

YURI WILLKENS DE OLIVEIRA COSTA

REDESCRIBÇÃO DE *Oswaldocruzia chambrieri* (STRONGYLIDA,
MOLINEIDAE) DE *Rhinella margaritifera* (ANURA, BUFONIDAE) NA
FLORESTA NACIONAL DE CAXIUANÃ, BRASIL

BELÉM

2016

YURI WILLKENS DE OLIVEIRA COSTA

REDESCRIBÇÃO DE *Oswaldocruzia chambrieri* (STRONGYLIDA,
MOLINEIDAE) DE *Rhinella margaritifera* (ANURA, BUFONIDAE) NA
FLORESTA NACIONAL DE CAXIUANÃ, BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Tiago de Vasconcelos Melo, Departamento de Parasitologia - UFPA

BELÉM

2016

YURI WILLKENS DE OLIVEIRA COSTA

REDESCRIÇÃO DE *Oswaldocruzia chambrieri* (STRONGYLIDA,
MOLINEIDAE) DE *Rhinella margaritifera* (ANURA, BUFONIDAE) NA
FLORESTA NACIONAL DE CAXIUANÃ, BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas, modalidade Biologia da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do
grau de Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Tiago de Vasconcelos Melo

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Avaliador: Prof.^a Dra. Roberta Melo Valente

Instituto de Ciências Biológicas- UFPA

Avaliador: Prof.^a Dra. Rita de Cassia Oliveira dos Santos

Instituto de Ciências Biológicas- UFPA

BELÉM

2016

“Cada um de nós é, na perspectiva cósmica, precioso. Se um ser humano discorda de você, deixe-o viver. Em cem bilhões de galáxias, você não vai encontrar outro.”

Carl Sagan

Dedico a minha família, amigos, professores e a todos que contribuíram para a realização desta etapa da minha vida.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais Wilquen e Elisângela pelo apoio ao meu desejo de seguir vida acadêmica e por terem me dado todas as oportunidades de estudar e aprender a “caminhar com minhas próprias pernas” rumo aos meus objetivos. Muito obrigado por todo seu carinho e amor, vocês sempre serão meus maiores exemplos na vida e com certeza minhas maiores fontes de inspiração. Também agradeço à minha irmã, Yasmim, por sempre ter sido uma ótima parceira, amiga e conselheira apesar de nossas inúmeras brigas cotidianas, estarei sempre torcendo por teu sucesso e sempre disponível para te ajudar a seguir teus sonhos.

A minha família por todo seu apoio e carinho. Aos meus tios e tias pelas ajudas nos momentos de dificuldade, pelo incentivo aos estudos e as festas de famílias. Aos meus primos e primas pelo companheirismo, pelas melhores histórias e por estarem presentes nos momentos mais importantes. Aos meus avós, Agostinho e Edinea e principalmente aos finados José e Noêmia pelas lições de vida e por todo o carinho enquanto vivos.

Ao Prof. Dr. Gleomar Fabiano Maschio, meu primeiro orientador de iniciação científica e acima de tudo um grande amigo. Gostaria de agradecer pela paciência de me orientar e aturar minhas gafes enquanto eu ainda estava “verde”, e principalmente pelas oportunidades de adquirir experiência em campo e em laboratório e também pela minha primeira viagem a congresso. Sua orientação foi fundamental para minha motivação, paixão e determinação em seguir uma carreira científica.

Ao Prof. Dr. Francisco Tiago de Vasconcelos Melo, meu atual orientador. Muito obrigado pela sua inestimável amizade, pelas ajudas nos momentos de “sufoco” e pela oportunidade de participar efetivamente de um grupo de pesquisa e pela minha primeira publicação científica. É uma honra ter sido um dos teus primeiros orientandos após tua contratação e acredito que essa troca de experiências foi fundamental para nosso aprimoramento pessoal e profissional. Sou grato pela motivação, pelas dicas, ensinamentos, “puxões de orelha” e pelo grande exemplo de amor ao trabalho.

A Prof.^a Dra. Jeannie Nascimento dos Santos, uma verdadeira “mãe de laboratório”. Muito obrigado pelo seu carinho, pelo auxílio nos desenhos e pelas críticas, sugestões e comentários no trabalho como um todo. Também agradeço por ter sido minha primeira orientadora de estágio rotatório e pela experiência e conhecimentos que me foram repassados. Ao Prof. Dr. Adriano Penha Furtado, pelos momentos de descontração na “salinha” dos alunos e por sua presença cativante no Laboratório de Biologia Celular e Helminologia.

Aos colaboradores Dr^a Elane Giese, Dr. Arnaldo Maldonado Jr. e ao Dr. Yuriy Kuzmin que colaboraram com a realização deste trabalho em diversas etapas. Aos meus companheiros de laboratório Allan, Lucas, Ana Nunes, Caroline Melo, Carolina Maia, Felipe, Lariza, Aliane, Yéssica, Paulo André, Emanuelle, Marlon, Thais, Cecília, Soraya, Yago, Camila, Bianca, Helrik, Jurupytan, Tássia e especialmente a Lilian Macedo “Lila”. Aos amigos de campo Heriberto, Cássia e Kleyton. Aos amigos de curso Raissa, Brenda, Marília, Lorena, Caio, Manuela, Layse Mitsue “Sushi”, Lais e todos os amigos e professores que conheci durante a graduação por todas as experiências e bons momentos que vivemos.

A todos, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	2
RESULTADOS	3
DISCUSSÃO.....	5
AGRADECIMENTOS	7
REFERÊNCIAS	7

RESUMO

Oswaldocruzia chambrieri Ben Slimane et Durette-Desset, 1993 é redescrito com base em espécimes coletados do intestino delgado de *Rhinella margaritifera*, da Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil, através de microscopia de luz e de varredura e análise molecular da sequência codificante Citocromo Oxidase I (COI) do DNA. Os nematódeos analisados são caracterizados por uma bolsa copuladora do tipo III com duas papilas, raios 4 com um sulco mediano, e espículos divididos em lâmina, calçadeira e garfo. Aletas cefálicas ausentes, vesícula cefálica dividida em duas porções, e a sinlofe possui pequenas cristas sem suporte quitinoso. O presente estudo estabelece a Floresta Nacional de Caxiuanã como uma nova localidade para *O. chambrieri*, o qual já foi previamente reportado parasitando *R. margaritifera* no Equador, utiliza microscopia de luz e eletrônica de varredura para identificar novos caracteres morfológicos da espécie e representa a segunda sequência molecular depositada para o gênero *Oswaldocruzia*.

Palavras-chave: Nematódeos, Trichostrongyloidea, novos dados morfológicos, Amazônia brasileira

ABSTRACT

Oswaldocruzia chambrieri Ben Slimane et Durette-Desset, 1993 is redescribed from specimens collected from the small intestine of the South American common toad, *Rhinella margaritifera*, from Caxiuanã National Forest in Pará, Brazil, using light and scanning microscopy and molecular analysis of Cytochrome Oxidase I (COI) - coding regions of DNA. The discovered nematodes are characterized by a type III caudal bursa with two papillae, rays 4 with a median groove, and spicules divided into a blade, a shoe and a fork. Cervical alae are absent, the cephalic vesicle is divided into two portions, and the synlophe has low ridges without chitinous supports. The present study establishes the Caxiuanã National Forest as a new location for *O. chambrieri*, which had previously been reported as a parasite of *R. margaritifera* in Ecuador, uses light microscopy and scanning electron microscopy (SEM) to identify new morphological characters of the species and represents the second molecular sequence deposited for the *Oswaldocruzia* genus.

