo soluções de continuidade através do epitélio, entre o lúmen intestinal e a lâmina própria da mucosa.

Apesar desta espoliação estrutural, a fixação causou discreta hemorragia infiltração leucocitária em direção ao lúmen intestinal e às proximidades do próprio helmintos. A presença do helminto por toda a extensão dos vilos intestinais, desde a extremidade luminal até a glândula intestinal, induz o aumento de pressão nos plexos vilosos, capilar periglandular e da lâmina própria do vilo parasitado. Ainda assim, também não foi ativada a formação de centros de melanomacrófagos. Diferentemente do observado em trabalhos relatando aspectos histopatológicos de Capilarídeos intestinais descritos por Wongsawasdi et al. (2002) e Rana et al. (2009). Estes autores relatam casos de infecção humana pela espécie *Paracapillaria philippinensis*, destacando que os parasitos podem causar diminuição da altura do epitélio intestinal, proliferação de criptas, inflamação aguda e granuloma eosinofílico.

Acreditamos, portanto, que, apesar de todas as alterações estruturais observadas, o parasitismo por estes helmintos, *Capillaria* sp. e *R. marina* passaram por um processo de co-

evolução adaptativa, uma vez que não comprometeria em grande escala a integridade da mucosa intestinal e conseqüentemente sem grande déficit à capacidade absorptiva e/ou secretória do órgão. Enquanto nos casos humanos, especialmente por estes serem hospedeiros ocasionais/acidentais, a interação parasito-hospedeiro ainda não foi bem estabelecida, o que leva a um desequilíbrio e reação inflamatória com alteração patológica mais evidente.

A histopatologia da interação de helmintos da Família Capillaridae, com sítio de parasitismo intestinal, já foi relatada em diferentes hospedeiros, tais como peixes, aves e mamíferos (Kent et al. 2002; Reis Jr et al. 2009; Barathidasan et al. 2014; Rothenburger et al. 2014), porém, a interação entre *Capillaria* sp. e o intestino de *R. marina* está sendo demonstrada aqui, pela primeira vez na literatura.

Numerosos relatos têm sido realizados sobre a interação de espécies da família Capillaridae em outros órgãos, com graves reações inflamatórias e desestruturações teciduais, como observado por Senior et al. (1980) que descreveram a inserção de *Capillaria* sp. no epitélio da bexiga de cachorro com reação inflamatória e edema da submucosa; Ruas et. al., (2003) que caracterizaram o parasitismo por *Capillaria hepatica* em animais carnívoros, descrevendo extensos agregados multifocais de ovos, rodeados por resposta infamatória; e, ainda, Moreira et al. (2013) que realizaram o primeiro registro da ocorrência de *Calodium hepaticum* in *R. rattus* and *R. norvegicus* na região Amazônica, descrevendo extensivas lesões do parênquima hepático, alterando a arquitetura dos hepatócitos, ductos biliares e vasculatura tecidual, fibrose septal e infiltrados inflamatórios.

A estrutura do corpo de *Oswaldocruzia belenensis*, leva a uma delicada adesão à superfície do epitélio, assegurada pela extensão e ramificação dos vilos intestinais. Provocando, portanto, seu fácil desligamento do sítio de interação e conseqüentemente, sua libração para a luz do intestino de *R. marina* e sua migração para os diferentes terços intestinais e, por vezes, o encontro destes helmintos na luz estomacal de seu hospedeiro. No

entanto, provavelmente pela sua ativa movimentação, foi possível encontrar pequenas lesões de epitélio intestinal, porém sem a associação com infiltrados inflamatórios ou aglomerações de melanomacrófagos, ou, ainda, comprometimento da mucosa intestinal.

Hendrikx e Moppes (1983) realizam a descrição morfológica dos estágios larvais de desenvolvimento de *Oswaldocruzia filiformis* através de infecções experimentais em *Bufo bufo*, analisando ainda os aspectos patológicos da infecção. Semelhante ao observado no presente trabalho, os autores não descrevem alterações significantes, sendo relatada apenas uma ligeira diminuição da altura do epitélio intestinal causado por larvas L4, sendo raros o encontro de atrofia e necrose celular. Adicionalmente, foram observadas impressões da aleta lateral e cristas longitudinais de L4 e de adultos no epitélio, no entanto, sem a presença de reações inflamatórias evidentes.

