

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO
OSWALDOCRUZIA TRAVASSOS, 1917 (NEMATODA: MOLINEIDAE) EM
ANFÍBIOS (ANURA) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

ENZO EMMERICH PAULA DE CASTRO

BOTUCATU

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO
OSWALDOCRUZIA TRAVASSOS, 1917 (NEMATODA: MOLINEIDAE) EM
ANFÍBIOS (ANURA) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

ENZO EMMERICH PAULA DE CASTRO

Orientador: Prof. Tit. Reinaldo José da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zoologia.

BOTUCATU

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Castro, Enzo Emmerich Paula de.

Caracterização morfológica de espécies do gênero *Oswaldocruzia* travassos, 1917 (nematoda: molineidae) em anfíbios (anura) em diferentes regiões do Brasil / Enzo Emmerich Paula de Castro. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Reinaldo José da Silva

Capes: 21300003

1. Anuro. 2. Helminto. 3. Nematóides entomopatogênicos.
4. Anfíbio.

Palavras-chave: Anfíbios; Endoparasitas; Helmintos;
Parasitas; Strongylida.

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo carinho, suporte e força que contribuíram intrinsecamente para a minha formação e caráter.

Ao meu orientador Prof. Tit. Reinaldo José da Silva, pela oportunidade, confiança e de muito aprendizado que me foi passado. Uma pessoa de muita personalidade, tenho orgulho de ser seu orientado.

Ao professor Drausio Honorio Morais, pelos ensinamentos e incentivo que foram essenciais para este estudo e para a vida.

A todos meus colegas de laboratório, pelo apoio, descontraída e ajuda para com meu trabalho.

A todos os docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Parasitologia a qual fico grato pelo convívio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudos concedida.

Por último, agradeço aos anfíbios que fizeram parte e foram de extrema importância para esta pesquisa.

Sem esmorecer para não desmerecer.

(Oswaldo Cruz)

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO II	18
1. RESUMO	19
2. ABSTRACT	20
3. INTRODUÇÃO	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. LOCAIS DE COLETA DOS ANFÍBIOS.....	24
4.2. COLETA E PROCESSAMENTO DOS NEMATOIDES.....	29
4.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA	29
4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	30
5. RESULTADOS.....	30
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	57

RESUMO

O gênero *Oswaldocruzia* inclui parasitas que habitam o trato gastrointestinal de anfíbios e répteis. A ordem Strongylida é caracterizada por nematoides que possuem bolsa copuladora, e os membros dessa ordem que parasitam anfíbios são quase que exclusivamente restritos ao gênero *Oswaldocruzia*. São nematoides cosmopolitas, mas pouco se sabe de sua biologia. Em todo o mundo são registradas aproximadamente 90 espécies, sendo 22 espécies descritas para anfíbios na América do Sul e, dentre elas, sete são descritas no Brasil. As espécies que ocorrem no Brasil pertencem ao grupo Continental Neotropical, por possuírem espículos com divisão da forquilha no terço final do comprimento do espículo. As mais importantes características das espécies de Trichostrongylina são a disposição da bolsa copuladora, a morfologia dos sinlofes e a anatomia dos espículos. As espécies pertencentes ao grupo Continental Neotropical possuem características comuns, compondo um grupo homogêneo. Essa homogenia torna difícil o diagnóstico das espécies, que podem ser complexos de espécies, subestimadas nos diferentes tipos de hospedeiros anfíbios e nas diferentes regiões brasileiras, tornando necessária uma análise morfológica mais acurada das estruturas mais importantes. O presente estudo tem por objetivo realizar uma avaliação taxonômica de três espécies de *Oswaldocruzia* em diferentes regiões do Brasil, com intuito de contribuir para o conhecimento da taxonomia morfológica destes parasitas na região Neotropical. Espécimes de *Oswaldocruzia* spp. foram coletados em estômago e intestino de *Rhinella* spp. provenientes do Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste do Brasil, clarificados com fenol e analisados em microscópio com sistema de análise de imagens. Amostras de cada helminto também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura para análise da morfologia externa. Cortes histológicos foram realizados para estudos dos sinlofes. Foi realizado a redescrição de *Oswaldocruzia proencai* parasitando *Rhinella schneideri* e *Rhinella icterica* em Botucatu, São Paulo, assim como o registro de duas possíveis novas espécies para a região Neotropical, uma parasitando *R. schneideri* em Brasilândia, Mato Grosso do Sul e outra em *Rhinella jimi* e *Rhinella granulosa* em Picos, Piauí.

PALAVRAS-CHAVES: Parasitas, Helmintos, Strongylida, Anfíbios, Endoparasitas

ABSTRACT

The genus *Oswaldocruzia* includes parasites that inhabit the gastrointestinal tract of amphibians and reptiles. The order Strongylida is characterized by nematodes that possess a caudal bursa, and the members of that order parasitizing amphibians are almost exclusively restricted to the genus *Oswaldocruzia*. They are cosmopolitan nematodes, but little is known about their biology. Approximately 90 species are recorded worldwide, of which 22 are described for amphibians in South America, and seven are described in Brazil. The species distributed in Brazil belong to group Continental Neotropical, because they have spicules with division of the fork in the final third of the length of the spicules. The most important characteristics of the species of Trichostrongylina are the disposition of the caudal bursa, the morphology of the synlophes and the anatomy of the spicules. The species belong to the Continental Neotropical group have common characteristics, composing a homogeneous group. This homogeneity makes it difficult to diagnose species, which may be species complexes, underestimated in the different types of amphibian hosts and in different Brazilian regions, thus it is necessary to make a more accurate morphological analysis of the most important structures of these helminths. The present study aims to carry out a taxonomic evaluation of three species of *Oswaldocruzia* sp. in different regions of Brazil, aiming at contributing to the knowledge of morphological taxonomy of these parasites in the Neotropical region. *Oswaldocruzia* spp. specimens were collected in the stomach and intestine of *Rhinella* spp. from the Center-West, Southeast, and Northeast of Brazil, clarified with phenol, and analyzed in microscope with an image analysis system. Samples of each helminth were also analyzed by scanning electron microscopy to analysis of the external morphology. Histological sections were also used to study the synlophes. It was carried out the redescription of *Oswaldocruzia proencai* parasitizing *Rhinella schneideri* and *Rhinella icterica* in the municipality of Botucatu, São Paulo State, as well as the registry of two possible new species for the Neotropical region, one parasitizing *R. schneideri* in the municipality of Brasilândia, Mato Grosso do Sul State and another in *Rhinella jimi* e *Rhinella granulosa* in the municipality of Picos, Piauí State.

KEYWORDS: Parasites, Helminths, Strongylida, Amphibians, Endoparasites

CAPÍTULO I

REVISÃO DO GÊNERO *OSWALDOCRUZIA* TRAVASSOS, 1917 (NEMATODA: MOLINEIDAE)

1. INTRODUÇÃO

A primeira espécie do gênero, *Oswaldocruzia filiformis* (= *Strongylus auricularis* Goeze, 1782), foi descrita pelo zoologista alemão Johann August Ephraim Goeze, em 1782, na região Paleártica. Porém, o gênero *Oswaldocruzia* foi proposto por Travassos (1917), a partir da análise da espécie *Oswaldocruzia subauricularis* (= *Strongylus auricularis*), descrita sucintamente por Rudolphi (1819) em um anfíbio, erroneamente denominado *Anaxyrus americanus* Holbrook, 1836 (= *Rhinella* sp.), no Brasil.

Oswaldocruzia spp. parasitam anfíbios e répteis (Bem Slimane e Durette-Desset, 1995), no entanto, Novokhatskaya (2007) registrou um caso de parasitismo no intestino de um peixe, *Lota lota* Linnaeus, 1758, que se alimenta de pequenos anfíbios, sugerindo possível participação do peixe no ciclo de vida do nematoídeo como parasito acidental.

A ordem Strongylida é caracterizada por nematoides que possuem bolsa copuladora (Figura 1) e as espécies dessa ordem que parasitam anfíbios são quase que exclusivamente restritas ao gênero *Oswaldocruzia* (Walton, 1935). Nesta ordem está incluído um grupo muito vasto de nematoides parasitas de vertebrados que surgiram como formas de vida livre terrestre, sofreram inúmeras estratégias de vida alternativa e passaram a infectar anfíbios desde quando estes surgiram no planeta, há aproximadamente 350 milhões de anos atrás, subsequentemente, répteis, aves e mamíferos, incluindo o ser humano, se tornaram hospedeiros de espécies de Strongylida (Durette-Desset *et al.*, 1994).

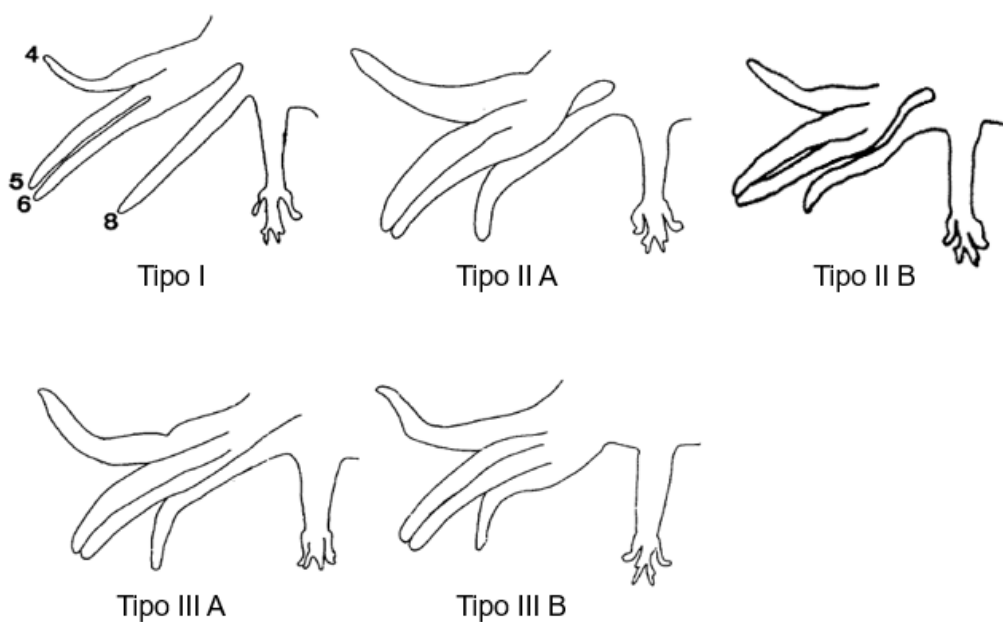


Figura 1. Tipos de bolsa copuladora encontrados em *Oswaldocruzia*: Tipo I com os raios 8 separados do raio 6 em todo seu trajeto; Tipo II A, o raio 8 nasce separado do raio 6 e se junta em sua parte mediana; Tipo II B, os raios 6 são ligeiramente separados dos raios 8 e seguem um trajeto paralelo até sua extremidade; Tipo III A, o raio 8 permanece junto com o raio 6 exceto na porção distal e Tipo III B, o raio 8 possui um tronco comum com os raios 4, 5 e 6 e permanece junto dos raios 6 exceto na porção distal (Fonte: Bem Slimane e Durette-Desset, 1995; Bem Slimane *et al.*, 1996).

O gênero *Oswaldocruzia*, família Molineidae Durette-Desset et Chabaud, 1977, pertence à superfamília Trichostrongyloidea Cram, 1927. Esta superfamília passou, então, a ser incluída dentro da nova subordem Trichostrongylina criada por Durette-Desset e Chabaud (1993).

Bem Slimane *et al.* (1996) agruparam as espécies de Trichostrongylina de acordo com sua morfologia e região de distribuição em sete grupos, a saber:

- Grupo 1 - Relíquias;
- Grupo 2 - Antigos;
- Grupo 3 - Etíope-Oriental, que apresentam espículos não idiomórficos (Figura 2) composto por duas a três pontas;

- Grupo 4 - Neo-Etíope, também com espículos não idiomórficos mas com numerosas pontas;
- Grupo 5 - Holártico, que possui espículos idiomórficos (Figura 2) sendo o único desse grupo que a divisão da forquilha se encontra acima do terço final do comprimento do espículo;
- Grupo 6 - Continental Neotropical, que possuem espículos idiomórficos com divisão da forquilha no terço final do comprimento do espículo; e
- Grupo 7 - Caribe Neotropical, com espículos idiomórficos e divisão da forquilha no terço final, cada um dos seus três troncos são divididos em numerosas pontas.

Oswaldocruzia está subdividido entre os grupos 3 a 7 por não possuir caracteres primitivos, sendo o grupo 6 aquele que possui maior número de espécies descritas (Durette-Desset *et al.* 2006).

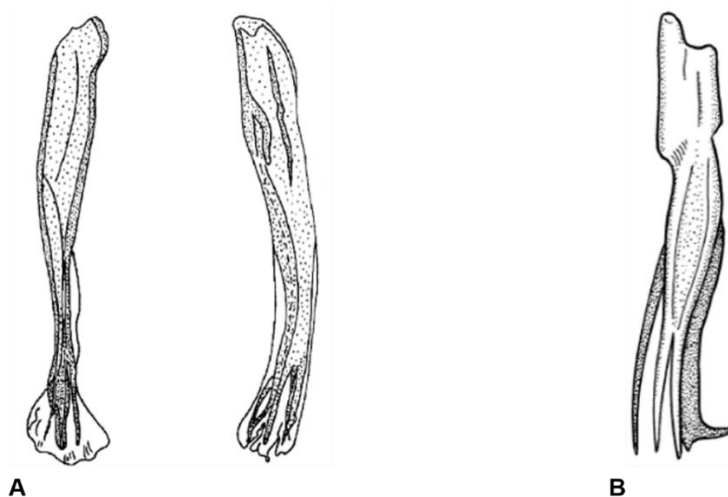


Figura 2. A: espículos não idiomórfico são formados por estruturas não claramente separadas. B: espículos idiomórficos são formados por estruturas com suas divisões marcadamente separadas (Fonte: Bem Slimane *et al.*, 1996; Bursey e Goldberg, 2005).

Trichostrongylina compreende mais de 100 espécies e sua diversificação nos mamíferos é intensa, enquanto as espécies que parasitam anfíbios e répteis são relativamente menos numerosas. As mais importantes características das espécies de Trichostrongylina são a disposição da bolsa copuladora, a morfologia dos sinlofes (Figura 3) na junção esôfago-intestino e nível do meio do corpo e a anatomia dos espículos (Bem Slimane *et al.*, 1996). Com relação a sua evolução (Bem Slimane *et al.*, 1996), estes helmintos são divididos em:

- Relíquias - caracterizados por uma cápsula bucal não atrofiada;
- Antigos - não possuindo cápsula bucal, mas marcantes por elementos morfológicos primitivos tais como gubernáculo, coroa radiata, bursa caudal codiforme, pequenas digitações no cone genital, espículos com dois ramos internos dividido em várias pontas;
e
- Modernos, neste último está inserido o gênero *Oswaldocruzia*.

Devido à ausência de especificidade entre o parasita e hospedeiro, sugere-se uma evolução mais recente do grupo (Bem Slimane e Durette-Desset, 1995).