Keywords: Nematodes, Trichostrongyloidea, new morfological data, Brazilian Amazon

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ARTIGO

**REDESCRIÇÃO DE *Oswaldocruzia chambrieri* (STRONGYLIDA,
MOLINEIDAE) DE *Rhinella margaritifera* (ANURA, BUFONIDAE) NA
FLORESTA NACIONAL DE CAXIUANÃ, BRASIL**

Autores: Yuri Willkens de Oliveira Costa, Arnaldo Maldonado Júnior, Jeannie Nascimento dos Santos, Gleomar Fabiano Maschio, Francisco Tiago de Vasconcelos Melo*

Revista: Acta Parasitologica (ANEXO 1)

ISSN: 1230-2821 (electronic version)

Status: Publicado (ANEXO 2)

Redescrição de *Oswaldocruzia chambrieri* (Strongylida, Molineidae) de *Rhinella margaritifera* (Anura, Bufonidae) na Floresta Nacional de Caxiuanã, Brasil

Yuri Willkens¹, Arnaldo Maldonado Jr.², Jeannie Nascimento dos Santos¹, Francisco Tiago de Vasconcelos Melo^{1*}

¹Laboratório de Biologia Celular e Helmintologia “Profa. Dra. Reinalda Marisa Lanfredi” – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

²Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz - Pavilhão Arthur Neiva

* **Autor correspondente:** Francisco Tiago de Vasconcelos Melo, Laboratório de Biologia Celular e Helmintologia “Profa. Dra. Reinalda Marisa Lanfredi” – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, A. Augusto Correa n 1, Guamá, CEP 66075-110. Fone: +55 91 32017890/ Fax: +55 91 32017601/E-mail: ftiago@ufpa.br

INTRODUÇÃO

Rhinella margaritifera (Laurenti 1768) é um grupo complexo representado por 16 espécies formalmente reconhecidas, das quais 13 ocorrem na bacia amazônica. Estas espécies são representadas por membros de várias comunidades de anuros neotropicais de tamanho médio, que habitam a serapilheira de florestas tropicais úmidas (Lavilla et al. 2013; Moravec, et al. 2014).

Estas espécies apresentam distribuição Neotropical, sendo encontradas particularmente na região norte da América do Sul (Venezuela, Colômbia, Equador, Bolívia, Peru, Brasil, Suriname, Guiana e Guiana Francesa) e na América Central (Panamá). A coloração críptica destes sapos lembra o padrão de folhas caídas e de matéria parcialmente decomposta no solo, produzindo um efeito de camuflagem que é multiplicado pelo contorno do corpo, a presença de saliências cranianas e cristas das vértebras de certas espécies (Dos Santos et al. 2015; Lavilla et al. 2013).

O gênero *Oswaldocruzia* Travassos, 1917 tem uma distribuição mundial e inclui aproximadamente 88 espécies (Svitin and Kuzmin, 2012). Atualmente, 41 são conhecidas na

região Neotropical, das quais 14 têm sido reportadas em anfíbios da América do Sul; e apenas oito foram descritas parasitando anfíbios e répteis no Brasil (Guerrero, 2013; Campião et al. 2014).

Durantes estudos do gênero *Oswaldocruzia*, nós examinamos espécimes coletados de *R. margaritifera* da Floresta Nacional de Caxiuanã Pará, Brasil. Baseados em nossas análises, nós identificamos estes espécimes como *Oswaldocruzia chambrieri* Ben Slimane et Durette-Desset, 1993. Análises morfológicas através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises por biologia molecular nos permitiram não apenas obter caracteres morfológicos particulares do gênero e identificar os espécimes como *O. chambrieri* mas também adicionar novos dados moleculares e informações para a descrição da espécie

MATERIAL E MÉTODOS

Onze espécimes de *R. margaritifera* foram coletados da Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil, durante 6 a 12 de Março de 2014. Os sapos foram anestesiados com ketamina, pesados e necropsiados no laboratório da Estação Científica Ferreira Penna. Todos os nematoides intestinais foram coletados e fixados em solução de álcool 70% aquecido. Alguns espécimes foram transferidos para etanol 100% e armazenados em freezer a -20°C para as análises moleculares. Dados sobre os hospedeiros, o número de helmintos encontrados e as localidades também foram registrados.

Após a fixação, alguns nematódeos foram clarificados em lactofenol e montados em lâminas temporárias para as análises morfológicas e morfométricas no microscópio Olympus BX 41 (Olympus, Tóquio, Japão) equipado com câmara clara. Todos os espécimes foram armazenados em álcool glicerinado e depositados na coleção de invertebrados do Museu Paraense Emílio Goeldi em Belém. As medições são apresentadas em micrômetros, quando não, de acordo com o indicado. Todas as medidas são apresentadas como valores médios seguidos pelo desvio padrão e intervalos em parêntesis.

Para a microscopia eletrônica de varredura, os espécimes foram pós-fixados em O₂Os₄ a 1%, desidratados em série etanólica crescente e desidratados até o ponto crítico de CO₂. Os nematódeos foram montados em stubs metálicos, cobertos com ouro e examinados no microscópio Vega3 (TESCAN) do Laboratório de Embriologia e Histologia – (LHEA/UFRA).

Para a análise molecular, os nematódeos foram submetidos à extração de DNA utilizando o QIAamp DNA Mini 51304(50) Qiagen[®] kit. A Reação em Cadeira da Polimerase

(PCR) foi realizada para amplificar a região codificante Citocromo Oxidase I (COI) do DNA, usando métodos e primers descritos por Prosser et al. (2013). Os fragmentos amplificados foram sequenciados diretamente de acordo com o protocolo do fabricante para ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer Cetus, Noortwalk, CA, USA). Os produtos da reação foram sequenciados usando o ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram alinhadas usando o software ClustalW (Thompson et al. 1994) e comparado com a sequência previamente depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As análises de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios na Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

RESULTADOS

Dos 11 espécimes de *R. margaritifera* analisados, 9 estavam infectados com *O. chambrieri* (prevalência de 81%); no total, 264 espécimes foram coletados, com amplitudes de infecção de 15 - 50 , intensidade média de 29,3 e abundância média de 24.

Na análise molecular dos 697 pares de base obtidos do gene COI, foi observada 92% de similaridade entre a sequência estudada (número de acesso do GenBank KU980934) e sequência de *Oswaldocruzia* sp., parasito de *Trachycephalus venulosus* previamente depositada no GenBank.

Ordem Strongylida Molin, 1861

Superfamília Trichostrongyloidea Cram, 1927

Família Molineidae Durette-Desset et Chabaud, 1977

***Oswaldocruzia chambrieri* Ben Slimane et Durette-Desset, 1993**

Hospedeiro: *Rhinella margaritifera* (Laurenti 1768)

Sítio de infecção: Intestino delgado

Nova localidade: Floresta Nacional de Caxiuanã (1°47'32.3"S, 51°26'02.5"W), Pará, Brasil

Prevalência: 81%

Intensidade de infecção: 29,3

Voucher dos espécimes: MPEG NEM 0066, MPEG NEM 0067

Descrição geral: Nematódeos pequenos e delgados, vesícula cefálica discreta, dividida em duas partes, porção anterior mais larga e porção posterior mais estreita (Fig. 3A).

Estriações cuticulares transversais e cristas longitudinais presentes, aparecendo imediatamente após a dilatação cefálica, emergindo irregularmente, algumas surgindo, outras desaparecendo pelo corpo (Fig. 3A, 3C, 3E, 3F, 3G). Esôfago claviforme, anel nervoso imediatamente anterior a seu comprimento médio (Fig. 1A, 2A), poro excretor interrompendo cristas e logo anterior aos deirídios (Figs. 1A, 2A, 3E). Abertura oral triangular, 6 papilas externo-labiais, sendo 4 papilas cefálicas e 2 anfídios (Fig. 3B). Fêmea com vulva na metade posterior do corpo, ovojetor anfídelfico bem desenvolvido (Fig. 2D, 3F). Cauda cônica, espinho cuticular presente (Fig. 2E, 3G, 3H). Machos com bolsa copuladora sustentada por raios seguindo o padrão de distribuição 2-1-2 (Fig. 4A, 4B). Espículos iguais, envoltos por membrana hialina e divididos em três partes (Fig. 1F, 1G).