A diferença de interação entre nematódeos e *R. marina*, já foi anteriormente demonstrada por nós, ao analisarmos a interação *Ortleppascaris* sp. – fígado de *R. marina* (Silva et al, 2013) ou ainda *Rhabdias paraensis*-pulmões de *R. marina* (Santos et al., 2016). No primeiro caso, a presença de larvas de nematódeos causou dramáticas alterações hepáticas acompanhadas de diferentes níveis de respostas imunes teciduais; enquanto que no segundo caso, alterações e respostas imunes foram praticamente inexistentes nos pulmões. Estudos prévios associados aos achados do presente trabalho nos demonstra que o mesmo hospedeiro reage de maneira diferente a diferentes espécies de nematódeos, apesar de ocorrerem pequenas lesões causadas tanto por *Capillaria* sp. quanto por *O. belenensis* na mucosa intestinal, a pouca ou nenhuma reação inflamatória tecidual no intestino, nos leva a acreditar que o nível de lesões induzidas por estes nematódeos é tolerado por *R. marina* não comprometendo a fisiologia do órgão nem ativando ou direcionando uma exacerbada reação inflamatória tecidual no local.

É importante levar em consideração também, o poliparasitismo. Os conhecimentos mais básicos de imunologia nos levaria a esperar uma reação exacerbada do hospedeiro mediante esse conglomerado de produtos antigênicos liberados pelas mais variadas espécies de helmintos em um mesmo ambiente. Produtos estes derivados de atividades metabólicas de seus processos digestivos/reprodutivos próprios, no entanto, parecem haver um convívio harmonioso entre quatro espécies distintas de helmintos no mesmo microambiente de seu hospedeiro: o intestino. Isto levanta questões para pesquisas futuras, tais como: (a) Estariam os produtos de excreção/secreção de helmintos, somando-se numa atividade comunitária e complementar de modulação da resposta imune de seu hospedeiro poli parasitado?; (b) O conceito/evento do parasitismo deve culminar em uma resposta imune do hospedeiro em todos os casos de interação helminto-hospedeiro ou isto é apenas um dogma? (c) O estabelecimento de uma espécie de helminto parasito em um sítio, facilita o estabelecimento de uma segunda espécie e assim sucessivamente? (d) há um limite para o convívio de diferentes espécies de diferentes filos no intestino de *R. marina*?. Assim, a visita a aspectos básicos de relação helminto-hospedeiro é importante para reavaliarmos conceitos e perspectivas, além de ajudar a traçar avanços nas pesquisas futuras.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer às agências Nacionais de Fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, através do Edital Parasitologia Básica/2010; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, pela concessão da Bolsa de Produtividade da autora J. N. SANTOS. Este trabalho foi apresentado como dissertação de mestrado do Discente Fábio José dos Santos Rocha ao programa de Pós-graduação Mestrado Profissionalizante em Análises Clínicas (MAC-Pro) do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA).

REFERÊNCIAS

- AMPHIBIAWEB: Information on Amphibian Biodiversity and Conservation. Berkeley, California, U.S.A. Disponível em: <http://amphibiaweb.org/>. Acesso em: 20 de mar. de 2017
- Barathidasan, R., S. D. Singh, V. Gowthaman, A. Latchumikanthan, and K. Dhama. 2014. The first report of severe intestinal capillariosis caused by *Baruscapillaria obsignata* in farmed helmeted guinea fowls (*Numida meleagris*). Veterinarski arhiv **84**:529-536.
- Barton, D. P. 1997. Introduced animals and their parasites: The cane toad, *Bufo marinus*, in Australia. Australian Journal of Ecology **22**: 316-324.
- Beard, K. H., K. A. Vogt, and A. Kulmatiski. 2002. Top-down effects of a terrestrial frog on forest nutrient dynamics. Oecologia **133**; 583-593.
- Becker, C. G., C. R. Fonseca, C. F. B. Haddad, R. F. Batista, and P. I. Prado. 2007. Habitat Split and the Global Decline of Amphibians. Science. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/318/5857/1775> . Acesso em: 20 de mar. de 2017.
- Britton, J. R., J. Pegg, and C. F. Williams. 2011. Pathological and Ecological Host Consequences of Infection by an Introduced Fish Parasite. PLoS ONE **6(10)**: e26365
- Calhoun, D. M., P. A. Schaffer, J. R. Gregory, K. M. Hardy, and P.T. Johnson. 2015. Experimental Infections of Bluegill with the Trematode *Ribeiroia ondatrae* (Digenea: Cathaemasiidae): Histopathology and Hematological Response. Journal of Aquatic Animal Health **27 (4)**:185-191.
- Chai, J. Y., E. H. Shin, E. T. Han, S. M. Guk, M. H. Choi, and S. H. Lee. 2000a. Genetic difference in susceptibility and fatality of three strains of mice experimentally infected with *Neodiplostomum seoulense*. Journal of Parasitology **86**:1140-1144.