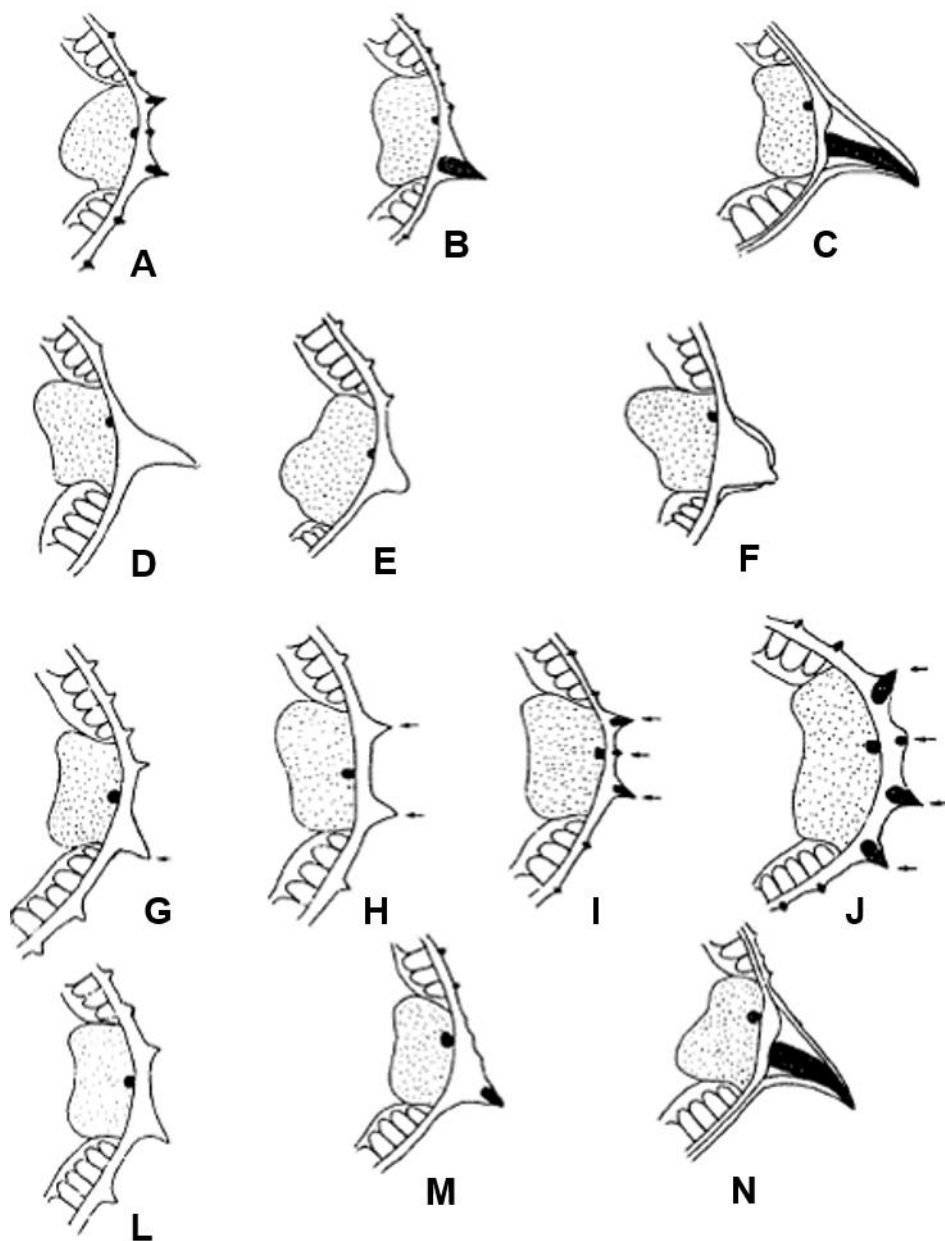


Figura 3. Sinlofe, diferenças morfológicas da asa cervical. Quanto ao tamanho: A - pequenos, visualizados somente em corte transversal; B - médios; C - mais desenvolvidos. Quanto à forma: D - pontiagudos; E - arredondados; F - semi-lua. Quanto ao número: G - uma crista; H - duas cristas; I - três cristas; J - quatro cristas. Base quitinoide: L - ausente; M - no ápice da asa cervical; N - reforçando todo o comprimento da asa cervical (Fonte: Bem Slimane *et al.*, 1996).

Oswaldocruzia inclui parasitas que habitam o estômago e intestino delgado de anfíbios e répteis (Burse e Goldberg, 2005; Bursey e Goldberg,

2011; Durette-Desset *et al.*, 2006; Goldberg *et al.*, 2009), no entanto, quando sua intensidade de infecção é elevada podem ser encontrados inclusive no intestino grosso (Lent *et al.*, 1946). São nematoides cosmopolitas, mas pouco se sabe sobre sua biologia (Baker, 1978; Hendrikx e Moppes, 1983). São registradas aproximadamente 90 espécies de *Oswaldocruzia* em todo o mundo (Burse e Goldberg, 2011; Guerrero, 2013).

No grupo Continental Neotropical são descritas, ao todo 34 espécies de *Oswaldocruzia* em anfíbios e répteis (Tabela 1), sendo 22 espécies em anfíbios na América do Sul e dentre elas, seis são registradas em anfíbios no Brasil: *Oswaldocruzia belenensis* Santos, Giese, Maldonado et Lanfredi, 2008, *Oswaldocruzia chambrieri* Bem Slimane et Durette-Desset, 1993, *Oswaldocruzia lopesi* Freitas et Lent, 1938, *Oswaldocruzia proencai* Bem Slimane et Durette-Desset, 1995, *Oswaldocruzia subauricularis* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1917 e *Oswaldocruzia vaucheri* Bem Slimane et Durette-Desset, 1993. A distribuição geográfica destas espécies parece ser mais determinante do que a especificidade parasitária (Ben Slimane *et al.*, 1995).

Tabela 1. *Oswaldocruzia* spp. do grupo Continental Neotropical com suas localidades e hospedeiros.

Espécies	Localidade	Família dos Hospedeiros
<i>O. albaretii</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1996	Equador, Guiana Francesa	Hylidae, Leptodactylidae
<i>O. anolisi</i> Barus e Coy Otero, 1968	Cuba	Polychrotidae, Teiidae, Tropiduridae
<i>O. baina</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1996	Equador	Polychrotidae
<i>O. belenensis</i> Santos, Giese, Maldonado, and Lanfredi, 2008	Brasil	Bufoidea

Continuação da Tabela 1.

Espécies	Localidade	Família dos Hospedeiros
<i>O. bonisi</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1993	Equador	Plethodontidae,
<i>O. brasiliensis</i> Lent e Freitas, 1935	Brasil	Colubridae, Gekkonidae
<i>O. burseyi</i> Durette-Desset, Alves dos Anjos e Vrcibradic, 2006	Brasil	Polychrotidae
<i>O. cartagoensis</i> n. sp. Bursey e Goldberg, 2011	Costa Rica	Plethodontidae
<i>O. cassonei</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1996	Equador	Leptodactylidae
<i>O. chabaudi</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1996	Equador	Hylidae
<i>O. chambrieri</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1993	Brasil, Equador	Bufoidea
<i>O. costaricensis</i> Bursey e Goldberg, 2005	Costa Rica	Ranidae
<i>O. dlouhyi</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1995	Brasil	Bufoidea
<i>O. fredii</i> Durette-Desset, Alves dos Anjos, e Vrcibradic, 2006	Brasil	Polychrotidae
<i>O. lamotheargumedei</i> Ruiz-Torres et al. 2013	México	Bufoidea
<i>O. lescurei</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1996	Guiana Francesa	Bufoidea
<i>O. lenteixeirai</i> Perez-Vigueras, 1938	Cuba, Porto Rico	Hylidae, Leptodactylidae
<i>O. lopesi</i> Freitas e Lent, 1938	Brasil	Leptodactylidae
<i>O. manuensis</i> Guerrero, 2013	Peru	Bufoidea
<i>O. mazzai</i> Travassos, 1935	Brasil, Equador	Bufoidea
<i>O. neghmei</i> Puga, 1981	Chile	Leptodactylidae
<i>O. nicaraguensis</i> Bursey, Goldberg e Vitt, 2006	Nicarágua	Teiidae
<i>O. panamaensis</i> Bursey, Goldberg e Telford, 2007	Panamá	Gymnophthalmidae
<i>O. peruensis</i> Ben Slimane, Verhaagh e Durette-Desset, 1995	Peru	Tropiduridae
<i>O. petterae</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1996	Equador	Leptodactylidae
<i>O. proencai</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1995	Brasil, Paraguai	Bufoidea, Leptodactylidae
<i>O. subauriacularis</i> (Rudolphi, 1819) Travassos, 1917	Brasil	Bufoidea, Leptodactylidae
<i>O. taranchoni</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1995	Brasil	Bufoidea

Continuação da Tabela 1.		
Espécies	Localidade	Família dos Hospedeiros
<i>O. tcheprakovae</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1996	Equador	Leptodactylidae
<i>O. touzeti</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1993	Equador	Leptodactylidae
<i>O. urubambaensis</i> Guerrero, 2013	Peru	Bufonidae
<i>O. vaucheri</i> Ben Slimane e Durette-Desset, 1993	Equador	Strabomantidae
<i>O. venezuelensis</i> Ben Slimane, Guerrero e Durette-Desset, 1996	Venezuela	Bufonidae
<i>O. vitti</i> Bursey e Goldberg, 2004	Brasil	Gymnophthalmidae

Oswaldocruzia spp. do grupo denominado “Continental Neotropical” agrupa as espécies que apresentam espículos idiomórficos e forquilha espicular dividida dentro do terço distal do comprimento total. A hipótese mais atual sugere que esse grupo possa ter surgido da migração das espécies Neárticas para a região Neotropical durante o período Plioceno e influenciado também na morfologia do grupo Caribe Neotropical devido à sua invasão na região do Caribe (Ben Slimane *et al.*, 1996). O grupo Caribe Neotropical possui uma riqueza menor de espécies descritas que o Continental Neotropical, esse fator pode ser explicado devido ao grupo ter surgido mais recentemente que o primeiro (Durette-Desset *et al.*, 2006).

Segundo Griffin (1988) apud Hendrikx e Moppes (1983) *Oswaldocruzia pipiens* Walton, 1929 e *Oswaldocruzia filiformis* Goeze, 1782 da região Norte Americana seguem um padrão de desenvolvimento semelhante aos tricostrongilídeos. Nas fezes, as larvas se desenvolvem até a fase infectante, a infecção se dá pela penetração na pele do anfíbio hospedeiro, quando atingem a mucosa do estômago ocorre desenvolvimento do nematoide que,

posteriormente, vão migrar até o lúmen do intestino delgado e se estabelecerão na fase adulta (Baker, 1978).

Os girinos não são infectados por larvas de *Oswaldocruzia* spp. em seu ambiente aquático devido a fatores ecológicos, já que os nematoides são péssimos nadadores, se dispersariam facilmente na água e provavelmente não poderiam penetrar na pele do hospedeiro (Baker, 1978). Ainda segundo Baker (1978), a época de transformação dos girinos coincide com o pico de população de anfíbios e a abundância dos anfíbios neste período marca também a fase de maior desenvolvimento e transmissão de *O. pipiens*.

Alguns gêneros pertencentes à família Molineidae possuem uma morfologia muito parecida com *Oswaldocruzia*, dentre eles pode se destacar a *Bakeria* Moravec e Sey, 1986, parasita de anfíbios, proposto como subgênero pela primeira vez por Moravec e Sey (1986) que consideraram a presença de gubernáculo ser um indicativo de uma filogenia distante.

Em uma revisão dos tricostrongilídeos por Ben Slimane *et al.* (1996), o subgênero *Bakeria* foi elevado para gênero, justificado pela presença de gubernáculo que é considerado caractere básico de separação e espículos morfológicamente distintos. No entanto, para ambos os gêneros utiliza a mesma terminologia para a descrição da bolsa copuladora. O gênero apresenta apenas duas espécies, *B. schadi* Bursey, Goldberg e Grismer, 2014 e *B. bakeri* Moravec e Sey, 1986 encontrados na Malásia e Papua-Nova Guiné, respectivamente.

As espécies de *Schulzia* Travassos, 1937, parasitas de anfíbios neotropicais (Gibbons, 2010), também possuem uma morfologia muito semelhante a *Oswaldocruzia*. Durette-Desset *et al.* (1985) caracterizaram

Schulzia diferenciando de *Oswaldocruzia* por ter o raio dorsal mais longo que os outros raios da bolsa copuladora, um vestíbulo composto por três ramos musculosos sendo o ramo do meio alinhado com a *vagina vera*, ausência de espinho caudal e ovos embrionados.

Kentropyxia Baker, 1982, criado a partir de espécimes coletados em *Kentropyx calcaratus* Spix, 1825, possui duas espécies: *K. sauria* Neves Feitosa, Furtado, Santos et Vasconcelos Melo, 2015 em réptil e *K. hylae* Neves Feitosa, Furtado, Santos et Vasconcelos Melo, 2015 em anfíbio, ambas descritas no Brasil na região Amazônica. Este gênero se assemelha muito com *Oswaldocruzia* pela morfologia da bolsa copuladora, presença de sinlofe simples e ausência de gubernáculo nos machos, mas difere facilmente por possuir uma coroa radiata vestigial na extremidade cefálica, os espículos são robustos e tripartidos, divididos em um processo externo único e processos internos latero-dorsal e latero-ventral terminando em numerosos ramos finos (Baker, 1982; Neves Feitosa *et al.*, 2015). A disposição dos raios 6 e 8 da bolsa copuladora deste gênero pertencem ao tipo I, sendo considerado o mais primitivo dentre os três tipos classificados em *Oswaldocruzia* e a presença de coroa radiata sugere que *Kentropyxia* seja um gênero primitivo em relação a *Oswaldocruzia* (Neves Feitosa *et al.*, 2015).

Os gêneros *Bakeria*, *Kentropyxia* e *Schulzia* são pertencentes ao grupo “Antigos” possuindo caracteres arcaicos que os difere de *Oswaldocruzia*, no entanto são ancestrais plausíveis de *Oswaldocruzia* podendo ser considerados como um ancestral direto do gênero (Bem Slimane *et al.*, 1996).

As espécies do grupo “Continental Neotropical”, ao contrário das espécies do grupo denominado Holárticas, possuem características comuns compondo um grupo homogêneo (Bem Slimane e Durette-Desset, 1996). Essa homogenia torna difícil o diagnóstico das espécies, que podem ser complexos de espécies, quando duas ou mais espécies distintas são classificadas com uma única espécie (Bickford et al., 2006), subestimadas nos diferentes tipos de hospedeiros anfíbios e nas diferentes regiões brasileiras, tornando necessário uma análise morfológica mais acurada das estruturas mais importantes (sinlofes, bolsa copuladora e espículos).

Com base no exposto, verificamos que a taxonomia das espécies de *Oswaldocruzia* é complexa e demanda diversas abordagens morfológicas para a identificação precisa das espécies. Neste sentido, concluímos que a realização de estudos morfológicos detalhados com este grupo de parasitas poderá contribuir de forma significativa para o conhecimento das espécies que compõem esse gênero na região Neotropical e direcionar também os próximos passos com biologia molecular.

2. REFERÊNCIAS

Baker MR. Development and transmission of *Oswaldocruzia pipiens* Walton, (Nematoda: Trichostrongylidae) in amphibians. Canadian Journal of Zoology. 1978; 56(5):1026-1031.

Baker MR. On two new nematode parasites (Trichostrongyloidea: Molineidae) from amphibians and reptiles. Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 1982; 49:252-257.

Ben Slimane B, Durette-Desset MC. *Oswaldocruzia* (Nematoda, Trichostrongylina, Molineoidea) parasites d'Amphibiens du Bresil et de l'Equateur, avec redefinition de l'espece-type *O. subauricularis* (Rudolphi, 1819) et d' *O. mazzai* Travassos, 1935. Revue Suisse de Zoologie. 1995; 102(3):635-653.