Machos (baseado em 9 espécimes). Comprimento total $5,46 \pm 0,58$ (4 - 6) mm. Aproximadamente 27 cristas longitudinais no nível do esôfago e 41 no meio do corpo (Fig. 1B, 1C). Comprimento da vesícula cefálica $68,89 \pm 6,64$ (61 - 83). Anel nervoso $160,56 \pm 12,63$ (140 - 181), poro excretor $286,56 \pm 21,98$ (239 - 312) e deirídios a $304,89 \pm 20,86$ (261 - 336) do ápice. Comprimento do esôfago $429,89 \pm 29,26$ (396 - 445). Razão poro excretor-esôfago $0,67 \pm 0,07$ (0,57 - 0,79). Largura na metade do corpo $121,67 \pm 25,35$ (80 - 147). Bolsa copuladora trilobulada com um par de papilas internas entre os raios 3 e 4. Bolsa do tipo III (ver Ben Slimane et al. 1996), raios 2 e 3 seguindo inteiramente paralelos, atingindo a borda da membrana bursal; raios 4, 5 e 6 com origem comum; raio 4 pequeno, com um sulco mediano, não atingindo a margem bursal, apresentando uma papila externo-dorsal e separado dos raios 5 e 6. Raios 5 e 6 seguindo inteiramente juntos, virando em direção à cauda e alcançando a borda da membrana bursal. Raios 6 e 8 com origem independente. Origem do raio 8 seguindo paralelamente ao raio 6, exceto na porção distal e não alcançando a margem bursal, mas terminando em uma papila dorsal na bolsa (Fig. 1D, 4A). Raio dorsal terminado em um pequeno par de papilas (Fig. 4C). Cone genital bem desenvolvido; raio zero presente na margem anterior, com uma pequena projeção anterior e flanqueado pelos raios 7. Dois pares de papilas bursais ventrais anteriores ao cone genital (Fig. 4B). Espículo direito medindo $181,56 \pm 8,59$ (174 - 193) e o espículo esquerdo $181,22 \pm 8,76$ (171 - 192), ambos divididos em 3 ramos: calçadeira, lâmina dividida distalmente em 6 processos e o garfo dividido no terço posterior ocupando cerca de 23% do comprimento do espículo.

Fêmea (baseado em 9 espécimes). Comprimento total $7,97 \pm 1,29$ (6,93 - 11) mm. Aproximadamente 21 cristas longitudinais no nível do esôfago e 33 na metade do corpo (Fig. 2B, 2C). Comprimento da vesícula cefálica $65,11 \pm 5,42$ (61 - 72). Anel nervoso $168,89 \pm$

10,08 (152-184), poro excretor $291 \pm 29,92$ (256 - 344) e deirídios a $312,44 \pm 35,91$ (277 - 371) do ápice respectivamente. Comprimento do esôfago $479 \pm 19,81$ (440 - 504). Razão poro excretor-esôfago $0,61 \pm 0,06$ (0,53-0,71). Largura na metade do corpo $168,89 \pm 17,55$ (147 - 187). Vulva, com lábio dorsal proeminente, com forma semilunar transversa, a $2,34 \pm 0,22$ (2,7 - 2,04) mm do ápice. Comprimento da vagina vera $109,56 \pm 16,75$ (139 - 93). Ovojeter dividido em vestíbulo $379,22 \pm 39,48$ (326,66 - 389,33), esfíncteres anterior e posterior $40,78 \pm 9,55$ (21 - 53) e $35,11 \pm 8,96$ (24 - 56); infundíbulo anterior e posterior $40,44 \pm 6,86$ (34 - 53) e $43,22 \pm 6,72$ (34 - 53), respectivamente (Fig. 2D). Comprimento da cauda $121,22 \pm 9,73$ (105 - 138) e largura no nível do ânus $67,11 \pm 11,46$ (58 - 93) terminando em um espinho cuticular $15,44 \pm 4,59$ (12 - 24), fasmídeos, circulares, com bordas proeminentes (Fig. 2E, 3G, 3H). Ovos no estágio de mórula $41,78 \pm 2,28$ (38 - 44) \times $71,22 \pm 2,33$ (67 - 74).

DISCUSSÃO

Os nematódeos descritos aqui possuem um esôfago claviforme, vesícula cefálica dividida em duas porções, cutícula com finas estriações transversais e cristas longitudinais sem suporte quitinoso por toda a extensão corporal que constituem o sinlofe. Machos desprovidos de gubernáculo e possuem espículos robustos divididos em três partes envoltas por uma membrana hialina. A bolsa copuladora é sustentada por raios no padrão 2-1-2 e possuem um lobo dorsal triangular. Fêmeas possuem um ovojeter anfídelfico bem desenvolvido com um ovário situado em direção à região anterior e o outro situado em direção à região posterior do corpo. A vulva é localizada na metade posterior do corpo, e a cauda é afilada terminando em um espinho cuticular. Baseado nas descobertas de Vicente et al. (1991) e Anderson et al. (2009), estas características morfológicas nos permitiram atribuir os nematódeos ao gênero *Oswaldocruzia*.

As espécies do gênero *Oswaldocruzia* são divididas em cinco grupos que são caracterizados pela morfologia do espículo e região biogeográfica. Morfológicamente, as espécies de cada grupo são extremamente semelhantes. No entanto, a morfologia da bolsa copuladora e dos espículos nos machos são caracteres morfológicos importantes que contribuem para a diagnose específica destes helmintos (Ben Slimane et al. 1996).

Entre as 41 espécies neotropicais do gênero, a espécie do presente estudo possui bolsa copuladora do tipo III. Dentre os 13 congêneres com bolsa do tipo III, este nematódeo se difere de *O. anolisi*, *O. brevispicula*, *O. jeanbarti* e *O. subauricularis* devido à ausência de aletas cefálicas; difere de *O. binae*, *O. cassonei*, *O. chabaudi*, *O. taranchoni* e *O.*

tcheprakovae devido ao comprimento e morfologia dos espículos; e de *O. albareti* e *O. petterae* devido ao número de cristas na metade do corpo, comprimento total e a razão poro excretor-esôfago. Baseando-se nos caracteres morfológicos e morfométricos apresentados, esta espécie se aproxima de *O. chambrieri* (Tabela I).

No presente estudo, usando microscopia de luz, também observamos que os espécimes analisados possuem um par de papilas internas na bolsa copuladora e que os raios 4 possuem um sulco mediano. A presença do sulco mediano nos raios 4 também foi observada em outra espécie de nematódeo da família Molineidae por Feitosa et al. (2015). Este caractere poderia estar presente em todas as espécies da família e ser adicionado à diagnose da família, entretanto, serão necessários estudos detalhados destas espécies.

A MEV revelou caracteres ultraestruturais dos nematódeos, nos permitindo observar detalhes taxonômicos relevantes para o gênero que não podem ser observados em microscopia de luz (Feitosa et al. 2015; Santos et al. 2008). No presente estudo, utilizamos análise de MEV para confirmar a estrutura da abertura oral e a distribuição das papilas na abertura bem como o formato do poro excretor, os deirídios e as cristas longitudinais cuticulares ao longo do corpo. Além disso, confirmamos a disposição dos raios bursais e a presença de papilas bursais dorsais.

O nematódeo estudado é a terceira espécie de *Oswaldocruzia* observada por MEV. Santos et al. (2008) descreveram caracteres ultraestruturais de várias estruturas, como as cristas cuticulares, estruturas cefálicas, os raios e as papilas da bolsa copuladora (as quais foram caracterizadas em detalhe), o cone genital dos machos, e os raios correspondentes, como representativos do gênero; os autores também relataram a natureza descontínua das cristas longitudinais ao longo do corpo a qual resultou em variação no número de cristas. Feitosa et al. (2015) também observaram esta variação em uma espécie de nematódeo de um gênero diferente da família Molineidae; desta forma, nós enfatizamos que esse caractere não é observado de forma consistente entre as espécies de *Oswaldocruzia* e deve, portanto, ser cuidadosamente analisado antes de ser incluído como um caráter taxonômico para a diferenciação das espécies.

Os resultados da análise molecular sugerem que a relação entre *O. chambrieri* do presente estudo e *Oswaldocruzia* sp. parasito de *Trachycephalus venulosus* não pode ser bem estabelecida, devido à ausência de informações moleculares de outras espécies neotropicais e de hospedeiros relacionados, assim como sobre a morfologia de *Oswaldocruzia* sp.