- Cotés, A., C. M. Antoli, C. M. Grau, J. G. Esteban, R. K. Grencis, and R. Toledo. 2015. Differential alterations in the small intestine epithelial cell turnover during acute and chronic infection with *Echinostoma caproni* (Trematoda). *Parasites & Vectors* **58**: 334
- Cousin, J. C. B., J. P. Júnior, and J. F. Gonzales. 2003. Histopatologia no fígado de *Prionace glauca* (chondrichthyes, squaliformes, carcharhinidae) causada por *Hepatoxylon trichiuri* (eucestoda, trypanorhyncha). *Revista Brasileira Biociência* 11 (2): 167-172.
- Dubey, S., and R. Shine. 2008. Origin of the parasites of an invading species, the Australian cane toad (*Bufo marinus*): are the lungworms Australian or American?. *Molecular Ecology* **1**: 1-7.
- Eiras, J. C., and A. A. Rego. 1989. Histopatologia em peixes resultante de infecções parasitárias. *Publicações do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre"* **208**: 1-12.
- Frost, D. 2009. Amphibian species of the world: an online reference. American Museum of natural History, New York, version 5.3. disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. Acesso em: 02 Jan. 2017.
- Gomes, T. F. F., F. T. V. Melo, E. G. Giese, A. P. Furtado, E. G. Gonçalves, and J. N. Santos. 2013. A new species of *Mesocoelium* (Digenea: Mesocoeliidae) found in *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) from Brazilian Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **108**: 186-191.
- Hendrikx, W. M. L., and Moppes, M. C. V. 1983. *Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda: Trichostrongylidae): Morphology of developmental stages, parasitic development and some pathological aspects of the infection in amphibians. *Zeitschrift Parasitenkd* **69**: 523-537.
- Hoseini, S. M., M. R. Youssefi, P. Mortazavi, R. Nikzad, and A. Mousapour. 2015. Pathological study of lesion caused by *Serpinema microcephalus* (Nematoda: Camallanidae)

- in *Mauremys caspica caspica* from north of Iran. *Journal of Parasitic Diseases* **39(4)**: 685-688.
- Justine, J. L., and O. Bain. 1987. *Capillaria petiti* n. sp. (Nematoda, Capillariinae) parasite du crapaud *Bufo marinus* (Amphibia) au Brésil. *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle* **4 (9)**: 815-828.
- Kelehear, C. and H.I. Jones. 2010. Nematode larvae (Order Spirurida) in gastric tissues of *Australian anurans*: a comparison between the introduced cane toad and sympatric native frogs. *Journal of Wildlife Diseases* **46(4)**:1126-1140.
- Kelehear, C., G. P. Brown, and R. Shine. 2012. Size and sex matter: infection dynamics of an invading parasite (the pentastome *Raillietiella frenatus*) in an invading host (the cane toad *Rhinella marina*). *Parasitology* **139(12)**:1596-1604.
- Kelehear, C., H. I. Jones, B. A. Wood, and R. Shine. 2015. Wild cane toads (*Rhinella marina*) expel foreign matter from the coelom via the urinary bladder in response to internal injury, endoparasites and disease. *PLoS One* **10(8)**: e0134036.
- Kelehear, C., K. Saltonstall, and M. E. Torchin. 2015. An introduced pentastomid parasite (*Raillietiella frenata*) infects native cane toads (*Rhinella marina*) in Panama. *Parasitology* **142(5)**: 675-9.
- Kent, M. L., J. K. Bishop-Stewart, J. L. Matthews, and J. M. Spitsbergen. 2002. *Pseudocapillaria tomentosa*, a Nematode Pathogen, and Associated Neoplasms of Zebrafish (*Danio rerio*) Kept in Research. *Comparative Medicine* **52 (4)**:354-358.
- Kook, J., Y. Nawa, S. H. Lee, and J. Y. Chai. 1998. Pathogenicity and lethality of a minute intestinal fluke, *Neodiplostomum seoulense*, to various strains of mice. *Journal of Parasitology* **84**:1178-1183.
- Linzey, D., J. Burroughs, L. Hudson, M. Marini, J. Robertson, J. Baco, M. Nagarkatt, and P. Nagarkatti. 2003. Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections

and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. *International Journal of Environmental Health Research* **13 (2)**:125-148.