Ben Slimane B, Lluch J, Durette-Desset MC. Two new species of the genus *Oswaldocruzia* Travassos, 1917 (Nematoda: Trichostrongylina: Molineoidea) parasitizing spanish amphibians. Research and Reviews in Parasitology. 1995; 55(4):209-215.

Ben Slimane B, Chabaud AG, Durette-Desset MC. Les nematodes Trichostrongylina parasites d'amphibiens et de reptiles: problemes taxonomiques, phylctiques et biogeographiques. Systematic Parasitology. 1996; 35:179–206.

Bem Slimane B, Durette-Desset MC. New *Oswaldocruzia* (Nematoda, Trichostrongylina, Molineoidea) parasites of Amphibians from French Guyana and Ecuador. Miscellània Zoològica. 1996; 19(1):55-66.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, NG P.K.L, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in ecology & evolution. 2007; 22(3):148-155.

Bursey CR, Goldberg SR. New species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Molineoidea), new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), and other

helminthes in *Rhana cf. forreri* (Anura: Ranidae) from Costa Rica. *Journal of Parasitology*. 2005; 91(3):600-605.

Burseley CR, Goldberg SR. New species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Molineidae) and other helminthes in *Bolitoglossa subpalmata* (Caudata: Plethodontidae) from Costa Rica. *Journal of Parasitology*. 2011; 97(2):286-292.

Durette-Desset, MC, Baker MR, Vaucher C. Helminthes parasites du Paraguay. IX: remaniement et redéfinition du genre *Schulzia* Travassos, 1937. *Revue Suisse de Zoologie*. 1985; 92(4):811-821.

Durette-Desset MC, Chabaud AG. Nomenclature des Strongylida au-dessus du groupe-famille. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 1993; 68(2):111-112.

Durette-Desset MC, Beveridge I, Spratt DM. The origins and evolutionary expansion of the Strongylida (Nematoda). *International Journal for Parasitology*. 1994; 24(8):1139-1165.

Durette-Desset MC, Alves DAL, Vrcibradic D. Three new species of the genus *Oswaldocruzia* travassos, 1917. *Parasite*. 2006; 13:115-125.

Gibbons LM. (Ed.). Keys to the nematode parasites of vertebrates: supplementary volume. CABI; 2010. 416 p.

Goldberg SR, Bursey CR, Caldwell JP, Shepard DB. Gastrointestinal helminths of six sympatric species of *Leptodactylus* from Tocantins State, Brazil. *Comparative Parasitology*. 2009; 76(2):258-266.

Griffin CT. The effect of constant and changing temperatures on the development of the eggs and larvae of *Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda: Trichostrongyloidea). *Journal of Helminthology*. 1988; 62(4): 281-292.

Guerrero R. Two new species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Trichostrongylina: Molineoidea) parasites of the cane toad *Rhinella marina* (Amphibia: Anura) from Peru. *Acta Parasitologica*. 2013; 58(1):30-38.

Hendrikx WML, Moppes MC. *Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda: Trichostrongylidae): Morphology of developmental stages, parasitic development and some pathological aspects of the infection in amphibians. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1983; 69:523-537.

Lent H, Freitas JF, Proença MC. Alguns helmintos de batráquios colecionados no Paraguai. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1946; 44(1):195-214.

Moravec F, Sey O. Three new nematode species from *Phrynomantis* spp. (Amphibia: Microhylidae) from Papua New Guinea. *Folia Parasitologica*. 1986; 33(4):343–351.

Neves Feitosa LA, Furtado AP, Santos JN, Vasconcelos Melo FT. A new species of *Kentropyxia* Baker, 1982 parasitic in the small intestine of *Osteocephalus taurinus* Steindachner (Anura: Hylidae) from the Brazilian Eastern Amazon. *Systematic Parasitology*. 2015; 92(3):251-259.

Novokhatskaya OV. The first finding of the nematode *Oswaldocruzia filiformis* (Molineidae) in the burbot (*Lota lota*). *Zoologičeskij Žurnal*. 2007; 86(7):891-892.

Walton AC. The Nematoda as parasites of Amphibia. II. *The Journal of Parasitology*. 1935; 21(1):27-50.

Rudolphi CA. *Entozoorum synopsis*. Berolini; 1819. 811 p.

Travassos L. Trichostrongylinas brasileiras (5e nota previa). *Oswaldocruzia* n. gen. *Brazil Medico*. 1917; 31:9.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE TRÊS ESPÉCIES DE *OSWALDOCRUZIA* (NEMATODA: MOLINEIDAE) DO BRASIL

1. RESUMO

A subordem Trichostrongylina inclui a família Molineidae em que está inserido o gênero *Oswaldocruzia*, o qual inclui espécies parasitas que habitam o trato gastrointestinal de anfíbios e répteis. São cosmopolitas, com aproximadamente 90 espécies em todo mundo e, dentre estas, 36 espécies parasitam anuros da família Bufonidae. *Oswaldocruzia* spp. apresentam caracteres muito parecidos, caracterizando assim um grupo muito homogêneo. No entanto, suas estruturas como os sinlofes, espículos e bolsa copuladora possuem morfologia e classificação distintas que contribuem intrinsecamente para diferenciar e identificar suas espécies. O presente estudo tem por objetivo realizar uma avaliação taxonômica de espécies de *Oswaldocruzia* em três diferentes regiões do Brasil. Espécimes de *Oswaldocruzia* spp. foram coletados em estômago e intestino de *Rhinella* spp., clarificados com fenol e analisados em microscópio com sistema de análise de imagens. Amostras de cada helminto foram também analisada por microscopia eletrônica de varredura para análise da morfologia externa. Cortes histológicos foram realizados para estudos dos sinlofes. Foram identificadas três espécies de *Oswaldocruzia* nos Estados do Mato Grosso do Sul, Piauí e São Paulo sendo que *Oswaldocruzia proencai* e *Oswaldocruzia* sp. 1 possuem a bolsa copuladora do Tipo II e *Oswaldocruzia* sp. 2 uma bolsa copuladora do Tipo III. Apesar de *Oswaldocruzia* sp. 1 apresentar um padrão de bolsa copuladora parecido à de *O. proencai*, a dilatação cefálica apresentou-se morfologicamente diferente entre as duas espécies assim como os sinlofes. O estudo reforçou a dificuldade na identificação taxonômica das espécies *Oswaldocruzia* dada a homogenia das espécies e também a identificação de duas possíveis espécies novas.

PALAVRAS-CHAVES: Nematoda, Trichostrongylina, Bufonidae, Anura

2. ABSTRACT

The suborder Trichostrongylina includes the family Molineidae that belongs to the genus *Oswaldocruzia*, that are parasite inhabiting the gastrointestinal tract of amphibians and reptiles, they are cosmopolitan with approximately 90 species worldwide and among these, 36 species parasitize Bufonidae. Species of *Oswaldocruzia* genus have very similar characteristics, thus making a group very homogeneous, however, structures as the sylophes, spicules and caudal bursa have distinct morphology and classification that contribute intrinsically to differentiate and identify their species. The accurate analysis of the structures already mentioned, together with morphometric data, help to diagnose species correctly. The present study aims to carry out a taxonomic evaluation of *Oswaldocruzia* species in three different regions of Brazil. *Oswaldocruzia* spp. specimens were collected in the stomach and intestine of *Rhinella* spp., clarified with phenol, and analyzed in microscope with an image analysis system. Samples of each helminth were analyzed by scanning electron microscopy to analysis of the external morphology. Histological sections were also used to study the synlophes. Three *Oswaldocruzia* species were identified in the states of Mato Grosso do Sul, Piauí, and São Paulo. *Oswaldocruzia proencai* and *Oswaldocruzia* sp. 1 possess the caudal bursa belonging to Type II and *Oswaldocruzia* sp. 2 a Type III caudal bursa. Although *Oswaldocruzia* sp. 1 presented a caudal bursa pattern similar to *O. proencai*, cephalic dilation presented morphologically different between the two species as well as the sylophes. The study reinforced the difficulty in the taxonomic identification of *Oswaldocruzia* species due to the homogeneity of the species and also the identification of two possible new species.

KEYWORDS: Nematoda, Trichostrongylina, Bufonidae, Anura

3. INTRODUÇÃO

A subordem Trichostrongylina (Nematoda) inclui a família Molineidae na qual está inserido o gênero *Oswaldocruzia* Travassos, 1917. As espécies deste gênero são parasitas que habitam o trato gastrointestinal, principalmente de anfíbios e em menor quantidade em répteis (Durette-Desset *et al.*, 2006). São cosmopolitas com aproximadamente 90 espécies em todo mundo e, dentre estas, 36 espécies parasitam anuros da família Bufonidae (Burseley e Goldberg, 2011; Guerrero, 2013; Svitin e Kuzmin, 2012).

Oswaldocruzia spp. apresentam caracteres muito parecidos caracterizando um grupo muito homogêneo. No entanto, estruturas como os sinlofes, espículos e bolsa copuladora possuem morfologia e classificação distintas que contribuem intrinsecamente para a diferenciação e identificação das espécies. É imprescindível que para a definição das espécies seja feito um corte transversal ao nível do esôfago e meio do corpo para estudo dos sinlofes e os espículos devem ser dissecados para melhor visualização, pois encontram-se dentro do corpo do nematoide (Bem Slimane *et al.*, 1996).

O termo sinlofe proposto por Durette-Desset (1969) significa em grego “algo que seja saliente” e foi usado para designar o conjunto de cristas que se distribuem ao longo do corpo. Este órgão possui a função de aderir nas vilosidades intestinais para garantir uma melhor fixação, ou mesmo, para sua locomoção sem que o trânsito do sistema digestivo carregue o nematoide. Por ser similar em ambos os sexos, esta estrutura permite que o macho corresponda com a fêmea da mesma espécie em casos de infecções do hospedeiro por espécies diferentes de *Oswaldocruzia* (Durette-Desset, 1971). Os sinlofes

podem ser classificados quanto a forma de suas cristas, ou seja, se possuem formatos onduladas ou salientes, por onde eles surgem no nematoide, se possuem ou não base quitinoide como reforço, quanto aos números de cristas presentes no corpo e presença ou não de asas cervicais (Bem Slimane *et al.*, 1996).

Os espículos (Figura 4) são estruturas que compõem o sistema reprodutor dos machos e possuem três partes: lâmina, forquilha e sapato. Cada uma dessas estruturas apresenta morfologias diferentes quanto ao seu formato, número de processos terminais da lâmina, ramos extras e tamanho da forquilha, e podem também ser classificadas em “idiomórficos” ou “não idiomórficos” (Bem Slimane *et al.*, 1996). *Oswaldocruzia* spp. do grupo Neotropical Continental apresentam espículos idiomórficos, que se caracterizam por possuir a divisão da forquilha no terço final do comprimento do espículo (Bem Slimane *et al.*, 1996).

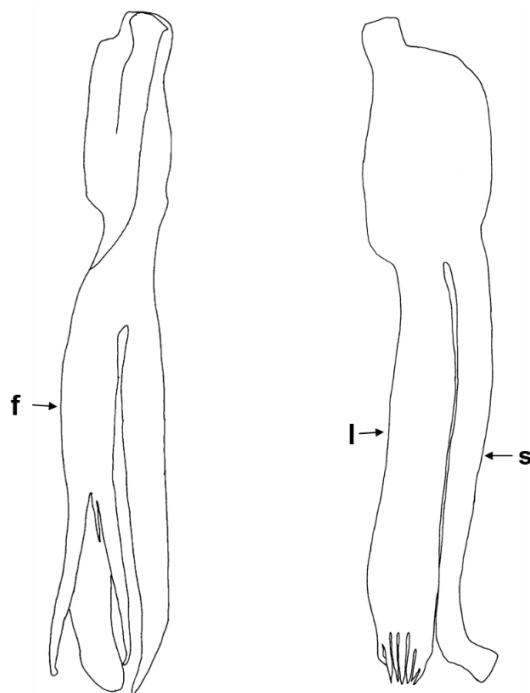


Figura 4. Representação do espículo e suas estruturas: f – forquilha; l – lâmina; s – sapato.

A bolsa copuladora é uma estrutura composta por vários raios (Figura 5) localizados na extremidade posterior dos machos e possui a função de cópula envolvendo seus raios na vulva da fêmea para melhor fixação. As espécies do gênero *Oswaldocruzia* possuem três tipos de bolsa copuladora e sua classificação é feita pela disposição relativa dos raios 6 e 8, a saber: Tipo I considerado o mais primitivo com os raios 8 separados do raio 6 em todo seu trajeto; Tipo II o raio 8 nasce separado do raio 6 e se junta em sua parte mediana; Tipo III A o raio 8 permanece junto com o raio 6 exceto na porção distal e Tipo III B o raio 8 possui um tronco comum com os raios 4, 5 e 6 e permanece junto dos raios 6 exceto na porção distal (Bem Slimane *et al.* 1996). Nas espécies da região Neotropical pode-se encontrar todos os três tipos de bolsa copuladora (Bem Slimane e Durette-Desset, 1995).

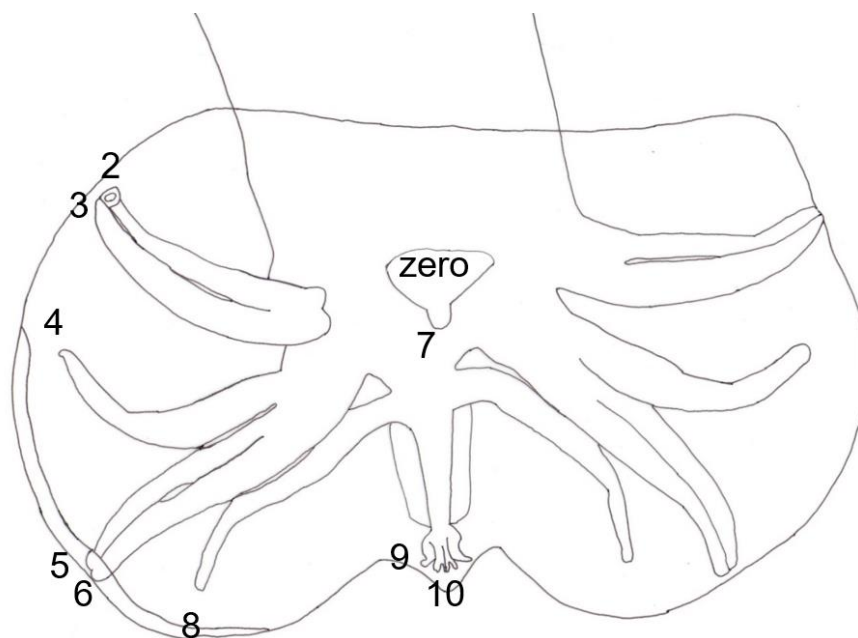


Figura 5. Distribuição dos raios da bolsa copuladora classificados em números.

Apesar destes caracteres ajudarem em sua identificação, o grupo ainda apresenta problemas taxonômicos por apresentarem uma morfologia geral uniforme e baixa especificidade do parasita-hospedeiro (Bem Slimane *et al.* 1996), levando a um possível complexo de espécies em diversos estudos da helmintofauna de anfíbios. A análise acurada das estruturas já citadas aliada aos dados morfométricos, auxiliam a uma correta identificação das espécies.

Com base no exposto, o presente estudo tem por objetivo realizar a descrição taxonômica de três espécies distintas de *Oswaldocruzia* encontradas em anfíbios no Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (São Paulo) e Nordeste (Piauí), com intuito de descrever morfologicamente utilizando os caracteres morfológicos e morfométricos já descritos destes parasitas na região Neotropical.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAIS DE COLETA DOS ANFÍBIOS.