Desta forma, o presente estudo representa o primeiro relato de *O. chambrieri* no Brasil, a terceira espécie de *Oswaldocruzia* observada por MEV, a segunda sequência depositada para o gênero e a primeira sequência para a qual a espécie foi identificada.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. Elane Guerreiro Giese do Laboratório de Embriologia Animal e Histologia da Universidade Federal da Amazônia, Belém, por seu apoio técnico com as análises de MEV. O apoio financeiro para este estudo foi fornecido pela PROPESP / PPG BAIP/UFPA, CAPES Fundação, o Ministério da Educação do Brasil (CAPES-PARASITOLOGIA concessão BÁSICA/2010), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (subvenções SISBiota 2010-Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade, PVE CAPES/CNPq A_033 / 2013; Bolsa de produtividade CNPQ de JNS; bolsa de pesquisa de iniciação científica para YWOC). Este trabalho é parte da monografia do primeiro autor apresentada na Universidade Federal do Pará, Brasil.

REFERÊNCIAS

- Anderson C.R., Chabaud G.A., Willmott S. 2009. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates, Archival Volume London: Cab International.
- Barus V., Coy Otero A. 1968. *Freitasia teixerai* gen. n., sp. n. and other nematodes parasitizing *Anolis equestris* (Squamata: Iguanidae). *Folia Parasitologica*, 15, 41-45.
- Ben Slimane B., Durette-Desset M.C. 1993. Quatre nouvelles espèces du genre *Oswaldocruzia* Travassos, 1917 (Nematoda:Trichostrongyloidea) parasites d'Amphibiens d'Equateur. *Revue Suisse de Zoologie*, 100, 113-136.
- Ben Slimane B., Durette-Desset M.C., Chabaud A.G. 1995. Phénomènes de spéciation chez les *Oswaldocruzia* (Nematoda: Trichostrongylina: Molineoidea) parasites de Lézards de Guadeloupe. *Parasite*, 2, 373-383.
- Ben Slimane B., Chabaud A.G., Durette-Desset M. 1996. Les Nématodes Trichostrongylina parasites d'Amphibiens et de reptiles: problèmes taxonomiques, phylétiques et biogéographiques. *Systematic Parasitology*, 35, 179–206. DOI: 10.1007/BF00009639.

- Campiãõ K.M., Morais D.H., Dias O.T., Aguiar A., Toledo G., Tavares L.E.R., Da Silva R.J. 2014. Checklist of helminth parasites of amphibians from South America. *Zootaxa*, 3843, 1–93. DOI: 10.11646/zootaxa.3843.1.1.
- Dos Santos S.P., Ibáñez R., Ron S.R. 2015. Systematics of the *Rhinella margaritifera* complex (Anura, Bufonidae) from western Ecuador and Panamá with insights in the biogeography of *Rhinella alata*. *ZooKeys*, 501, 109–145. DOI: 10.3897/zookeys.501.8604.
- Feitosa L.A., Furtado A.P., dos Santos J.N., Melo F.T. 2015. 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*, 92, 251–259. DOI: 10.1007/s11230-015-9600-1.
- Frost D.R. 2014. Amphibian Species of the World: An Online Reference, Version 6.0. American Museum of Natural History, USA. Available at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.html>. Archived by WebCite at <http://www.webcitation.org/6RVXmH2Ls> on 31 March 2015
- Guerrero R. 2013. Two new species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Trichostrongylina: Molineoidea) parasites of the cane toad *Rhinella marina* (Amphibia: Anura) from Peru. *Acta Parasitologica*, 58, 30–36. DOI: 10.2478/s11686-013-0103-4.
- Lavilla E.O., Caramaschi U., Langone J.A., Pombal Jr. J.P., De Sá R.O. 2013. The identity of *Rana margaritifera* Laurenti, 1768 (Anura, Bufonidae). *Zootaxa*, 3646, 251–264. DOI: 10.11646/zootaxa.3646.3.4.
- Moravec F., Kaiser H. 1995. Helminth parasites from West Indian frogs, with descriptions of two new species. *Caribbean Journal of Science*, 31, 252–268.
- Moravec J., Lehr E., Cusi J.C., Córdova J.H., Gvoždík V. 2014. A new species of the *Rhinella margaritifera* species group (Anura, Bufonidae) from the montane forest of the Selva central, Peru. *ZooKeys*, 371, 35–56. DOI: 10.3897/zookeys.371.6580.
- Pérez-Vigueras I. 1938. Notas sobre algunos nematodos parasitos nuevos de Cuba. *Livro Jubilar de Travassos*, 501–508.
- Prosser S.W., Velarde-Aguilar M.G., León-Règagnon V., Hebert P.D. 2013. Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources*, 13, 1108–1115. DOI: 10.1111/1755-0998.12082.
- Santos J.N., Giese E.G., Maldonado Jr. A.J., Lanfredi R.M. 2008. A new species of *Oswaldocruzia* (Molineidae: Nematoda) in *Chaunus marinus* (Amphibian: Bufonidae)

- (Linneaus, 1758) from Brazil. *Journal of Parasitology*, 94, 264–268. DOI: 10.1645/GE-1336.1.
- Svitin R., Kuzmin Y. 2012. *Oswaldocruzia duboisi* (Nematoda, Molineidae): morphology, hosts and distribution in Ukraine. *Vestnik Zoologii*, 46, 195–203. DOI: 10.2478/v10058-012-0017-x.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673.
- Travassos L. 1917. Trichostrongylidas brazileiras (5a Nota previa). *Brasil Medico*, 31, 1-4.
- Vicente J.J, Rodrigues H.O, Gomes D.C, Pinto R.M. 1991. Nematóides do Brasil 2a parte: nematóides de Anfíbios. *Revista Brasileira de Zoologia*, 7: 549-626.

Legenda das figuras e Tabela

Figura. 1. Desenhos de *Oswaldocruzia chambrieri* macho de *Rhinella margaritifera*. A. Extremidade anterior, visão ventral; B. Seção transversal no nível do esôfago; C. Sinlofo em seção transversal na metade do corpo; D. Visão ventral da bolsa copuladora; E. Visão lateral na bolsa copuladora; F. Visão lateral do espículo; G. Visão dorsal do espículo. Barras: A = 75 μm ; B = 30 μm , C, F, G = 40 μm ; D = 25 μm ; E = 50 μm .