Melo, F. T. V., C. S. B. Melo, L. C. S. Nascimento, E. G. Giese, A. P. Furtado, and J. N. Santos. 2016. Morphological characterization of *Eustrongylides* sp. larvae (Nematoda, Dioctophymatoidea) parasite of *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) from Eastern Amazonia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **25**: 235-239.

Melo, F. T. V., E. G. Giese, A. P. Furtado, M. J. Soares, A. C. R. Vallinoto, and J. N. Santos. 2011. *Lanfrediella amphicirrus* n. gen. n. sp. Nematotaeniidae (Cestoda: Cyclophylidae), a tapeworm parasite of *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Amphibia: Bufonidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **106**: 670–677.

Miller, D. L., M. J. Gray, S. Rajeev, A. C. Schmutzer, E. C. Burton, A. Merrill, and C. A. Baldwin. 2009. Pathologic findings in larval and juvenile anurans inhabiting farm ponds in tennessee, Usa. *Journal of Wildlife Diseases* **45 (2)**: 314-324.

Moreira, V. L. C., E. G. Giese, D. C. B. Silva, F. T. V. Melo, A. P. Furtado, A. Maldonado, and J. N. Santos. 2013. *Calodium hepaticum* (Nematoda: Capillariidae) in synanthropic rodents (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) in Eastern Amazonia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **22(2)**: 265-269.

Nelson, F. B., G. P. Brown, C. Shilton, and R. Shine. 2015. Host– parasite interactions during a biological invasion: The fate of lungworms (*Rhabdias* spp.) inside native and novel anuran hosts. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **4**: 206–215.

Pavanelli, G. C., and M. H. Machado. 1991. Proteocefalídeos parasitos de peixes, em especial pimelodídeos do rio Paraná. *Revista Unimar* **13(2)**:163-75.

- Pavanelli, G. C., J. C. Eiras, and G. M. Guidelli. 1997. Nota sobre a histopatologia da parasitose de *Microrchis oligovitellum* Lunaschi, 1987 (Trematoda - Paramphistomidae) em *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766). Revista Unimar **19(2)**: 473-478.
- Pavanelli, G.C., G. V. Schaeffer, and S. M. H. Machado. 1990. Ocorrência e histopatologia de *Ithyoclinostomum dimorphum* (Diesing, 1850) (Trematoda-Clinostomidae) em traíras coletadas no rio Paraná, PR. Revista Unimar **12(1)**:69-75.
- Pizzatto, L., and R. Shine. 2011. The effects of experimentally infecting Australian tree frogs with lungworms (*Rhabdias pseudosphaerocephala*) from invasive cane toads. International Journal for Parasitology **41**: 943–949.
- Pizzatto, L., C. M. Shilton, and S. Shine. 2010. Infection dynamics of the lungworm *Rhabdias pseudosphaerocephala* in its natural host, the cane toad (*Bufo marinus*), and in novel hosts (native Australian frogs). Journal of Wildlife Diseases **46**: 1152–1164.
- Rana, S. S., D. K. Bhasin, H. S. Bhatti, K. Gupta, R. Gupta, R. Nada, B. Nagi, S. K. Sinha, and K. Singh. 2009. Human intestinal capillariasis: diagnosis by jejunal fluid analysis obtained at enteroscopy and reversal of subtotal villous atrophy after treatment. Endoscopy **41**: E102–E103.
- Reis, J. L. J., R. B. Beckstead, C. C. Brown, and R. W. Gerhold. 2009. *Histomonas meleagridis* and Capillarid Infection in a Captive Chukar (*Alectoris chukar*). Avian Diseases **53(4)**: 637-639.
- Rodrigues, E.L.R., M. J. T. Ranzani-Paiva, and A. A. Santos. 2002. Alterações histopatológicas em fígado de dourado *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Osteichthyes, Characidae) causadas por *Neocucullanus neocucullanus* Travassos, Artigas & Pereira 1828 (Nematoda). Acta Scientiarum **24(2)**: 455-459.