As amostras de *Oswaldocruzia* spp. incluídas no presente estudo foram coletadas em diferentes hospedeiros de três distintas regiões no Brasil, a saber: 1) Sudeste, *Rhinella schneideri* Werner, 1894 (Figura 9) e *Rhinella icterica* Spix, 1824 (Figura 10), coletadas na Chácara Capão Bonito (22°53'57.43"S; 48°31'29.92"O), Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, no período de março de 2016 a janeiro de 2017 (Figura 6); 2) Centro-Oeste, *Rhinella schneideri* coletada na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cisalpina (21°16'25.70"S; 51°54'36.29"O), Brasilândia, Mato Grosso do Sul, no período de

janeiro de 2017 (Figura 7); e 3) Nordeste, *Rhinella jimi* Stevaux, 2002 (Figura 11) e *Rhinella granulosa* Spix, 1824 (Figura 12), proveniente do Campus Universitário Senador Helvídio Nunes de Barros (7°5'6.07"S; 41°26'11.14"O), Picos, Piauí, no período de julho de 2015 a junho de 2016 (Figura 8).

As coletas dos hospedeiros foram realizadas com autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), números 7996-1 (Botucatu, SP), 59230-1 (RPPN Cisalpina, MS) e 22508-2 (Picos, PI). A coleta de parasitas foi realizada de acordo com os aspectos éticos, autorizado pelo órgão competente (CEUA/IBB/UNESP #857).

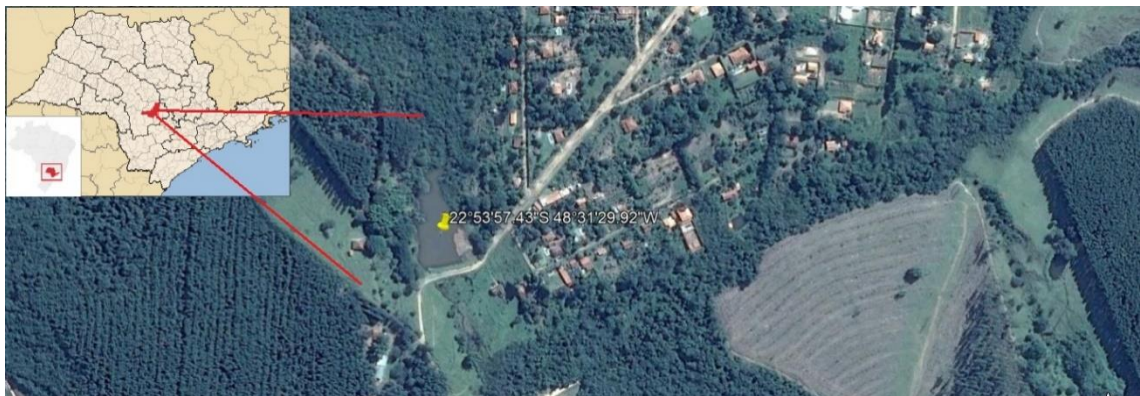


Figura 6. Lago da Chácara Capão Bonito, Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, onde foram coletados os espécimes de *Rhinella schneideri* e *Rhinella icterica*.



Figura 7. Trecho da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cisalpina, Brasilândia, Mato Grosso do Sul, onde foram coletados os espécimes de *Rhinella schneideri*.



Figura 8. Campus Universitário Senador Helvídio Nunes de Barros, Picos, Piauí, onde foram coletados os espécimes de *Rhinella jimi* e *Rhinella granulosa*.



Figura 9. *Rhinella schneideri* (Crédito: R. J. da Silva).



Figura 10. *Rhinella icterica* (Crédito: R. J. da Silva).



Figura 11. *Rhinella jimi* (Crédito: H. F. de Oliveira).



Figura 12. *Rhinella granulosa* (Crédito: R. J. da Silva).

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DOS NEMATOIDES

Os nematoides recuperados no estômago e intestino foram fixados em solução aquecida (70°C) de AFA (álcool-formol-ácido acético) e, então, preservados em álcool 70%. Para a identificação taxonômica, as amostras de helmintos foram clarificadas com lactofenol de Aman (Amato *et al.*, 1991). Os nematoides foram analisados em sistema computadorizado de análise de imagens (Leica Application Suite - LAS V3.8), associado a um microscópio Leica-DM 5000 B com sistema de contraste por interferência diferencial (DIC).

Para análise das cristas cuticulares foram realizados cortes transversais, preferencialmente na região do meio do corpo, de acordo com os métodos de Durette-Desset (1985).

Os desenhos foram feitos com o auxílio de um microscópio Leica-DMLS equipado com câmara clara. As medidas são dadas em micrômetros salvo indicações em contrário. A primeira medida corresponde à média seguida de desvio padrão e os valores mínimo e máximo em parênteses. A bolsa copuladora, espículos e sinlofes foram descritos de acordo com Bem Slimane *et al.* (1996).

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para visualização dos sinlofes, as amostras foram submetidas a cortes histológicos. Para tanto, as amostras, após serem retiradas do material fixador, passa por um processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool (3 lavagens em 70°GL substituído a cada duas horas, em seguida o material permanecerá em álcool 95°Gl por 2h). Foi realizada a passagem do material para

uma mistura de resina + álcool por 12h. O material foi transferido para a resina de infiltração e, posteriormente, feita a inclusão do material com a resina. Cortes de 8 micrômetros foram realizados com o auxílio de micrótomo Leica RM 2165 que foram corados com Hematoxilina-Eosina e Azul de Toluidina (Michalany, 1980).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O material foi fixado em álcool 70%, a desidratação foi realizada com sequência crescente de soluções de álcool etílico, sendo a secagem realizada por meio do ponto crítico com CO₂ líquido. Os espécimes foram colados em suporte adequado e recobertos com uma camada de ouro em aparelho. A análise foi realizada em MEV-SEM 515 da Philips (Allison et al., 1972).

5 RESULTADOS

Redescrição de *Oswaldocruzia proencai* Bem Slimane et Durette-Desset, 1995 (Figuras 13-15).

Hospedeiros: *Rhinella schneideri* e *Rhinella icterica*.

Localidade: Chácara Capão Bonito (22°53'57.43"S; 48°31'29.92"O), Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo.

Período de coleta: março de 2016 a janeiro de 2017

Geral: Coloração branco-amarelado, dimorfismo sexual bem evidente, machos com aproximadamente $\frac{3}{4}$ do comprimento da fêmea. Vesícula cefálica estriada transversalmente constituída de duas partes, com presença de uma dilatação na

parte anterior muito pronunciada e estreitamento na parte posterior, conspícua divisão entre a parte anterior e posterior. Cristas cuticulares longitudinais paralelas, com ausência de base quitinoide, cristas surgindo imediatamente após a dilatação cefálica e terminando anteriormente à bolsa copuladora nos machos e no fim da cauda anteriormente ao espinho caudal nas fêmeas, algumas aparecendo e desaparecendo ao longo do corpo. Asa cervical visível somente em corte transversal. Esôfago claviforme com ligeira contração ao nível do anel nervoso, que se situa próximo ao meio do esôfago, deirídios em formato triangular posterior ao poro excretor (Figura 15A).

Sinlofes (Figuras 15B-C): asa cervical lateral visualizada apenas em corte transversal, formada por duas cristas de tamanhos diferentes, com presença de estrutura fracamente visível orientadas ventralmente. Asa cervical transforma-se em cristas simples próximo ao intestino. Cristas na região do esôfago de formato triangular. Na região do meio do corpo as cristas cuticulares também apresentam formato cuticular orientadas perpendicularmente. Nos machos aproximadamente 44 cristas na região do esôfago e 52 cristas no meio do corpo. Macho: (Baseado em 11 espécimes). Comprimento 8312 ± 1471 (4367-10246). Largura no meio do corpo 204 ± 43 (99-259). Vesícula cefálica comprimento da dilatação anterior 46 ± 6 (35-57), comprimento da dilatação posterior 56 ± 18 (39-61), largura da maior dilatação 64 ± 4 (53-68), largura da menor dilatação cefálica 55 ± 3 (49-59). Anel nervoso 261 ± 21 (224-288), poro excretor 425 ± 55 (360-491) e deirídios a 459 ± 62 (388-550) da extremidade anterior. Esôfago claviforme 542 ± 63 (437-638) de comprimento. Bolsa copuladora trilobada

(Figuras 13D; 14C; 15H) com dois pares de papilas bursais (Figura 14C), arranjos dos raios correspondendo ao Tipo II com padrão 2-3 que tende a 2-1-2, raios 2 e 3 paralelos em toda a sua extensão, porém, ligeiramente separados em suas pontas atingindo a borda da bolsa copuladora, raios 4, 5 e 6 com origem comum, raios 4 curtos não atingindo a margem da bolsa copuladora, separado dos raios 5 e 6 da metade em diante, curvando-se cranialmente. Raios 5 e 6 paralelos em toda a sua extensão e atingindo a borda da bolsa copuladora. Raios 6 e 8 com origem independente, raio 8 surgindo perpendicularmente a raiz do raio dorsal e sobrepondo ligeiramente ao raio 6, se distancia no terço final sem atingir a margem da bolsa copuladora. Raios 9 surgem distalmente ao tronco do raio dorsal e se dividem em dois ramos formando os raios 10, cada raio 10 com presença de um ramo extra. Gubernáculo ausente. Cone genital apresentando 26 ± 7 (21-31) de comprimento e 30 ± 2 (28-31) de largura na base, com par de papilas 7 curtas pedunculadas. Espículo (Figuras 13B; 15D-E) 245 ± 15 (224-264) de comprimento, dividido em três principais troncos: sapato, lâmina e forquilha (dividida em dois troncos de tamanhos iguais), lâmina apresentando 9 processos distais de comprimento desigual e forquilha dividida no terço posterior ocupando cerca de 26% do comprimento do espículo.

Fêmea: (Baseado em 14 espécimes). Comprimento 15985 ± 2282 (12701-19937). Largura no meio do corpo 270 ± 34 (219-320). Vesícula cefálica (Figuras 13A; 14A-B; 15A) comprimento da dilatação anterior 48 ± 2 (45-50), comprimento da dilatação posterior 56 ± 8.19 (46-72), largura da maior dilatação 70 ± 4 (62-76), largura da menor dilatação 61 ± 4 (51-66). Anel nervoso 303 ± 21 (262-332), poro excretor 519 ± 54 (413 – 594) e deirídios a 572 ± 55 (463-644) do ápice.

Esôfago claviforme 650 ± 73 (582 – 862) de comprimento. Vulva com lábios conspícuos a 5930 ± 1029 (4563-7639) da extremidade caudal. Comprimento da vagina vera 65 ± 12 (40-76). Ovojector (Figuras 13E; 15G) dividido em vestíbulo 531 ± 92 (438-718) de comprimento, esfíncter anterior e posterior 79 ± 17 (57-110) e 75 ± 19 (48-108) de comprimento, respectivamente; e infundíbulo anterior e posterior 41 ± 6 (32-48) e 37 ± 6 (31-48) de comprimento respectivamente. Comprimento da cauda 231 ± 22 (200-270) e largura ao nível do ânus 100 ± 7 (88-112), terminando em um espinho caudal. Anfidelfa, ovos em mórula no útero 88 ± 13 (55-112) \times 50 ± 7 (32-76).

Comentários:

Bem Slimane e Durette-Desset (1995), ao estudarem exemplares de *O. mazzai* Travassos, 1935 descritos em *Rhinella schneideri* Werner, 1894, *Leptodactylus bufonis* Boulenger, 1894 e *Leptodactylus latrans* Steffen, 1815 no Paraguai por Lent *et al.* (1946), notaram que possuíam características diferentes a *O. mazzai* procedentes da Argentina, tais como: dilatação cefálica composta de duas partes, raios 8 mais curtos, divisão mais distal da forquilha e dois ramos da forquilha serem de tamanhos equivalentes. Devido a estas características foi proposto um novo táxon, *Oswaldocruzia proencai* (= *O. mazzai* sensu Lent *et al.*, 1946 nec Travassos, 1935).

Por esse grupo apresentar características bastante homogêneas, algumas estruturas devem ser observadas com relevância e as formas da bolsa copuladora representam um caractere muito importante para a diagnose das espécies (Bem Slimane *et al.*, 1996). Entre 41 espécies de *Oswaldocruzia* da

região Neotropical, 21 espécies apresentam a disposição dos raios da bolsa copuladora do Tipo II.

Oswaldocruzia proencai possui dilatação cefálica constituída de duas partes, espículos idiomórficos representados com a divisão da forquilha no terço final do comprimento do espículo e uma bolsa copuladora pertencente ao Tipo II, com raios 6 nascendo separados dos raios 8 e se juntando em sua parte mediana. Seis espécies da região Neotropical possuem essas características: *O. barusi* Bem Slimane e Durette-Desset, 1995, *O. benslimanei* Durette-Desset, Alves dos Anjos e Vrcibradic, 2006, *O. burseyi* Durette-Desset, Alves dos Anjos e Vrcibradic, 2006, *O. costaricensis* Bursey e Goldberg, 2005, *O. dlouhyi* Bem Slimane e Durette-Desset, 1995 e *O. fredii* Durette-Desset, Alves dos Anjos e Vrcibradic, 2006.

Oswaldocruzia burseyi parasita de *Enyalius perditus* Jackson, 1978 (Iguanidae) se diferencia por ter uma asa cervical pronunciada, composta por uma crista em forma de triângulo em sua base. Quando vista em corte transversal, as cristas cuticulares são onduladas divergindo das cristas com formato pontiagudo de *O. proencai*. Apresentam espículos maiores (250-280 vs. 224-264 µm) e lâmina com apenas seis processos distais comparado com nove processos em *O. proencai*.

Oswaldocruzia benslimanei parasita de *Enyalius bilineatus* Duméril e Bibron, 1837 (Iguanidae) possui uma asa cervical grande comparada com a do presente estudo, que só pode ser vista em corte transversal e as cristas cuticulares se apresentam onduladas não apresentando base quitinoide. Durette-Desset *et al.* (2006) ao descrever *O. benslimanei* não relataram o

número de processos da lâmina do espículo que representa um importante caractere de diagnose, portanto, não se sabe se os processos são ausentes na espécie ou não foi visto pelo autor por algum problema metodológico.

Oswaldocruzia fredii parasita de *Enyalius iheringii* Boulenger, 1885 (Iguanidae) diverge-se por apresentar uma asa cervical comprida e com grande largura, cristas cuticulares onduladas e sem base quitinoide e lâmina espicular terminada em seis processos diferindo de nove processos em *O. proencai*.

Oswaldocruzia dlouhyi parasita de anfíbios se diferencia de *O. proencai* por possuir ausência de base quitinoide nas cristas cuticulares, a bolsa copuladora apresenta os raios 4 mais longos que os raios 5 e os ramos da forquilha de tamanho desigual.

Oswaldocruzia barusi, mesmo compartilhando algumas estruturas parecidas com *O. proencai*, faz parte de um grupo distinto. A primeira espécie pertence ao Caribe Neotropical que apresenta como características espículos com seus ramos terminando em numerosas pontas, seus espículos quanto ao tamanho são bem menores que *O. proencai* (120 vs. 224-264 µm).

Burseley e Golberg (2005) descreveram *O. costaricensis* com padrão de bolsa copuladora do Tipo II, no entanto, Durette-Desset *et al.* (2006) analisando a figura do artigo original demonstraram que a bolsa copuladora se tratava na realidade do padrão Tipo I devido à grande separação entre os raios 6 e 8. Mais recentemente, Bursey e Golberg (2011), equivocadamente, publicaram uma tabela separando *O. costaricensis* com o padrão de bolsa descrito como no artigo original. Devido *O. costaricensis* não possuir o mesmo padrão de bolsa copuladora de *O. proencai* ela se distancia morfológicamente desta última

espécie. Os autores descreveram a espécie com a dilatação cefálica simples, mas examinando a figura que consta na descrição, a dilatação parece ser dupla.