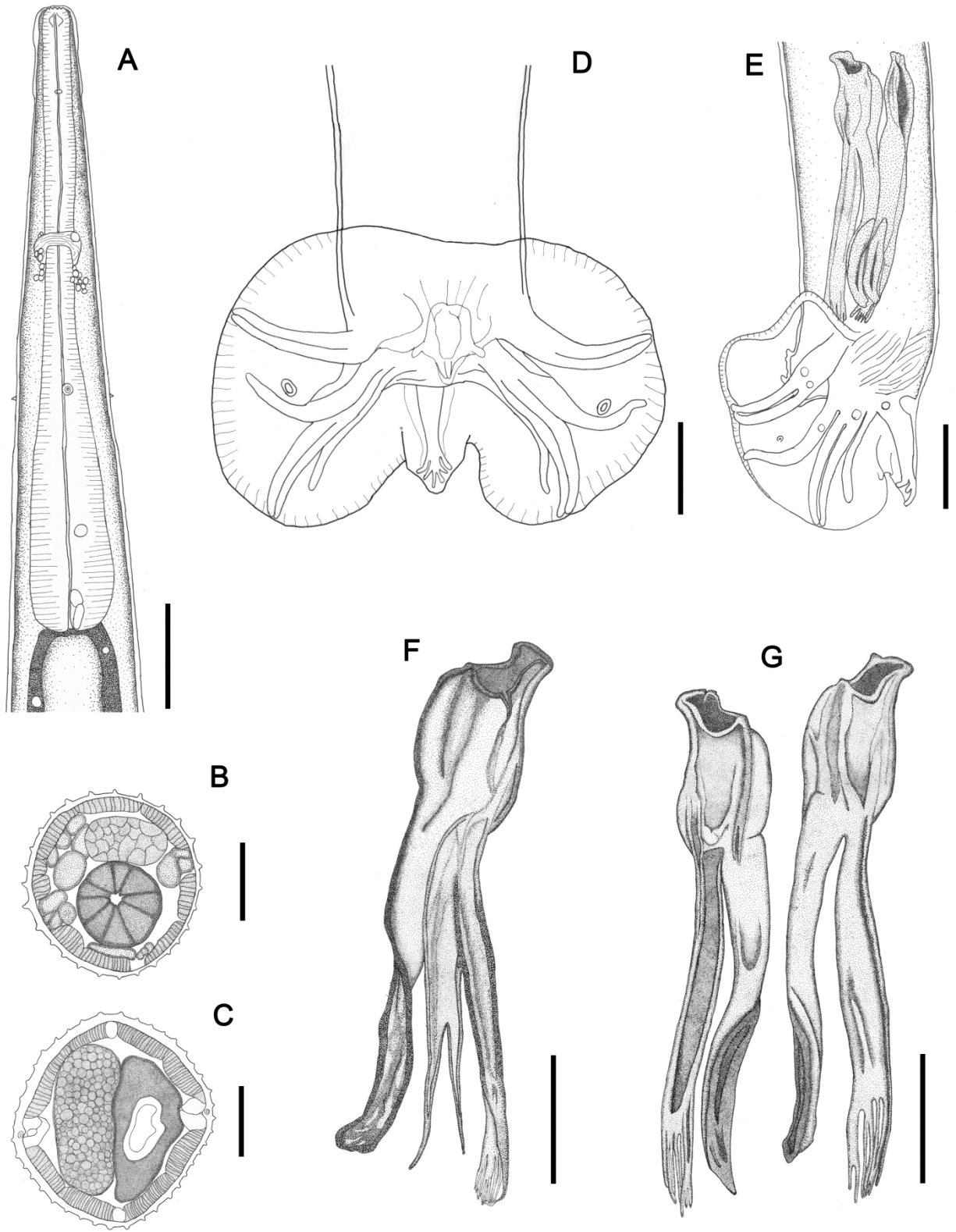
Figura. 2. Desenhos de *Oswaldocruzia chambrieri* fêmea de *Rhinella margaritifera*. A. Extremidade anterior, visão ventral; B. Seção transversal no nível do esôfago; C. Sinlofo em seção transversal na metade do corpo; D. Visão lateral da vulva e do ovojetor; E. Visão lateral da cauda, com espinho cuticular. Barras: A, D = 50 μm ; B = 30 μm , C = 40 μm ; D = 100 μm .

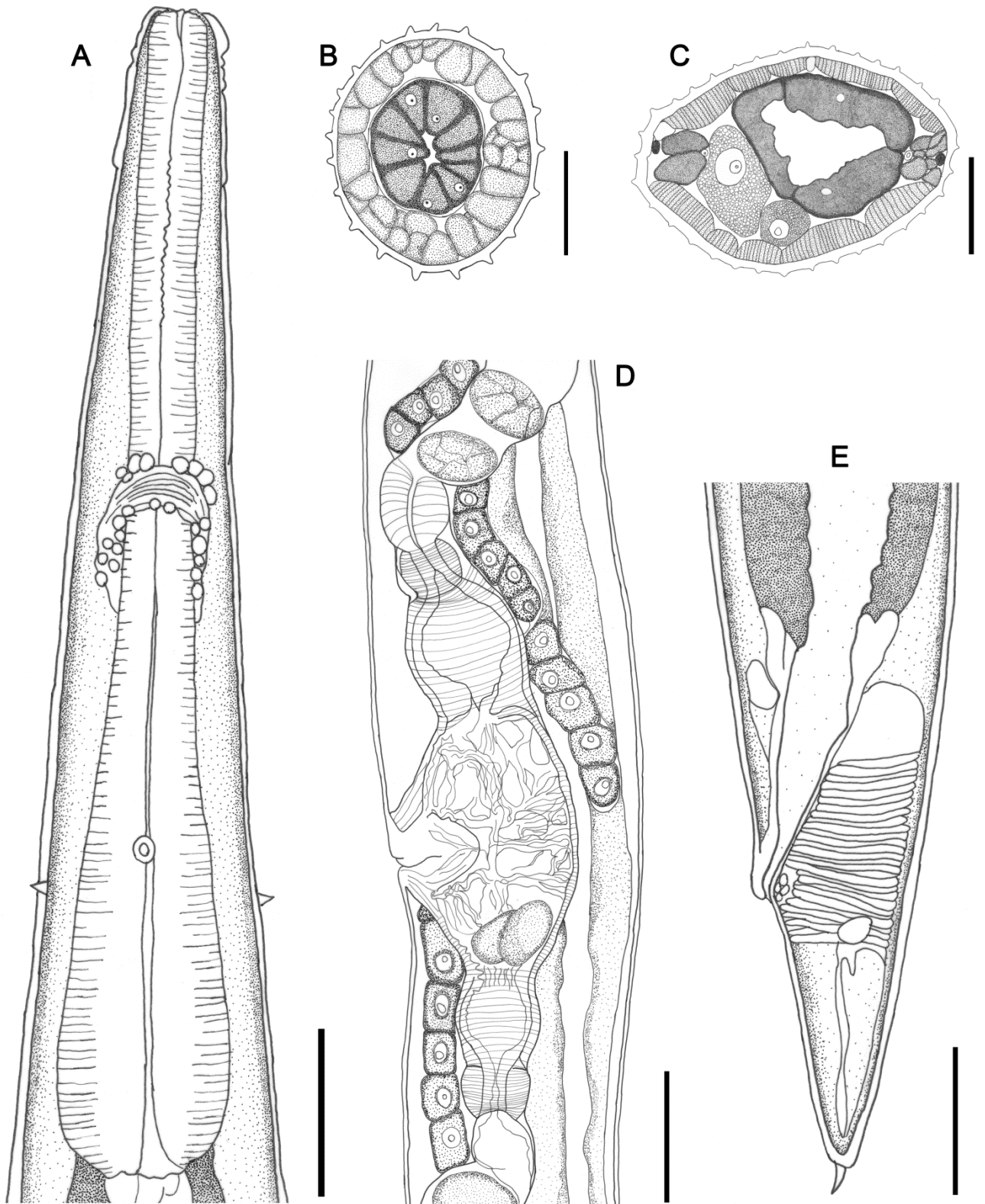
Figura. 3. *Oswaldocruzia chambrieri*, Fotomicrografias em microscopia eletrônica de varredura. A. Região anterior e estruturas cefálicas; B. Visão apical da extremidade anterior, abertura oral com dentes esofágicos, 4 papilas cefálicas (seta) e 2 anfídios; C. Detalhes das cristas longitudinais; D. Deirídios; E. Poro excretor; F. Terço posterior do corpo da fêmea mostrando a vulva e a distribuição das cristas, G. Extremidade posterior da fêmea mostrando o ânus e o padrão das cristas; H. Detalhes da cauda, demonstrando o fasmídeo (seta) e o espinho cuticular. Barras: A, F = 50 μm ; B, D, H = 5 μm ; C, E, G = 20 μm ; D, E