- Rothenburger, J. L., C. G. Himsforth, M. Lejeune, P. M. Treuting, and F. A. Leighton. 2014. Lesions associated with *Eucoleus* sp. in the non-glandular stomach of wild urban rats (*Rattus norvegicus*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **3**: 95–101
- Santos, J. N., D. C. B. Silva, L. A. N. Feitosa, A. P. Furtado, E. G. Giese, and F.T.V. Melo. 2016. *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) versus *Rhabdias paraensis* (Nematoda: Rhabdiasidae): expanding the view on a natural infection. *Journal of Parasitology* **102** (3): 349–355.
- Santos, J. N., E. G. Giese, A. Maldonado Jr., and R. M. Lanfredi. 2008. A new species of *Oswaldocruzia* (Molineidae: Nematoda) in *Chaunus marinus* (Amphibian: Bufonidae) (Linnaeus, 1758) from Brazil. *Journal of Parasitology* **94**: 264-268.
- Santos, J. N., F. T. V. Melo, A. P. Furtado, D. E. B. Nascimento, L. C. S. Nascimento, and E. G. Giese. 2011. *Rhabdias paraensis* sp. nov.: A parasite of the lungs of *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) from Brazilian Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **106**: 433-440.
- Senior, D. F., G. B. Solomon, M. H. Goldschmidt, T. Joyce, K. C. Bovee. 1980. *Capillaria plica* infection in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **176** (9): 901-905.
- Silva, J. P., D. C. Silva, F. T. V. Melo, E. G. Giese, A. P. Furtado, and J. N. Santos. 2013b. Liver Histopathology in the cane toad, *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae), induced by *Ortleppascaris* sp. larvae (Nematoda: Ascarididae). *Journal of Parasitology* **99**: 250–256.
- Silva, J.P., F.T.V. Melo, L.C.N. Silva, E.C. Gonçalves, E.G. Giese, A.P. Furtado and J. N. Santos. 2013a. Morphological and Molecular Characterization of *Ortleppascaris* sp. larvae, Parasites of the Cane Toad *Rhinella marina* from Eastern Amazonia. *Journal of Parasitology* **99**(1):118-123.

Williams, C. F., L. G. Poddubnaya, T. Scholz, J. F. Turnbull, and H. W. Ferguson. 2011. Histopathological and ultrastructural studies of the tapeworm *Monobothrium wagneri* (Caryophyllidea) in the intestinal tract of tench *Tinca tinca*. *Diseases of Aquatic Organisms* **97**: 143-154.

Wongsawasdi, L., N. Ukarapol, and N. Lertprasertsuk. 2002. The endoscopic diagnosis of intestinal capillariasis in a child: a case report. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **33**: 730-732.

Wyman, R. L. 1998. Experimental assessment of salamanders as predators of detrital food webs: effects on invertebrates, decomposition and the carbon cycle. *Biodiversity and Conservation* **7**:641-650.

Young, B. E., J. S. Stuart, N. A. Chanson, and T. M. Boucher. 2004. *Disappearing jewels: The status of new world amphibians*. NatureServe, Arlington, EUA, 54p.

LEGENDAS

Figura 1. Aspectos histopatológicos da interação *Mesocoelium lanfrediae* em intestino de *Rhinella marina* de Belém, Pará.

A) Visão geral do trematódeo (**Tr**) entre os vilos (**Vi**) da mucosa intestinal, destaque para a inserção do parasito no vilo, próximo à glândula intestinal (**Gi**) e das glândulas da submucosa (**Gs**). **S**: Serosa; **ML**: Musculatura longitudinal; **Sm**: Submucosa intestinal. Barra: 100 µm.

B) Detalhes de uma região de adesão na qual se observa a ventosa ventral preenchida com mucosa intestinal e a diminuição da altura do epitélio intestinal. Barra: 150 µm.

C) Adesão do trematódeo na região mais basal da mucosa, adjacente a glândula intestinal (**Gi**). **V**: Vasos; **Vo**: Ventosa Oral. Barra: 100 µm.