Alguns autores desconsideram o formato da dilatação cefálica como um importante caractere de diferenciação de espécies, pois supõem sofrer de variações intraespecíficas, mas de acordo com a chave taxonômica de *Oswaldocruzia* da região Neotropical do grupo continental proposta por Bem Slimane *et al.* (1996), as espécies desse táxon são divididas em grupos de acordo com o formato da dilatação cefálica que apresentam duas morfologias distintas, uma simples e outra formada por duas partes, uma parte anterior dilatada e outra parte posterior estreita. Todos os exemplares de *O. proencai* analisados neste trabalho apresentaram a mesma morfologia de dilatação cefálica composta de duas partes, portanto não apresentando variações intraespecíficas.

Os estudos dos sinlofes em todo o corpo é um caráter importante para a diagnose das espécies segundo Bem Slimane *et al.* (1996), no entanto, deve-se tomar cuidado ao incluir os números de cristas, pois essa característica não é consistente havendo variação intraespecífica no número das mesmas (Santos *et al.*, 2008; Willkens *et al.*, 2016).

Neste trabalho foi realizado uma redescrição de *O. proencai* com importantes dados morfológicos e morfométricos que não foram totalmente representados por Lent *et al.* (1946). Estes aspectos podem estar relacionados devido as dificuldades técnicas e metodológicas na época em que foi descrito.

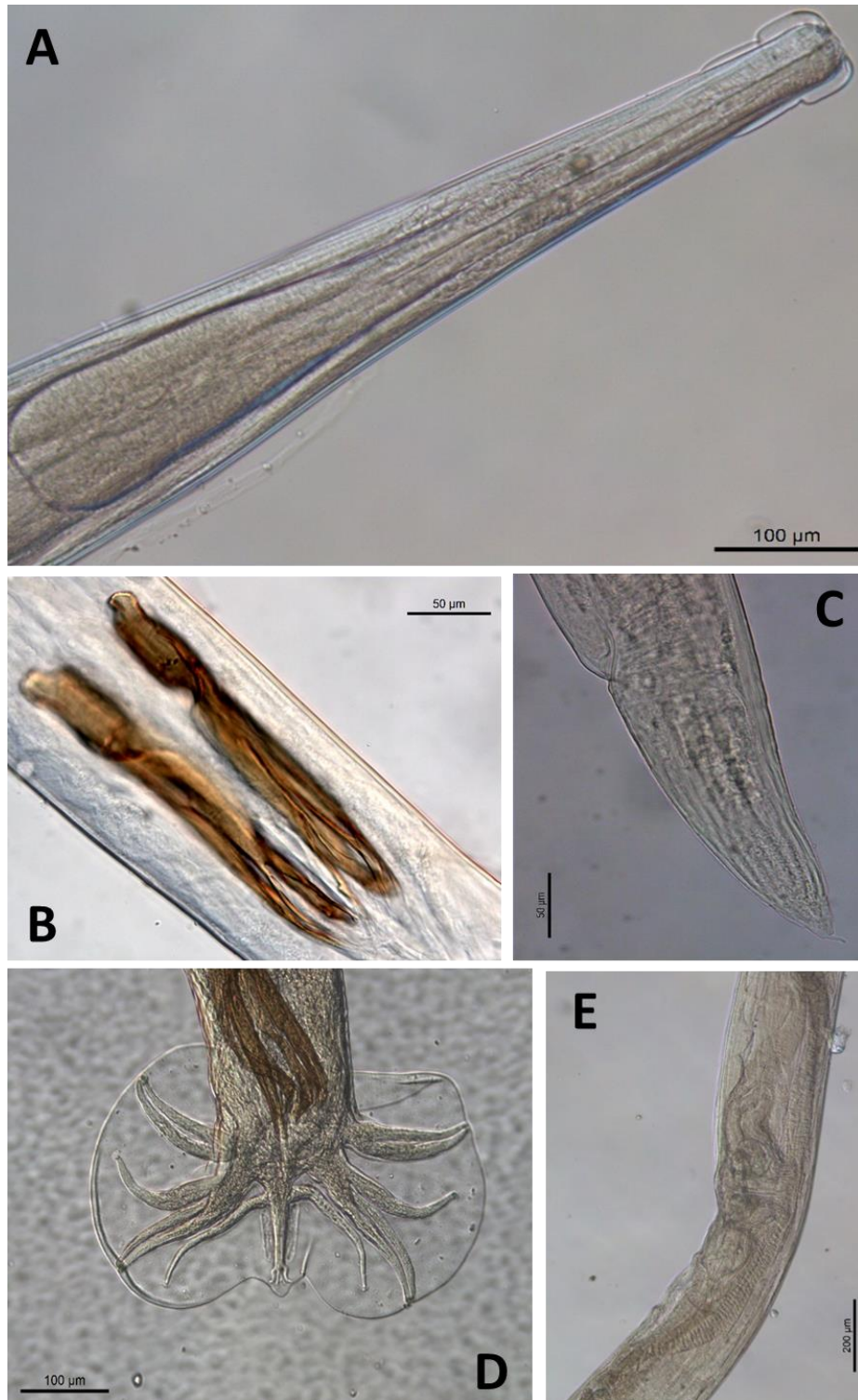


Figura 13. *Oswaldocruzia proencai*. **A.** Extremidade anterior, vista dorsal; **B.** Espículos, vista ventral; **C.** Fêmea, cauda, vista lateral esquerda; **D.** Macho, bolsa copuladora, vista ventral; **E.** Fêmea, ovojector, vista lateral esquerda.

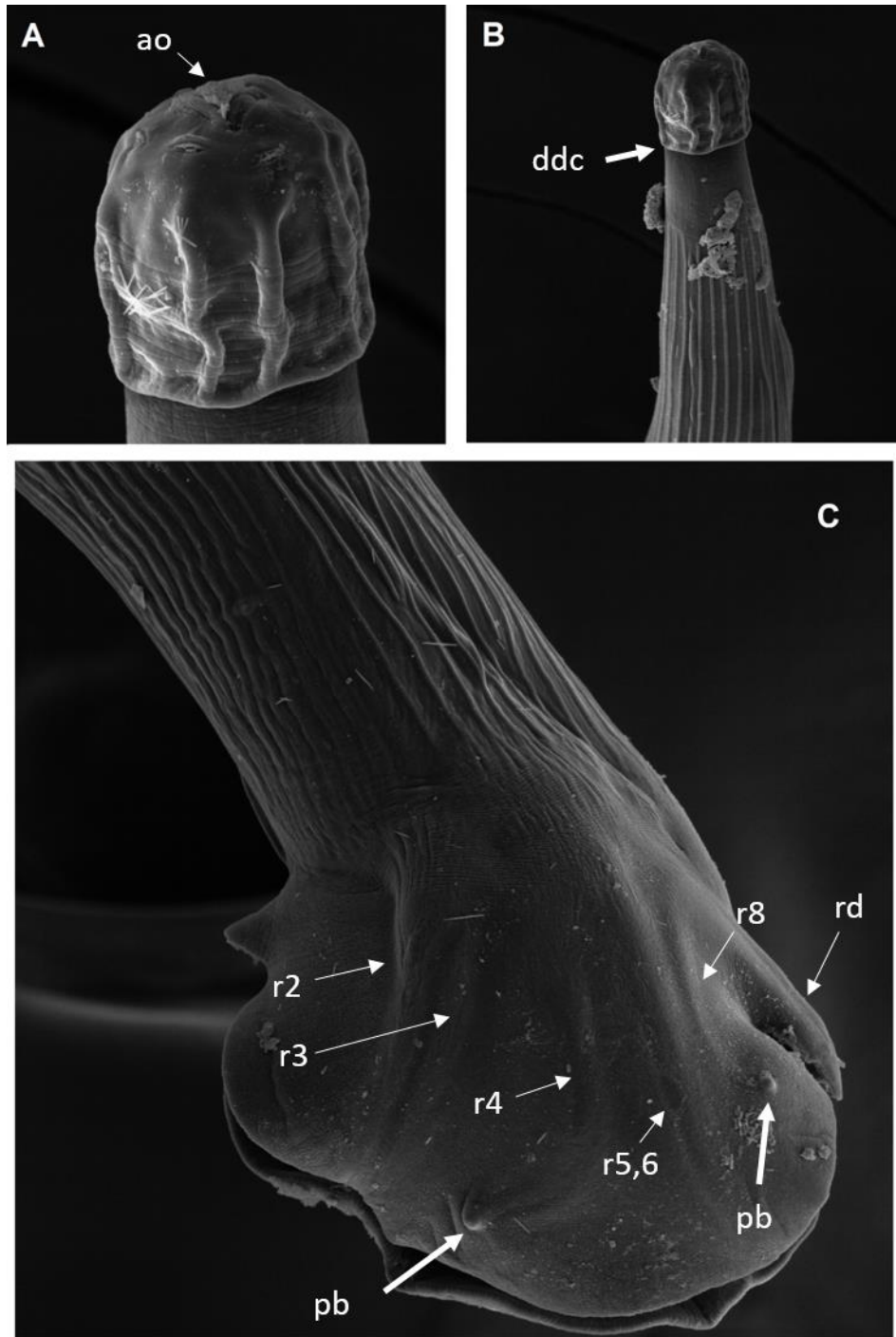


Figura 14. *Oswaldocruzia proencai*, microscopia eletrônica de varredura **A.** Vista da extremidade anterior mostrando abertura oral e papilas cefálicas; **B.** Vista da região anterior mostrando a dilatação cefálica constituída de duas partes; **C.** Visão lateral da região posterior do macho mostrando os raios de 2 a 8 suportados pela bolsa copuladora, duas papilas bursais e o raio dorsal. Abreviações: ao - abertura oral; ddc - divisão da dilatação cefálica; pb - papilas bursais; r – raio; rd - raio dorsal.

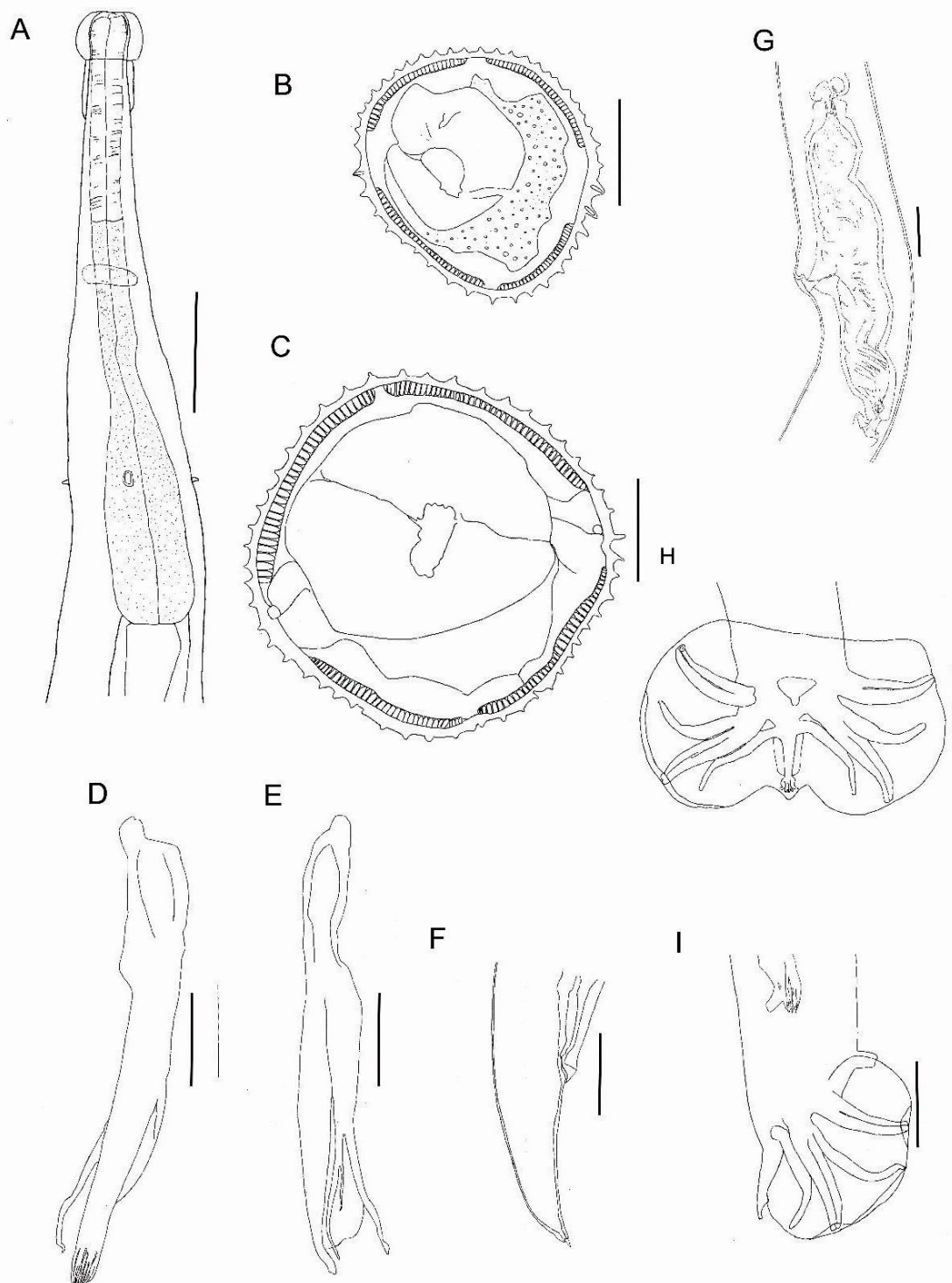


Figura 15. *Oswaldocruzia proencai*. **A.** Parte anterior do corpo, fêmea, vista ventral. Escala = 100 μ m; **B.** Sinlofe na região do esôfago, macho. Escala = 50 μ m; **C.** Sinlofe no meio do corpo, macho. Escala = 50 μ m; **D.** Espículo, vista externo dorsal. Escala = 50 μ m; **E.** Espículo, vista lateral. Escala = 50 μ m; **F.** Cauda, vista lateral. Escala = 100 μ m; **G.** Vulva e ovojector, vista lateral. Escala = 100 μ m; **H.** Bolsa copuladora, vista ventral. Escala = 100 μ m; **I.** Bolsa copuladora, vista lateral. Escala = 100 μ m.

***Oswaldocruzia* sp.1 (Figuras 16-18).**

Hospedeiro: *Rhinella schneideri*

Localidade: Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Cisalpina (21°16'25.70"S; 51°54'36.29"O), Brasilândia, Mato Grosso do Sul.

Período de coleta: janeiro de 2017

Geral: Coloração branco-amarelado, dimorfismo sexual bem evidente, machos de aproximadamente $\frac{3}{4}$ do comprimento da fêmea, vesícula cefálica com presença de uma dilatação na parte anterior e estreitamento na parte posterior, algumas vesículas cefálicas são simples, levemente estriada transversalmente. Cristas cuticulares longitudinais paralelas, surgindo imediatamente após a dilatação cefálica e terminando anteriormente a bolsa copuladora nos machos e no fim da cauda anteriormente ao espinho caudal nas fêmeas, algumas aparecendo e desaparecendo ao longo do corpo. Esôfago claviforme, anel nervoso próximo ao meio do esôfago, deirídios em formato triangular (Figura 18A) posterior ao poro excretor.