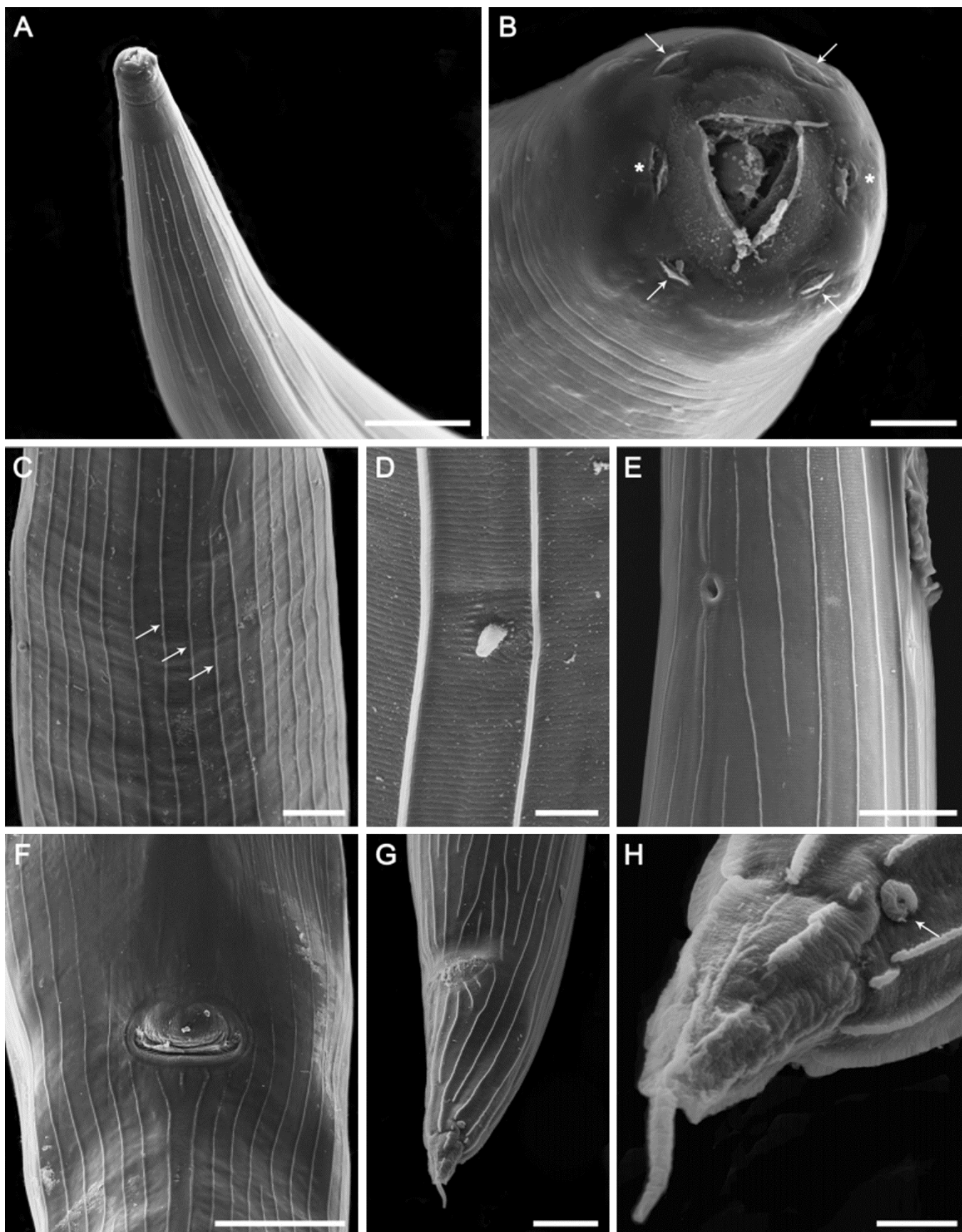
Figura. 4. *Oswaldocruzia chambrieri*, Fotomicrografias em microscopia eletrônica de varredura. A. Visão lateral da região posterior do macho, mostrando os raios 2-6 e 8 sustentando a bolsa copuladora, duas papilas bursais (setas) e o raio dorsal (dr). B. Visão ventral da bolsa copuladora evidenciando o cone genital, raios 7 (r7), e zero (rz) e duas papilas (setas). Inset. Detalhes das papilas bursais C. Detalhes do lobo dorsal com os raios 9 (r9) com papila (seta) e raio 10 (r10). Barras: A, B = 20 μm , C = 10 μm .

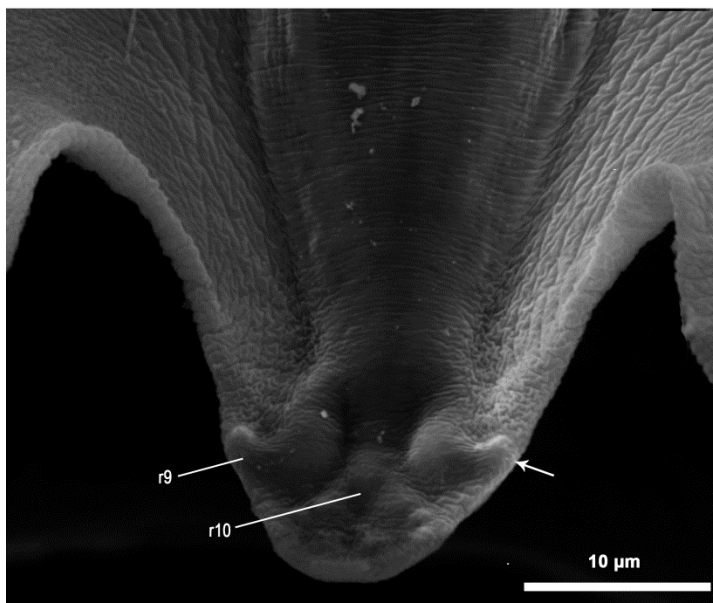
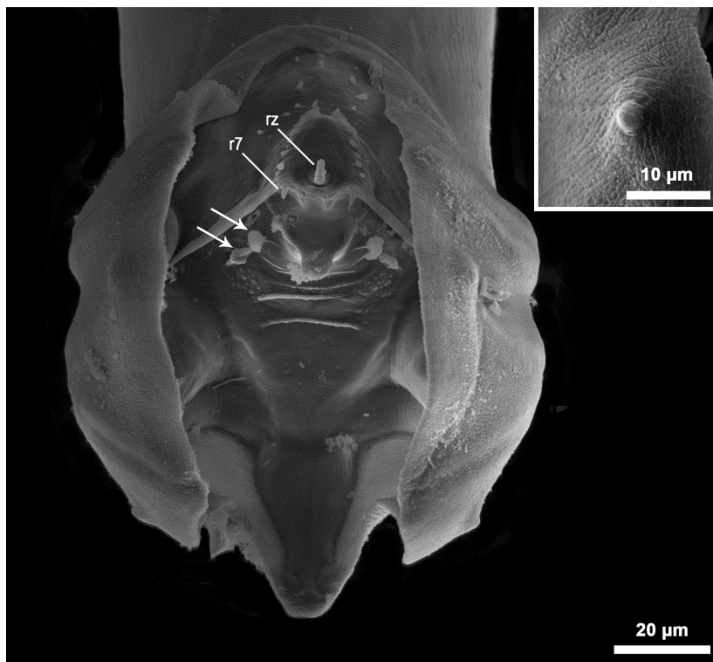
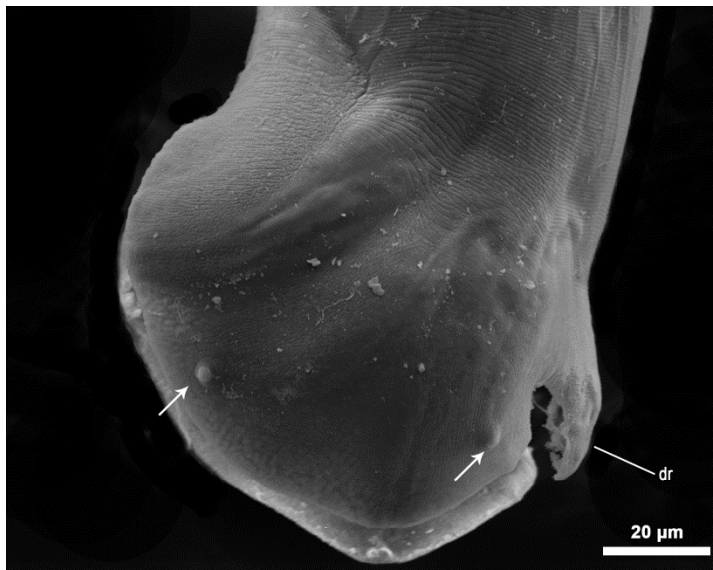
Tabela I

Comparação de características selecionadas de espécimes machos de *Oswaldocruzia chambrieri* encontrados parasitando *Rhinella margaritifera* no Brasil e espécies neotropicais apresentando bolsa do tipo III.