D) Corte evidenciando dois espécimes de *Mesocoelium lanfrediae*, um livre e em contato com o epitélio da mucosa; enquanto o segundo evidenciado em secção transversal na porção mediana do corpo, encontrado aderido no vilo pela ventosa ventral (**Vv**) realizando a sucção do epitélio da mucosa que se encontra projetado para interior do órgão (*). **Ov**: Ovo; **Ci**: ceco Intestinal. Barra: 50 µm.

E) Detalhe da interação de *Mesocoelium lanfrediae* aderido pela ventosa ventral (**Vv**) com a mucosa intestinal (*), destacando o modo de adesão do parasito e detalhes das estruturas internas do helminto. **Vi**: vitelaria; **Ci**: Ceco Intestinal; **Seta**: Espinho. Barra: 20 µm.

F) Parasito aderido profundamente na mucosa intestinal pela ventosa oral (**Vo**) e em estreito contato com o epitélio das glândulas intestinais, com evidências da secreção de células caliciformes (**Seta**) sendo depositadas integralmente sobre o tegumento do parasito. Barra: 50 µm.

G) Ovos (**Ov**) liberados na luz do intestino. **Seta**: secreção das células caliciformes. Barra: 20 µm. **Insert**: Detalhe do ovo contendo o embrião. Barra: 20 µm.

H) Corte evidenciando uma secção longitudinal do parasito aderido pela ventosa oral (**Vo**), realizando a apreensão do epitélio intestinal (*) e mostrando ainda a compressão causada pela justaposição do corpo do trematódeo com a mucosa intestinal levando à diminuição da altura do mesmo. Barra: 50 µm.

Figura 2. Intestino de *Rhinella marina* naturalmente infectado com *Lanfrediella amphicirrus*.

A) Visão geral de um corte transversal no intestino, no qual se observa numerosos espécimes de *L. amphicirrus* (**La**), em secção longitudinal, dispersos ocupando boa parte no lúmen do órgão, justapostos entre si e à extremidade dos vilos. Barra: 500 µm.

B) Secção na qual se observa a presença tanto de *L. amphicirrus* (**La**), como *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**) e *Mesocoelium lanfrediae* (**Tr**) livres no lúmen intestinal. Barra: 100 µm.

C) Região onde se observa a proximidade de *L. amphicirrus* com os vilos (**Vi**) intestinais disperso, secção longitudinal do cestódeo, onde se observa ainda a presença dos canais excretorios (**Ce**). Barra: 100 µm.

D) Detalhes de *L. amphicirrus* (**La**) disperso na luz do intestino visto de um corte transversal (acima) e longitudinal (abaixo), destacando a presença de duas ventosas (**Vt**) no escólex as quais não estão em contato direto com o epitélio. Barra: 100 µm.

E) Visão dos vilos intestinais onde se observa a profunda inserção das ventosas (**Vt**) de *L. amphicirrus* (**La**) e ventosa ventral (**Vv**) de *M. lanfrediae* (**Tr**) realizando a apreensão do epitélio da mucosa (*) em intimo contato com as glândulas intestinais (**Gi**). Barra: 50 µm.

F) Detalhe da fixação de *L. amphicirrus* às glândulas intestinais por duas das suas quatro ventosas (**Vt**) musculares, promovendo leve apreensão e sucção do epitélio de revestimento gerando protrusão e conseqüente preenchimento da cavidade das ventosas (*). Barra: 50 µm.

G) e H) Detalhe do escólex de *L. amphicirrus* inserido profundamente no epitélio intestinal aderido por três ventosas (**Vt**); sendo (**H**) próximo da Glândula intestinal (**Gi**), destaque em

ambas as imagens se observa a diminuição da altura do epitélio devido a forte compressão causado pelas ventosas (*) epitélio succionado pelas ventosas. Barras: 50 μm .

I) Detalhe da íntima adesão do parasito por uma de suas quatro ventosas (**Vt**), destaque para a área succionada para o interior da ventosa (*). S: Serosa; ML: Muscular longitudinal. Barra: 20 μm .

J, K) Detalhe da diminuição da altura do epitélio no local de adesão do parasito por duas de suas ventosas (**Vt**), sem hiperplasia de vasos (**V**) ou migração de células. (*) Área de adesão do parasito. Barras: 50 μ ; 20 μm . **Insert:** Ampliação do local de de fixação do parasito no epitélio. Barra: 40 μm

Figura 3: Aspectos da interação entre *Capillaria* sp. e epitélio intestinal de *Rhinella marina*.