Sinlofes (Figuras 18B-C): asa cervical lateral visualizada apenas em corte transversal, formada por três cristas de tamanhos diferentes com presença de base quitinoide. Asa cervical transforma-se em cristas simples próximo ao intestino. Cristas na região do esôfago de formato ondulado terminando em um ponta. Na região do meio do corpo as cristas não são proeminentes possuindo um formato ondulado. Nas fêmeas 31 cristas da região do esôfago, no meio do corpo aproximadamente 50 cristas, difíceis de analisar devido o formato ondulado pouco proeminente dessas cristas.

Macho: (Baseado em 24 espécimes). Comprimento 7920 ± 984 (6092-9224). Largura no meio do corpo 169 ± 20 (128-204). Vesícula cefálica comprimento da dilatação anterior 48 ± 11 (38-52), comprimento da dilatação posterior 54 ± 8 (35-66), largura da maior dilatação 53 ± 8 (44-78), largura da menor dilatação cefálica 52 ± 6 (40-61). Anel nervoso 243 ± 29 (206-297), poro excretor 450 ± 39 (374-548) e deirídios a 469 ± 39 (391-518) do ápice. Esôfago claviforme 499 ± 44 (418-603) de comprimento. Bolsa copuladora trilobada (Figuras 16G; 17C; 18H) com duas papilas bursais (Figura 17C), arranjos dos raios correspondendo ao Tipo II com padrão 2-3 que tende a 2-1-2, raios 2 e 3 paralelos em toda a sua extensão, atingindo a borda da bolsa copuladora, raios 4, 5 e 6 com origem comum, raios 4 curtos não atingindo a margem da bolsa copuladora, separados dos raios 5 e 6 da metade em diante, curvando-se cranialmente. Raios 5 e 6 paralelos em toda a sua extensão e atingindo a borda da bolsa copuladora. Raios 6 e 8 com origem independente, raio 8 surgindo perpendicularmente a raiz do raio dorsal e sobrepondo ligeiramente ao raio 6, se distancia no terço final sem atingir a margem da bolsa copuladora. Raios 9 surgem distalmente ao tronco do raio dorsal e se dividem em dois ramos formando os raios 10, cada raio 10 com presença de um ramo extra. Gubernáculo ausente. Cone genital apresentando 23 ± 6 (15-33) de comprimento e 29 ± 4 (22-35) de largura na base, par de papilas 7 inconspícuas. Espículo (Figuras 16D; 18D-E) 175 ± 12 (156-199) de comprimento, dividido em três principais troncos: sapato, lâmina e forquilha (dividida em dois troncos de tamanhos iguais), lâmina apresentando 7 processos distais de comprimento desigual e forquilha dividida no terço posterior.

Fêmea: (Baseado em 26 espécimes). Comprimento 12813 ± 1848 (9612-15853). Largura no meio do corpo 207 ± 23 (163-250). Vesícula cefálica (Figuras 16A; 16B; 16C; 17A; 17B; 18A) comprimento da dilatação anterior 51 ± 10 (43-90), comprimento da dilatação posterior 57 ± 7 (43-73), largura da maior dilatação 59 ± 7 (54-86), largura da menor dilatação 59 ± 2 (56-63). Anel nervoso 262 ± 34 (205-328), poro excretor 505 ± 58 (368-588) e deirídios a 547 ± 67 (368-659) do ápice. Esôfago claviforme 589 ± 42 (525-671) de comprimento. Vulva com lábios conspícuos a 4275 ± 612 (3285-5417) da extremidade caudal. Comprimento da vagina vera 60 ± 10 (47-75). Ovojector (Figuras 16E; 18G) dividido em vestíbulo 370 ± 54 (271-481) de comprimento, esfíncter anterior e posterior 57 ± 11 (39-83) e 57 ± 8 (39-70) de comprimento respectivamente; e infundíbulo anterior e posterior 29 ± 6 (18-39) e 28 ± 5 (19-35) de comprimento respectivamente. Comprimento da cauda 191 ± 26 (150-256) e largura ao nível do ânus 77 ± 8 (64-92), terminando em um espinho caudal. Anfidelfa, ovos em mórula no útero 75 ± 6 (59-83) x 51 ± 11 (38-55).

Comentários:

Seis espécies pertencentes ao grupo Continental Neotropical se assemelham com *Oswaldocruzia* sp.1: *Oswaldocruzia benslimanei*; *Oswaldocruzia burseyi*; *Oswaldocruzia dlouhyi*; *Oswaldocruzia fredii*; *Oswaldocruzia manuensis* Guerrero, 2013 e *Oswaldocruzia proencai*, por possuírem dilatação cefálica constituída de duas partes e bolsa copuladora do Tipo II.

Oswaldocruzia dlouhyi se diferencia de nossa espécie pela dilatação cervical formada de uma crista única sem base quitinoide em cada asa ao invés de três cristas com base quitinoide em *Oswaldocruzia* sp.1, cristas cuticulares ao longo do corpo com formato triangular, espículos maiores (225 vs. 156-199) com forquilhas de tamanho desigual e os raios 4 da bolsa copuladora serem maiores que os raios 5.

Oswaldocruzia manuensis parasita de anfíbios, difere de *Oswaldocruzia* sp.1 por possuir uma vesícula cefálica com suave dilatação na parte anterior, uma dilatação cervical composta por apenas uma crista sem base quitinoide em cada asa e espículos com forquilha de tamanho desigual.

Oswaldocruzia proencai difere de *Oswaldocruzia* sp.1 por possuir uma vesícula cefálica com presença de uma dilatação na parte anterior muito pronunciada e conspícua divisão entre a parte anterior e posterior da dilatação. A dilatação cervical não apresenta base quitinoide e possui um menor tamanho quando vista em corte transversal comparada com *Oswaldocruzia* sp.1, suas cristas cuticulares são triangulares na região do meio do corpo, diferenciando das cristas onduladas de *Oswaldocruzia* sp.1. Os espículos de *O. proencai* são maiores (224-264 vs. 156-199 μm).

Oswaldocruzia benslimanej, *O. bursey* e *O. fredí* parasitas de *Enyalius* spp. (Iguanidae) do Brasil, possuem em comum com *Oswaldocruzia* sp.1 cristas cuticulares onduladas no meio do corpo. Eles se diferenciam por apresentar uma dilatação cervical bem conspícua visualizadas sem a necessidade de corte transversal. Em corte transversal cada asa é formada por apenas uma crista cuticular sem base quitinoide. Os espículos das três espécies possuem

comprimento maior que 200 μm enquanto que *Oswaldocruzia* sp.1 seus espículos não ultrapassam esse valor.

Por *Oswaldocruzia* sp.1 apresentar espículos menores, dilatação cervical composta por três raios, sinlofes na região do esôfago e meio do corpo diferenciados do grupo Continental Neotropical, sugerimos que esta possa ser uma nova espécie para o gênero.

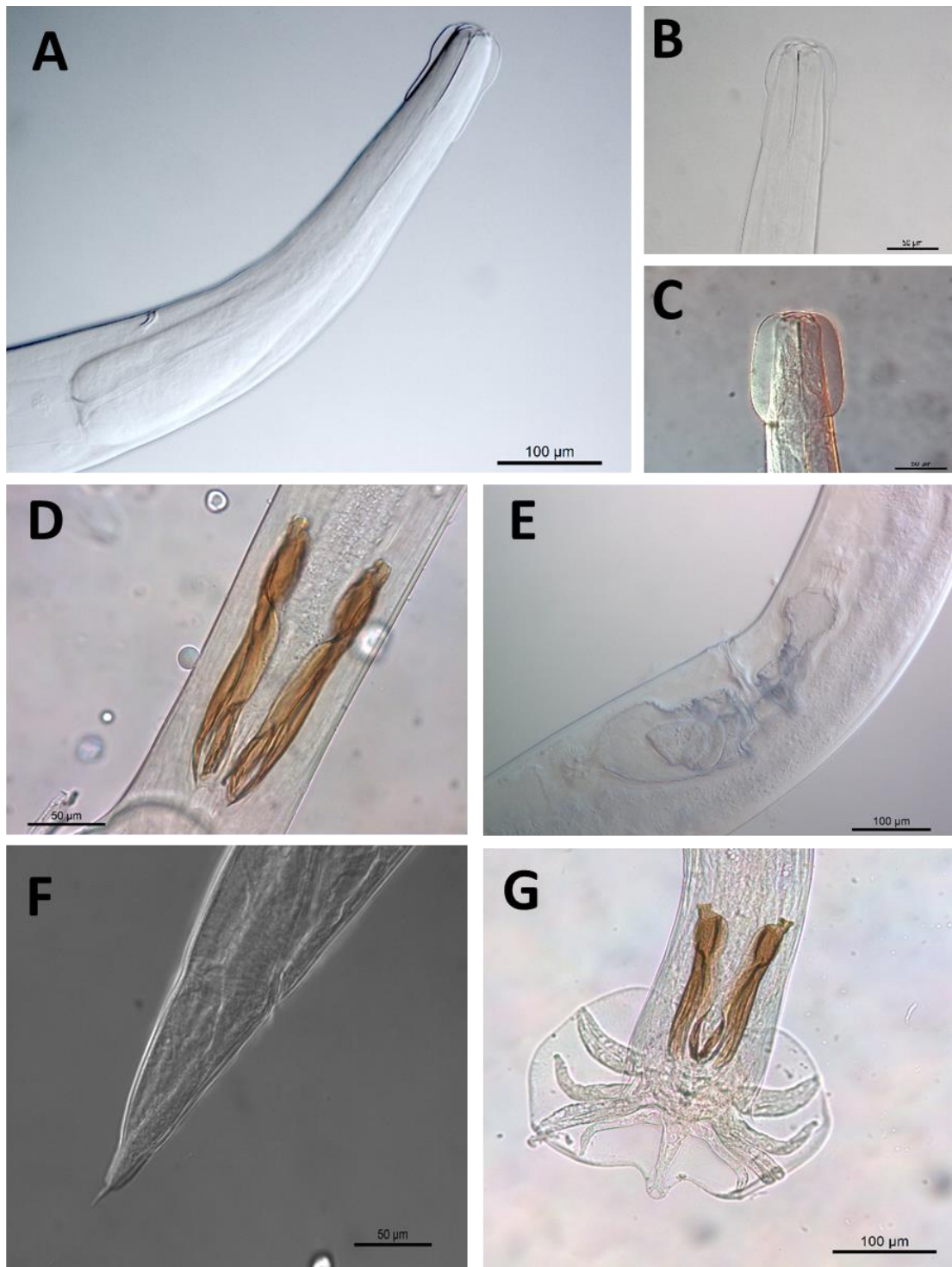


Figura 16. *Oswaldocruzia* sp.1. **A.** Extremidade anterior, vista lateral esquerda; **B.** Dilatação cefálica dupla; **C.** Dilatação cefálica simples; **D.** Espículos, vista ventral; **E.** Fêmea, ovojector, vista lateral esquerda; **F.** Fêmea, cauda, vista lateral direita; **G.** bolsa copuladora, vista ventral.

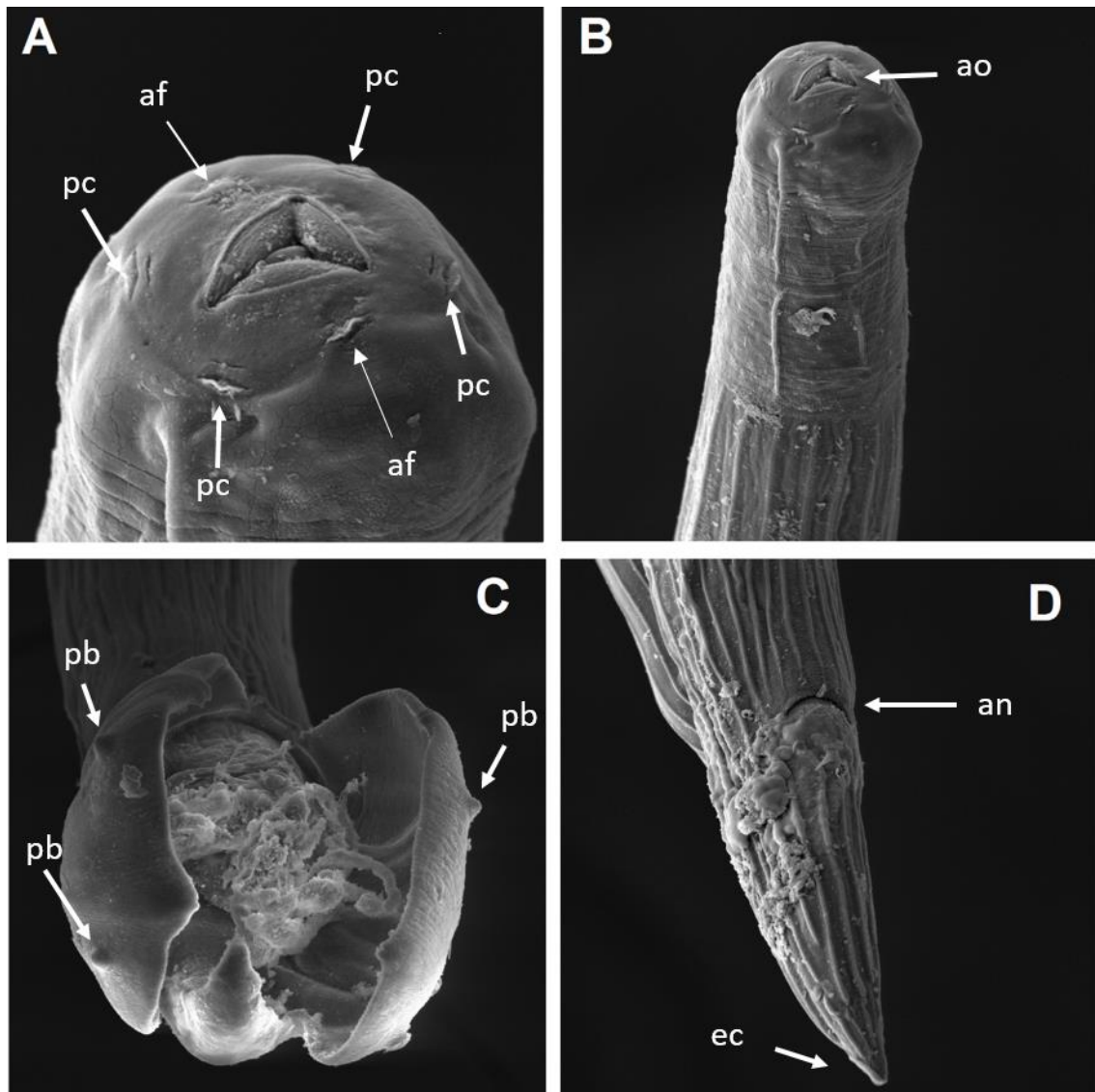


Figura 17. *Oswaldocruzia* sp.1, microscopia eletrônica de varredura **A.** Vista da extremidade anterior mostrando abertura oral e papilas cefálicas; **B.** Vista da região anterior mostrando a dilatação cefálica; **C.** Visão ventral da região posterior do macho, mostrando as duas papilas bursais em cada uma das laterais da bolsa copuladora e o raio dorsal; **D.** Vista ventral da extremidade posterior da fêmea mostrando o ânus, os padrões das cristas cuticulares e espinho caudal cobrado cranialmente. Abreviações: ao - abertura oral; af - anfídeo; an - ânus; ec – espinho caudal; pb - papila bursal; pc – papila cefálica.