ANEXO 1

ACTA PARASITOLOGICA, an international, peer-reviewed journal, publishes original full length articles, short research notes, invited review articles and book reviews, of high scientific quality on all aspects of pure and applied parasitology. Casuistic notes and papers of local importance are not accepted. Submission of the manuscript implies that it has not been published before nor is being considered for publication elsewhere. The manuscript should be accompanied by a letter signed by the authors. If the article was prepared jointly with other authors, the signatory of this form warrants that he has been authorized by all co-authors to sign this agreement on their behalf, and agrees to inform his co-authors of the terms of this agreement. The corresponding author is requested to provide an e-mail address to facilitate.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Before submission of the manuscript Authors should register themselves first as new users and then upload their manuscripts along with a cover letter. Authors should submit their manuscripts online by using link <http://www.editorialmanager.com/ap/>. Then, please follow the instructions given on the screen. Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation. In case of any problems please contact directly to the Editorial Office actapar@twarda.pan.pl.

Authors are asked to suggest at least three potential referees including their addresses, e-mail addresses and, if possible, telephone and fax numbers.

ETHICS IN PUBLISHING

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see

<http://www.springer.com/authors/journal+authors/journal+authors+academy?SGWID=0-1726414-12-837825-0>

PERMISSIONS

Authors wishing to include figures and/or text that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers.

PAGE CHARGES

There are no page charges for publication in *Acta Parasitologica*. However, there are charges associated with the reproduction of colour illustrations and the purchase of reprints. Online publication of colour illustrations is always free of charge. For colour in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of 300 € for the first page and 100 € for every additional page, to Versita. Authors who decided to withdraw their article during its processing and/or after its acceptance they would be asked to cover editorial costs of 80 (+local taxes) per page (1800 characters including spaces), however, not less than 500 € per article.

MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted in correct English checked by a native English-speaking biologist/parasitologist. Authors are responsible for the linguistic accuracy of their papers. Authors should clearly confirm that their manuscript submitted to this journal was neither sent to another journal nor any part of it has been published or is being considered for publication elsewhere in any form.

The manuscript should contain: the title (as concise and informative as possible); the affiliation(s) and address(es) of the author(s); corresponding author e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author; running title; abstract (preferably not exceeding 200–250 words) and keywords proposed by the authors (up to 6). The name(s) of the author(s).

Papers should be typed in English with double-spacing, and wide margins including a left-hand margin of not less than 2.5 cm. The text should be composed of the Introduction, Materials and methods, Results, and Discussion, provided with Acknowledgements if any, References, Tables and Figures. No part of the manuscript should be typed in capitals. Latin terms, including genus and species names should be written in italics. Only the generally accepted abbreviations and symbols are allowed. Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

The description of new species should be supported, if possible, by results obtained by means of molecular analysis. Contributors of taxonomic studies are encouraged to use molecular analysis where this is appropriate and feasible.

NOMENCLATURE

The authors should follow the international rules of nomenclature in the names of organisms they describe. Recommendations of the International Code of Zoological Nomenclature, London 1999 should be strictly adhered to.

REFERENCES

Only references cited in the text may be included in their list. They should be arranged in the alphabetical order in the following format for journal article author(s), year of publication, journal title (full name in italics), volume, range of pages, and full DOI should be provided by author(s).

Example: Dabert J., Skoracki M. 2007. *Syringoplutarchusia nordmanni*, a new genus and species of the feather mite family Syringobiidae (Acari, Astigmata, Pterolichoidea) from the Black-winged Pratincole *Glareola nordmanni* (Charadriiformes, Glareolidae). *Acta Parasitologica*, 52, 62–69. DOI: 10.2478/s11686-007-0008-1.

For a book: Author(s), date, title, publisher, publication place. Example: Rohde K. (Ed.). 2005. *Marine Parasitology*. CSIRO Publishing, Collingwood VIC 3066, Australia and CABI Publishing, Wallingford, UK, 565 pp.

For book chapter or article in an edited book: Author(s) of chapter, year, chapter title. In: Editors of the book (Eds.), book title in italics, place of publication, publisher, chapter page range.

Example: Cribb T.H. 2005. Family Opecoelidae Ozaki, 1925. In: (Eds. A. Jones, R.A. Bray and D.I. Gibson) *Keys to the Trematoda*. Vol. 2. CABI Publishing and The Natural History Museum, Wallingford, 443–531.

For proceedings from a conference: Author(s), year of publication, title. In: Conference name, date, place of conference, page range.

Example: Świdorski Z., Chomicz L., Grytner-Zięcina B., Sereda M.J. 2002. Ultrastructural characteristic of the oncospherical germinative cells in *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus*. In: *Proceedings of the 10th International Congress of Parasitology ICOPA X: Symposia, Workshops and Contributed Papers*, 4–9 August, 2002, Vancouver, Canada, 551–554.

For thesis: Author(s), year of publication, title, information, place of publication. Example: McKerr G. 1985. *The fine structure and physiology of a trypanorhynch tapeworm *Grillotia erinaceus**. PhD Thesis, The Queen's University of Belfast, Northern Ireland, UK.

Names of authors and titles of references should be given in original languages, except these written in non Latin characters. The latter should be translated into English. When there is more than one reference of a given author in the same year, the references should be distinguished by letter 'a' being used for the first reference and 'b', 'c' for the following. The method of citation in the text should correspond to that in recent issues of *Acta Parasitologica*. Correct references are the responsibility of the author(s). In addition, authors should provide complete, correct and properly structured DOI number to references, whenever it is possible. If the article and book has DOI number, the author should include it in the

references. DOIs are very easy to find. Please keep in mind that the DOI number will automatically make the active link.

TABLES

Tables must be provided in Word format with Roman numbering and clear headings should be typed on separate pages. The text should not duplicate information given in the Tables and Figures. Where necessary, results should be analysed using an appropriate statistical test.

FIGURES

When first submitting a manuscript for peer review, low-resolution versions of figures should be uploaded to limit file size. In the final submission the line drawings should not be larger than twice the final size. Lines should be bold enough to withstand reduction. Lettering, symbols and scale bars which appear on figures (kept to a minimum) should be of good quality and of sufficient size to withstand reduction. The legends should be typed on a separate page. All figures should be clearly marked with Arabic numbering. All figures should be send in TIFF. The following resolutions are optimal: photographs – 300 dpi, line figures – 600 dpi.

FINAL PROOFREADING

Authors will receive a pdf file with the edited version of their manuscript for final proofreading. This is the last opportunity to view an article before its publication. The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

ELECTRONIC REPRINTS

After publication the corresponding author receives a pdf file with the published version of the manuscript.

TRANSFER OF COPYRIGHT AGREEMENT

A properly completed TCA must be provided for each submitted manuscript. OFFPRINTS Offprints can be ordered by the corresponding author(s).

CARE OF EXPERIMENTAL ANIMALS

It is the responsibility of authors to ensure that their practices conform with their national animal ethics guidelines. Submitted papers must contain precise details on the care and use of animals and of experimental procedures, especially interventions such as surgery and tissue sampling, and methods of euthanasia. Referees are asked to indicate whether there is any reason to consider that experimental animals were not well treated or care not taken to avoid distress, and papers may ultimately be rejected on such grounds.