A) Visão geral da interação de *Capillaria* sp. (**Cp**) distribuídos por toda a extensão dos vilos intestinais, desde a extremidade luminal até a glândula intestinal (**Gi**). **V:** Vaso; **S:** Serosa; **ML:** Musculatura longitudinal. Barra: 100 μm .

B) Detalhes da inserção do nematódeo (Cp) na glândula (**Gi**). **V:** Vaso. Barra: 50 μm .

C e D) Detalhes de duas regiões onde o parasito fica inserido, evidenciando a formação de “túneis” por onde passa a região anterior de *Capillaria* sp. (**Cp**). Note discreta infiltração leucocitária adjacente à superfície cuticular do nematódeo e discreta hemorragia e hiperplasia de plexos (**setas**). Barras: 20 μm . **E**

) Detalhe de um corte longitudinal na região esofágica de *Capillaria* sp. (**Cp**), evidenciando a estrutura do esticócito inserida no ápice do vilu intestinal com presença de células de defesa (seta). Barra: 20 μm .

F) Corte evidenciando uma secção transversal na região esofágica de *Capillaria* sp. (**Cp**) inserida no vilu com um grande aglomerado de células de defesa (*). Barra: 20 μm .

G) Detalhes de uma região na qual se evidencia o aumento do volume dos plexos vilosos (Setas), capilar periglandular e da lâmina própria do vilo parasitado. Barra: 20 µm

Figura 4: *Rhinella marina* naturalmente infectada com *Oswaldocruzia belenensis* aspectos histopatológicos.

A) Visão geral de corte transversal destacando nematódeos da espécie *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**) dispersos no lúmen intestinal. Setas: Estriações longitudinais pela cutícula. Barra: 50 µm.

B) Detalhe de *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**) entres os vilos intestinais. Barra: 20 µm

C) Visão geral de corte transversal, mostrando secções longitudinais de *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**) evidenciando que os mesmos estavam limitados a superfície do epitélio de revestimento dos vilos (**Vi**) e das glândulas intestinais. Barra: 100 µm.

D) *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**) livres no lúmen intestinal devido a sua delicada adesão e presença de *L. amphicirrus* (**La**). Barra: 100 µm.

E) Detalhes de áreas de epitélio próximos aos exemplares de *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**), sem lesão aparente do epitélio intestinal. S: Serosa; ML: Muscular longitudinal; Sm: Submucosa. Barra: 50 µm

F) Corte longitudinal da região do sistema reprodutor feminino de *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**), com destaque para estrutura do ovojector da fêmea (**Oj**). Barra: 20 µm

Figura 5: Interação *Oswaldocruzia belenensis* e outros helmintos intestinais em *Rhinella marina*. **A)** Visão geral de corte transversal em região mediana do intestino, repleta de vilos e a presença de *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**) soltos no lúmen próximo ao vilo. Barra: 100 µm.

- B)** Detalhe da interação de *O. belenensis* (**Ob**) em epitélio intestinal, na qual se observa uma área lesionada (**Chaves**). Barra: 50 μm .
- C)** Detalhes de cortes transversais de *Oswaldocruzia belenensis* livres no lumen intestinal destacando as estriações longitudinais (**setas**) e o intestino (**In**) do parasito. Barra: 30 μm .
- D)** *Oswaldocruzia belenensis* (**Ob**) próximo a áreas do epitélio lesionadas e aglomerados de hemácias (**setas**). Barra: 20 μm
- E)** Ovos larvados (**Lv**) livres no lúmen intestinal, disposto entre proglotes grávidos, contendo ovos (**Ov**) de *L. amphicirrus* (**La**). Barra: 50 μm .
- F)** Ovos larvados (**Lv**) livres no lúmen intestinal próximo a aglomerados de hemácias (**Setas**) e *L. amphicirrus* (**La**). Barra: 20 μm .
- G)** Ovo larvado (**Lv**), destacando a casca do ovo (**cabeça de seta**) livre no lúmen intestinal proximo a aglomerados de hemácias (**Setas**). Barra: 20 μm .

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Figura 5

ANEXO I