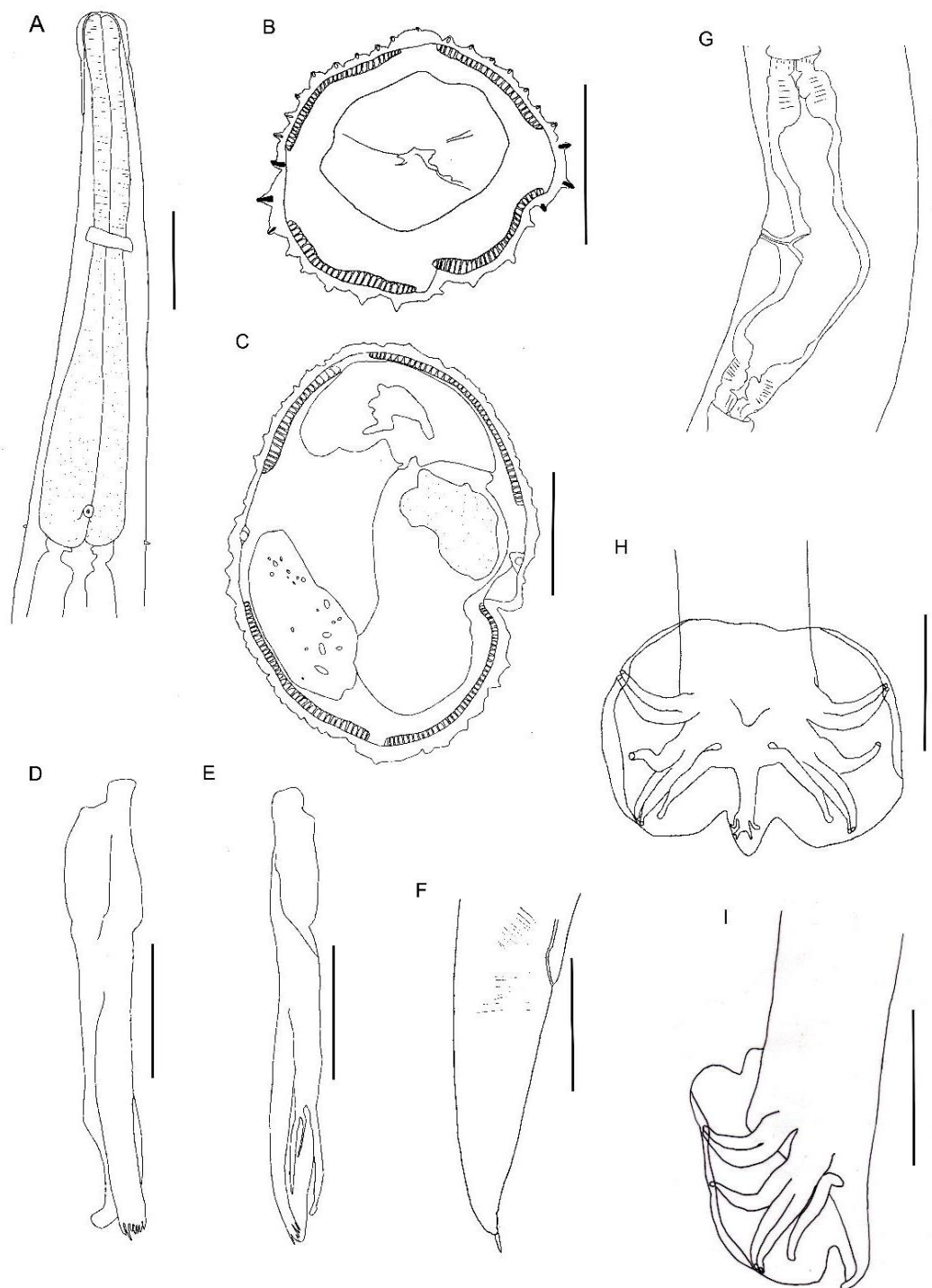


Figura 18. *Oswaldocruzia* sp.1. **A.** Parte anterior do corpo, fêmea, vista ventral. Escala = 100 μ m; **B.** Sinlofe na região do esôfago, fêmea. Escala = 50 μ m; **C.** Sinlofe no meio do corpo, fêmea. Escala = 50; **D.** Espículo, vista externo dorsal. Escala = 50 μ m; **E.** Espículo, vista lateral. Escala = 50 μ m; **F.** Cauda, vista lateral. Escala = 100 μ m; **G.** Vulva e ovojector, vista lateral. Escala = 100 μ m; **H.** Bolsa copuladora, vista ventral. Escala = 100 μ m; **I.** Bolsa copuladora, vista lateral. Escala = 100 μ m.

***Oswaldocruzia* sp.2 (Figuras 19 - 21).**

Hospedeiros: *Rhinella jimi* e *Rhinella granulosa*.

Localidade: Campus Universitário Senador Helvídio Nunes de Barros (7°4'29,6''S; 41°29'44,5''W), Picos, Piauí.

Período de coleta: julho de 2015 a junho de 2016.

Geral: Coloração branco-amarelado, dimorfismo sexual bem evidente, machos de aproximadamente $\frac{3}{4}$ do comprimento da fêmea, vesícula cefálica com presença de uma dilatação na parte anterior e estreitamento na parte posterior. Esôfago claviforme com ligeira contração ao nível no anel nervoso, anel nervoso próximo ao meio do esôfago, deirídios em formato triangular posterior ao poro excretor (Figura 21A).

Sinlofes (Figuras 21B-C): asa cervical lateral visualizada apenas em corte transversal, formada por três cristas de tamanhos diferentes com presença de base quitinoide orientadas ventralmente. Asa cervical transforma-se em cristas simples próximo ao intestino. Cristas na região do esôfago de formato ondulado terminando em uma ponta. Na região do meio do corpo as cristas possuem um formato triangular pequeno orientadas perpendicularmente com presença de estruturas fracamente visíveis. Nos machos aproximadamente 28 cristas da região do esôfago e no meio do corpo 34 cristas.

Macho: (Baseado em 16 espécimes). Comprimento 5897 ± 826 (4406-7473). Largura no meio do corpo 140 ± 26 (102-186). Vesícula cefálica comprimento da dilatação anterior 38 ± 3 (32-43), comprimento da dilatação posterior 43 ± 5 (30-51), largura da maior dilatação 41 ± 5 (32-47), largura da menor dilatação cefálica 41 ± 4 (33-49). Anel nervoso 197 ± 37 (155-225), poro excretor 375 ± 42 (304-

437) e deirídios a 407 ± 53 (332-481) do ápice. Esôfago claviforme 481 ± 35 (430-540) de comprimento. Bolsa copuladora trilobada (Figuras 19D; 20C; 21H) com duas papilas bursais (Figura 20C), arranjos dos raios correspondendo ao Tipo III com padrão 2-3 que tende a 2-1-2, raios 2 e 3 paralelos em toda a sua extensão, atingindo a borda da bolsa copuladora, raios 4, 5 e 6 com origem comum, raio 4 curtos não atingindo a margem da bolsa copuladora, separados dos raios 5 e 6 separados da metade em diante, curvando-se cranialmente. Raios 5 e 6 paralelos em toda a sua extensão e atingindo a borda da bolsa copuladora. Raios 6 e 8 com origem comum, raio 8 surgindo perpendicularmente a raiz do raio dorsal e percorrendo paralelamente ao raio 6, se distancia no terço final sem atingir a margem da bolsa copuladora. Raios 9 surgem distalmente ao tronco do raio dorsal e se dividem em dois ramos formando os raios 10, cada raio 10 com presença de um ramo extra. Gubernáculo ausente. Cone genital apresentando 22 ± 7 (12-34) de comprimento e 28 ± 7 (19-39) de largura na base, par de papilas 7 conspícuas. Espículo (Figuras 19B; 21D; 21E) 170 ± 8 (151-187) de comprimento, dividido em três principais troncos: sapato, lâmina e forquilha (dividida em dois troncos de tamanhos iguais), lâmina apresentando 5 processos distais de comprimento desigual e forquilha dividida no terço posterior ocupando cerca de 23% do comprimento do espículo.

Fêmea: (Baseado em 11 espécimes). Comprimento 10.220 ± 1541 (8.621-12.963). Largura no meio do corpo 179 ± 25 (140-234). Vesícula cefálica (Figuras 19A; 20B; 21A) comprimento da dilatação anterior 38 ± 5 (33-46), comprimento da dilatação posterior 43 ± 6 (33-56), largura da maior dilatação 42 ± 6 (34-54), largura da menor dilatação 42 ± 5 (35-52). Anel nervoso 233 ± 7 (227-240), poro

excretor 387 ± 42 (332-495) e deirídios a 417 ± 42 (373-522) do ápice. Esôfago claviforme 520 ± 59 (465-640) de comprimento. Vulva com lábios conspícuos a 3610 ± 501 (2718-4303) da extremidade caudal. Comprimento da vagina vera 52 ± 8 (38-58). Ovojector (Figuras 19E; 21G) dividido em vestíbulo 350 ± 63 (294-490) de comprimento, esfíncter anterior e posterior 45 ± 9 (30-55) e 44 ± 9 (29-54) de comprimento respectivamente; e infundíbulo anterior e posterior 29 ± 8 (18-39) e 28 ± 6 (20-33) de comprimento respectivamente. Comprimento da cauda 153 ± 29 (118-203) e largura ao nível do ânus 65 ± 12 (51-87), terminando em um espinho caudal com 17 ± 3 (14-20). Fasmídeo circular com bordas proeminentes. Anfidelfa, ovos em mórula no útero 77 ± 6 (62-92) x 49 ± 5 (39-59).

Comentários:

Duas espécies do grupo Continental Neotropical parasitas de anfíbios possuem dilatação cefálica constituída de duas partes e bolsa copuladora do Tipo III: *O. chambrieri* e *O. subauricularis*.

Oswaldocruzia chambrieri se diferencia principalmente pelo raio 8 surgir em um tronco comum com dos raios 4, 5 e 6, por possuir presença de um ramo acessório no braço do sapato no espículo, não ter base quitinoide ou dilatação cervical e possuir uma vesícula cefálica simples. Em uma redescrição de *O. chambrieri* feita por Willkens *et al.* (2016), o padrão da bolsa copuladora não corrobora com a descrição original pelo raio 8 nascer separado do tronco dos raios 4, 5 e 6, o sapato do espículo não possuir um ramo acessório e a vesícula cefálica ser constituída de duas partes ao contrário de uma vesícula cefálica

simples, este último caractere é ressaltado novamente como pertencente a *O. chambrieri* por Bem Slimane e Durette-Desset (1995).

Oswaldocruzia subauricularis também apresenta dilatação cervical visualizada apenas em corte transversal e presença de base quitinoide, no entanto difere de *Oswaldocruzia* sp.2 por possuir espículos maiores (190-205 vs. 150-182) e maior do comprimento do corpo (14.450-18.000 vs. 8.621-12.963). As bases quitinoides estão presentes em todo o corpo de *O. subauricularis*, porém na região do esôfago de *Oswaldocruzia* sp.2 só há presença de base quitinoide na dilatação cervical e nas cristas próximas a ela, assim como o formato ondulado terminando em um ponta divergindo do formato pontiagudo de *O. subauricularis*.

A análise morfológica também sugere que *Oswaldocruzia* sp.2 represente também uma nova espécie para a ciência.

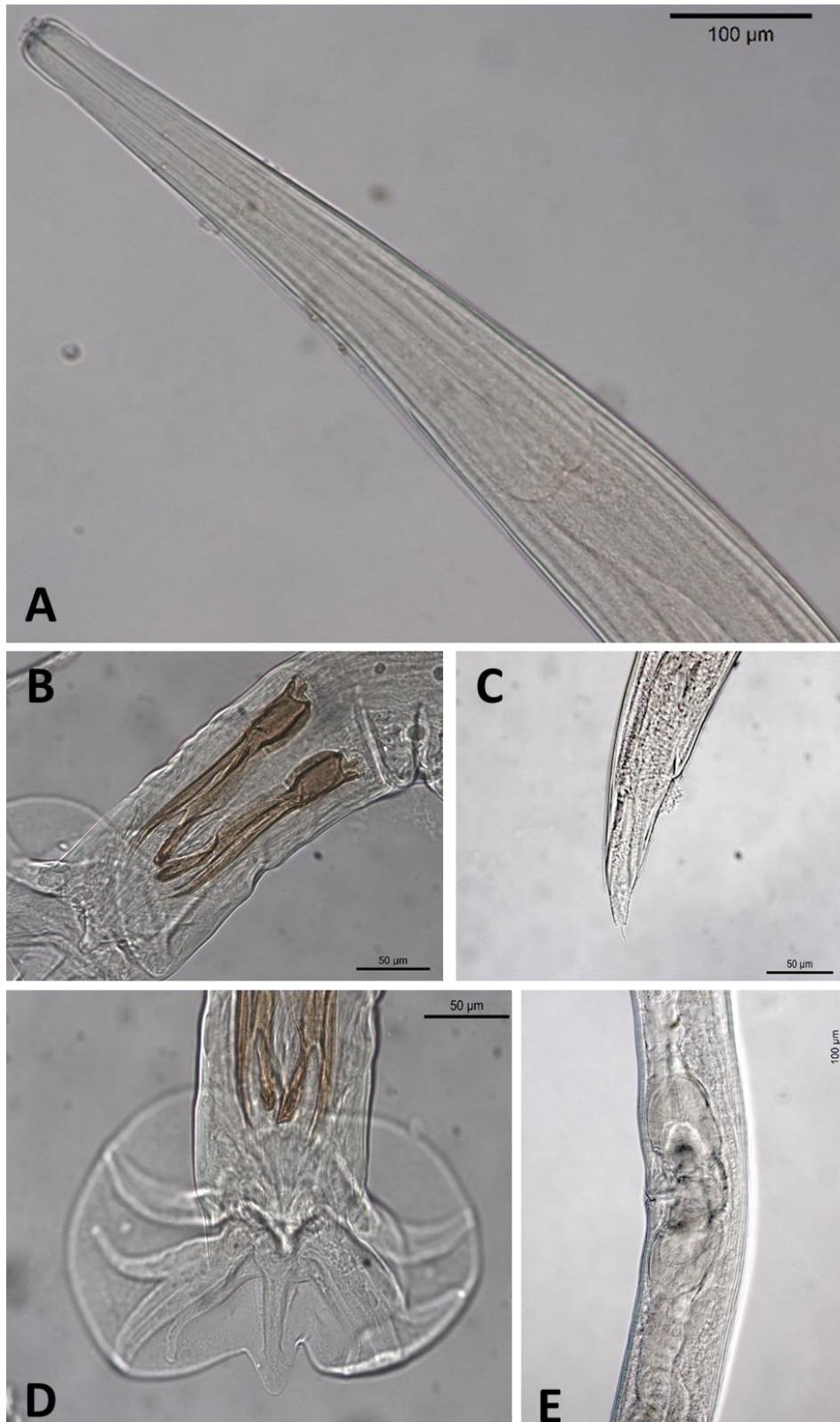


Figura 19. *Oswaldocruzia* sp.2 **A.** Extremidade anterior, vista ventral; **B.** Espículos, vista ventral; **C.** Fêmea, cauda, vista lateral direita; **D.** Macho, bolsa copuladora, vista ventral; **E.** Fêmea, ovojector, vista lateral esquerda.

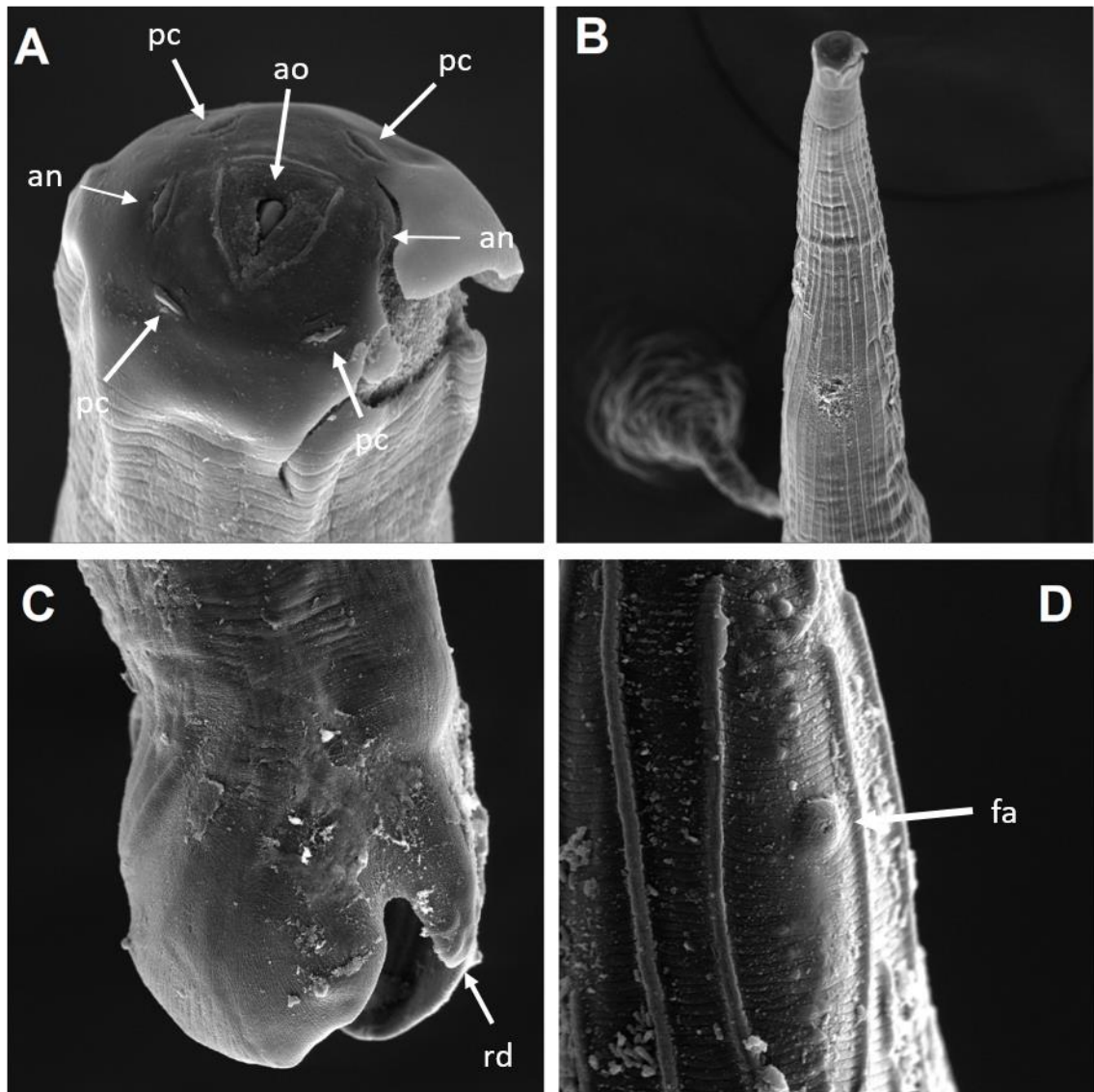


Figura 20. *Oswaldocruzia* sp.2, microscopia eletrônica de varredura **A.** Vista da extremidade anterior mostrando abertura oral e papilas cefálicas; **B.** Vista da região anterior mostrando a dilatação e padrões das cristas cuticulares; **C.** Visão dorsal da região posterior do macho, mostrando as duas papilas bursais suportados pela bolsa copuladora e o raio dorsal; **D.** Vista lateral do corpo da fêmea mostrando o fasmídeo. Abreviações: ao – abertura oral; an – anfídeo; fa – fasmídeo; pc – papila cefálica; rd – raio dorsal.

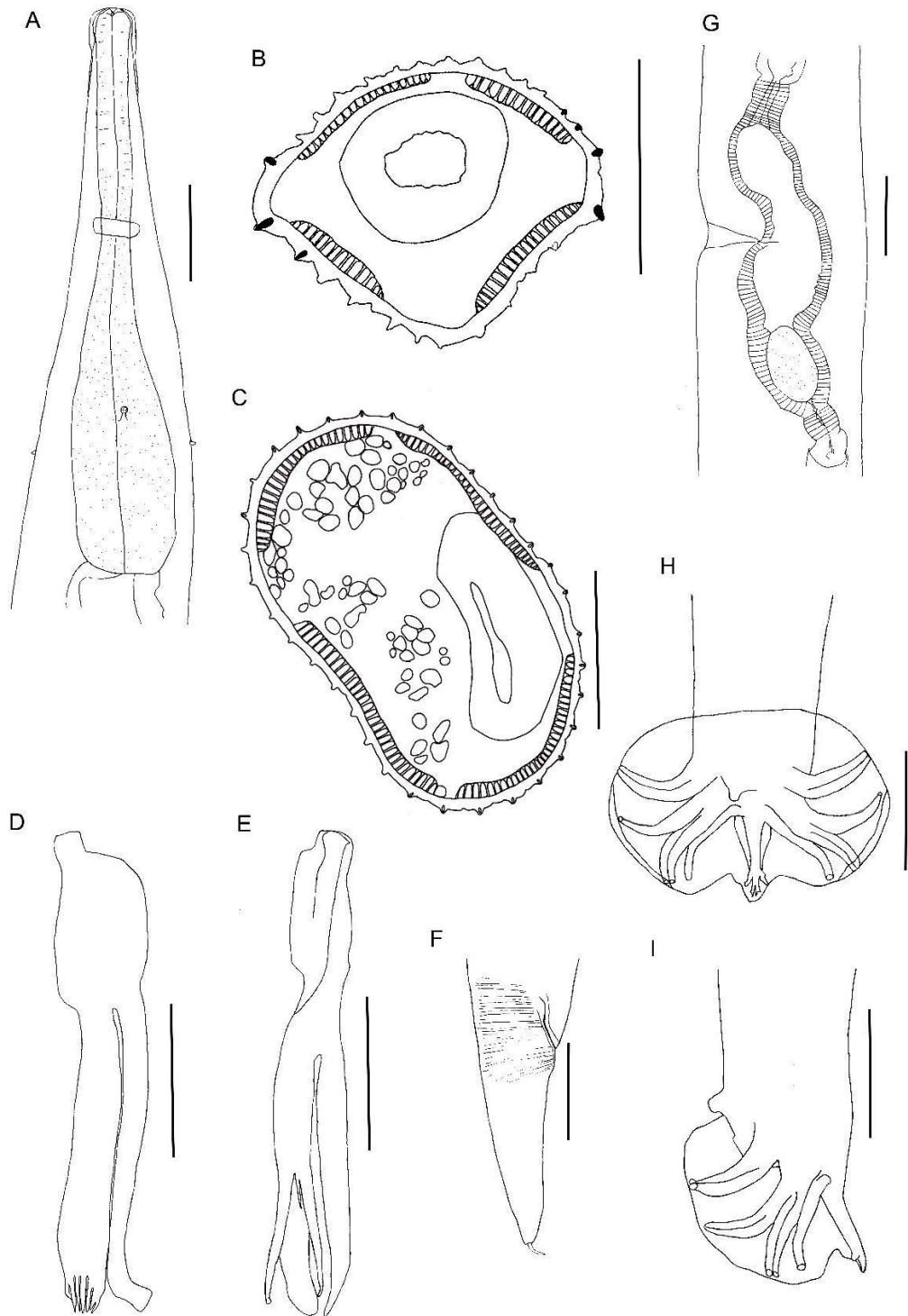


Figura 21. *Oswaldocruzia* sp.2. **A.** Parte anterior do corpo, fêmea, vista ventral. Escala = 100 μ m; **B.** Sinlofe na região do esôfago, macho. Escala = 50 μ m; **C.** Sinlofe no meio do corpo, macho. Escala = 50; **D.** Espículo, vista externo dorsal. Escala = 50 μ m; **E.** Espículo, vista lateral. Escala = 50 μ m; **F.** Cauda, vista lateral. Escala = 100 μ m; **G.** Vulva e ovojector, vista lateral. Escala = 100 μ m; **H.** Bolsa copuladora, vista ventral. Escala = 100 μ m; **I.** Bolsa copuladora, vista lateral. Escala = 100 μ m.

Tabela 2. Comparação da morfometria das estruturas e morfologia da bolsa copuladora dos machos de *Oswaldocruzia* spp. provenientes das três regiões do estudo. Medidas expressas em micrômetros.

	<i>Oswaldocruzia proencai</i>	<i>Oswaldocruzia sp.1</i>	<i>Oswaldocruzia sp.2</i>
Comprimento	4.367-10.246	6.092-9.224	4.406-7.473
Largura no meio do corpo	99-259	128-204	102-186
Vesícula cefálica comprimento da dilatação anterior	35-57	38-52	32-43
Vesícula cefálica comprimento da dilatação posterior	39-61	35-66	30-51
Vesícula cefálica largura da maior dilatação	53-68	44-78	32-47
Vesícula cefálica largura da menor dilatação cefálica	49-59	40-61	33-49
Anel nervoso	224-288	206-297	155-225
Poros excretor	360-491	374-548	304-437
Deirídios	388-550	391-518	332-481
Esôfago claviforme	437-638	418-603	430-540
Espículo	224-264	156-199	150-182
Nº de processos distais da lâmina do espículo	9	7	7
Padrão de bolsa copuladora	Tipo II	Tipo II	Tipo III

Tabela 3. Comparação da morfometria das fêmeas de *Oswaldocruzia* spp. provenientes das três regiões do estudo. Medidas expressas em micrômetros.

	<i>Oswaldocruzia proencai</i>	<i>Oswaldocruzia sp.1</i>	<i>Oswaldocruzia sp.2</i>
Comprimento	12.701-19.937	9.612-15.853	8.621-12.963
Largura no meio do corpo	219-320	163-250	140-234
Vesícula cefálica comprimento da dilatação anterior	45-50	43-90	33-46
Vesícula cefálica comprimento da dilatação posterior	46-72	43-73	33-56
Vesícula cefálica largura da maior dilatação	62-76	54-86	34-54
Vesícula cefálica largura da menor dilatação cefálica	51-66	56-63	35-52
Anel nervoso	262-332	205-328	227-240
Poros excretor	413-594	368-588	332-495
Deirídios	463-644	368-659	373-522
Esôfago claviforme	582-862	525-671	465-640
Vulva até a extremidade caudal	4.563-7.639	3.285-5.417	2.718-4.303
Vagina vera	40-76	47-75	38-58
Vestíbulo	438-718	271-481	293-490
Esfíncteres anteriores	57-110	39-83	30-55
Esfíncteres posterior	48-108	39-70	29-54
Infundíbulo anterior	32-48	18-39	18-39
Infundíbulo posterior	31-48	19-35	20-33
Cauda	200-270	150-256	118-203
Largura ao nível do ânus	88-112	64-92	51-87
Comprimento dos ovos	55-112	59-83	62-92
Largura dos ovos	32-76	38-55	39-59

6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia proposta e as amostras analisadas pudemos realizar a redescrição de *Oswaldocruzia proencai* parasitando *Rhinella schneideri* e *Rhinella icterica* em Botucatu, São Paulo, assim como o registro de duas possíveis novas espécies para a região Neotropical, uma parasitando *Rhinella schneideri* em Brasilândia, Mato Grosso do Sul e outra em *Rhinella jimi* e *Rhinella granulosa* em Picos, Piauí.

O estudo reforçou a dificuldade na identificação taxonômica das espécies *Oswaldocruzia* dada a homogenia das espécies.

7 REFERÊNCIAS

Allison VF, Ubelaker JE, Webster Jr, Riddle JM. Preparation of Helminths for Scanning Electron Microscopy. *Journal of Parasitology*. 1972; 58(2): 414-416.

Amato JFR, Boeger WA, Amato SB. Protocolos para laboratório: Coleta e processamento de parasitos de pescado. Imprensa Universitária. Protocolos para Laboratório Coleta e Processamento de Parasitos de Pescado, Imprensa Universitária, 1991.

Ben Slimane B, Durette-Desset MC. *Oswaldocruzia* (Nematoda, Trichostrongylina, Molineoidea) parasites d'Amphibiens du Bresil et de l'Equateur, avec redefinition de l'espece-type *O. subauricularis* (Rudolphi, 1819) et d' *O. mazzai* Travassos, 1935. *Revue Suisse de Zoologie*. 1995; 102(3):635-653.

Ben Slimane B, Chabaud AG, Durette-Desset MC. Les nematodes Trichostrongylina parasites d'amphibiens et de reptiles: problemes

taxonomiques, phylétiques et biogéographiques. *Systematic Parasitology*. 1996; 35:179–206.

Burseley CR, Goldberg SR. New species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Molineoidea), new species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae), and other helminthes in *Rhana* cf. *forreri* (Anura: Ranidae) from Costa Rica. *Journal of Parasitology*. 2005; 91(3):600-605.

Burseley CR, Goldberg SR. New species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Molineoidea) and other helminthes in *Bolitoglossa subpalmata* (Caudata: Plethodontidae) from Costa Rica. *Journal of Parasitology*. 2011; 97(2):286-292.

Durette-Desset MC. Les systems d'arêtes cuticulaires chez les Nématodes Héligmosomes parasites de Muridés australiens. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 1969; 44:733-747.

Durette-Desset MC. Essai de classification des Nématodes Héligmosomes. Corrélation avec la paléobiogéographie des hôtes. *Mémoires du Muséum National d' Histoire Naturelle (Ser. A. Zoologie)*. 1971; 49:1-126.

Durette-Desset MC. Trichostrongyloid nematodes in their vertebrate hosts: Reconstruction of the phylogeny of a parasitic group. *Advances in parasitology*. 1985; 24(1):239-306.

Durette-Desset MC, Alves DAL, Vrcibradic D. Three new species of the genus *Oswaldocruzia* Travassos, 1917. *Parasite*. 2006;13:115-125.

Guerrero R. Two new species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Trichostrongylina: Molineoidea) parasites of the cane toad *Rhinella marina* (Amphibia: Anura) from Peru. *Acta Parasitologica*. 2013; 58(1):30-38.

- Lent H, Freitas JF, Proença MC. Alguns helmintos de batráquios colecionados no Paraguai. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1946; 44(1):195-214.
- Michalany J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Ed. Pedagógica Universitária Ltda; 1980. 227p.
- Santos JN, Giese EG, Maldonado JrA, Lanfredi RM. A new species of *Oswaldocruzia* (Molineidae: Nematoda) in *Chaunus marinus* (Amphibian: Bufonidae) (Linneaus, 1758) from Brazil. Journal of Parasitology. 2008; 94(1):264-268.
- Svitin R, Kuzmin Y. *Oswaldocruzia duboisi* (Nematoda, Molineidae): morphology, hosts and distribution in Ukraine. Vestnik Zoologii. 2012; 46(3) e-1-e-9.
- Willkens Y, Maldonado A, Santos JN, Maschio GF, Vasconcelos Melo FT. Redescription of *Oswaldocruzia chambrieri* (Strongylida: Molineidae) from *Rhinella margaritifera* (Anura: Bufonidae) in Caxiuanã National Forest, Brazil. Acta Parasitologica. 2016; 61(3):567-575.