CONFLICT OF INTERESTS

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

ANEXO 2

Redescription of *Oswaldocruzia chambrieri* (Strongylida, Molineidae) from *Rhinella margaritifera* (Anura, Bufonidae) in Caxiuanã National Forest, Brazil

Yuri Willkens¹, Arnaldo Maldonado Jr.², Jeannie Nascimento dos Santos¹, Gleomar Fabiano Maschio³ and Francisco Tiago de Vasconcelos Melo^{1*}

¹Laboratório de Biologia Celular e Helminologia "Profa. Dra. Reinalda Marisa Lanfredi" – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brazil; ²Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz - Pavilhão Arthur Neiva, Brazil; ³Laboratório Multidisciplinar da Biologia a Distância, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brazil

Abstract

Oswaldocruzia chambrieri Ben Slimane et Durette-Desset, 1993 is redescribed from specimens collected from the small intestine of the South American common toad, *Rhinella margaritifera*, from Caxiuanã National Forest in Pará, Brazil, using light and scanning microscopy and molecular analysis of Cytochrome Oxidase I (COI) - coding regions of DNA. The discovered nematodes are characterized by a type III caudal bursa with two papillae, rays 4 with a median groove, and spicules divided into a blade, a shoe and a fork. Cervical alae are absent, the cephalic vesicle is divided into two portions, and the synlophe has low ridges without chitinous supports. The present study establishes the Caxiuanã National Forest as a new location for *O. chambrieri*, which had previously been reported as a parasite of *R. margaritifera* in Ecuador, uses light microscopy and scanning electron microscopy (SEM) to identify new morphological characters of the species and represents the second molecular sequence deposited for the *Oswaldocruzia* genus.

Keywords

Nematodes, Trichostrongyloidea, new morphological data, Brazilian Amazon

Introduction

Rhinella margaritifera (Laurenti, 1768) is a complex group represented by 16 formally recognized species, 13 of which occur in the Amazon basin. These species are represented by members of several communities of Neotropical medium-sized toads that inhabit the litter of humid tropical forests (Lavilla *et al.* 2013; Moravec, *et al.* 2014).

Distributed across the Neotropical region, from the southern United States to southern South America (Frost, 2014), these species have particularly been found in the northern part of South America (Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia, Peru, Brazil, Suriname, Guyana and French Guiana) and in Central America (Panamá). The cryptic coloration of these toads resembles the pattern of fallen leaves and partially decomposed matter in the soil, producing a camouflage effect that is enhanced by body contours, the presence of cranial el-

evations on the crests, and the neural crests of certain species' vertebrae (Dos Santos *et al.* 2015; Lavilla *et al.* 2013).

The genus *Oswaldocruzia* Travassos, 1917 has a worldwide distribution and includes approximately 88 species (Svitin and Kuzmin, 2012). Currently, 41 species are known to exist in the Neotropical region, 14 of which have been reported from South American amphibians; only eight of these species have been described as parasites of amphibians and reptiles in Brazil (Guerrero, 2013; Campião *et al.* 2014).

During studies on the genus *Oswaldocruzia*, we examined specimens collected from *R. margaritifera* from Caxiuanã National Forest in Pará, Brazil. Based on our analyses, we assigned these specimens to *Oswaldocruzia chambrieri* Ben Slimane et Durette-Desset, 1993. Morphological examinations using light microscopy and scanning electron microscopy (SEM) allowed us to not only assess particular morphological

characters of the genus and assign the specimens to *O. chambrieri* but also add new information to the species description and molecular data.

Material and Methods

Eleven specimens of *R. margaritifera* were collected from Caxiuanã National Forest, Pará, Brazil, during March 6–12, 2014. The toads were anesthetized with ketamine, weighed and necropsied in a laboratory at Ferreira Penna Scientific Station. All intestinal nematodes were collected and fixed in a heated 70% alcohol solution. Certain specimens were transferred to 100% ethanol and stored in a freezer at -20°C for molecular examinations. Data regarding the host, the number of helminths found and helminth locations were also registered.

After fixation, certain nematodes were clarified in lactophenol and mounted on temporary slides for morphological and morphometrical analysis with an Olympus BX 41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a drawing tube. All of the specimens were stored in glycerin alcohol and deposited in the invertebrate collection of the Emílio Goeldi Paraense Museum in Belém. Measurements are given in micrometers unless otherwise as indicated. All measurements are presented as mean values followed by ranges in parentheses. For scanning electron microscopy, specimens were post-fixed in 1% O_2Os_4 , dehydrated in an ascending ethanol series and dried at the critical point of CO_2 . Nematodes were mounted on metallic stubs, coated with gold and examined using a Vega3 (TESCAN) microscope from Laboratory of Embryology and Histology (Laboratório de Embriologia e Histologia – LHEA/UFRA).

For molecular analysis, nematodes were subjected to DNA extraction using a QIAamp DNA Mini 51304(50) Qiagen® kit. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify Cytochrome Oxidase I (COI)-coding regions of DNA, using methods and primers described by Prosser *et al.* (2013). Amplified fragments were directly sequenced in accordance with the manufacturer's protocol for the ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer Cetus, Noortwalk, CA, USA). The reaction products were sequenced using an ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. The obtained sequences were aligned using ClustalW software (Thompson *et al.* 1994) and were compared with sequences that had previously been deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Molecular biology analysis were conducted in the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Reservoir Mammals at Foundation Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Results

Among the 11 analyzed specimens of *R. margaritifera*, 9 were infected with *O. chambrieri* (a prevalence of 81%); in total,

264 specimens were collected, with range of infection 15 to 50, a mean intensity of 29.3 and a mean abundance of 24.

Molecular analysis of 697 base pairs of COI gene (*Oswaldocruzia chambrieri* from present study, GenBank accession number KU980934) identified 92% similarity of the studied sequence to that from an *Oswaldocruzia* sp., a parasite of *Trachycephalus venulosus* that has already been deposited in GenBank.

Order Strongylida Molin, 1861

Superfamily Trichostrongyloidea Cram, 1927

Family Molineidae Durette-Desset et Chabaud, 1977

Oswaldocruzia chambrieri Ben Slimane et Durette-Desset, 1993

Host: *Rhinella margaritifera* (Laurenti, 1768)

Infection site: Small intestines

New locality: Caxiuanã National Forest ($1^{\circ}47'32.3''\text{S}$, $51^{\circ}26'02.5''\text{W}$), Pará, Brazil

Prevalence: 81%

Intensity of infection: 29.3

Voucher specimens: MPEG. NEM 66, MPEG. NEM 67.

General description: Small and thin nematodes, cephalic vesicle smooth, divided into two parts, a wider anterior portion and one narrower posterior portion (Fig. 3A). Transverse cuticle striations and longitudinal ridges present, appearing immediately after cephalic dilation, emerging irregularly, some appearing, some disappearing along body (Fig. 3A, 3C, 3E, 3F, 3G). Esophagus claviform, nerve ring just anterior to its mid-length (Fig. 1A, 2A), excretory pore (Fig. 3E) interrupting the ridges just anterior to deirids (Fig. 1A, 2A, 3E). Oral opening triangular, 6 externo-labial papillae, 4 cephalic papillae and 2 amphids (Fig. 3B). Female with vulva at posterior half of body, well-developed amfidelphic ovojector (Fig. 2D, 3F). Tail conical, cuticular spine present (Fig. 2E, 3G, 3H). Males with caudal bursa supported by rays following the distribution pattern 2-1-2 (Fig. 4A, 4B). Spicules equal, surrounded by hyaline membrane and divided into three parts (Fig. 1F, 1G).

Male (based on 9 specimens). Length 5.46 ± 0.58 (4–6) mm. Approximately 27 longitudinal crests at esophagus level and 41 at mid body level (Fig. 1B, 1C). Cephalic vesicle length 68.89 ± 6.64 (61–83). Nerve ring 160.56 ± 12.63 (140–181), excretory pore 286.56 ± 21.98 (239–312) and deirids at 304.89 ± 20.86 (261–336) from apex. Esophagus length 429.89 ± 29.26 (396–445). Excretory pore-esophagus ratio 0.67 ± 0.07 (0.57–0.79). Width at midbody 121.67 ± 25.35 (80–147). Caudal bursa trilobed with a pair of internal papillae between rays 3 and 4. Bursa of type III (see Ben Slimane *et al.* 1996), rays 2 and 3 running parallel throughout, reaching edge of bursal membrane; rays 4, 5, and 6 with common origin, ray 4 short, with a medial groove, not reaching bursal margin, presenting an external dorsal papilla, separated from 5 and 6. Rays 5 and 6 running throughout, turning caudate and reaching edge of bursal membrane. Rays 6 and 8 with inde-

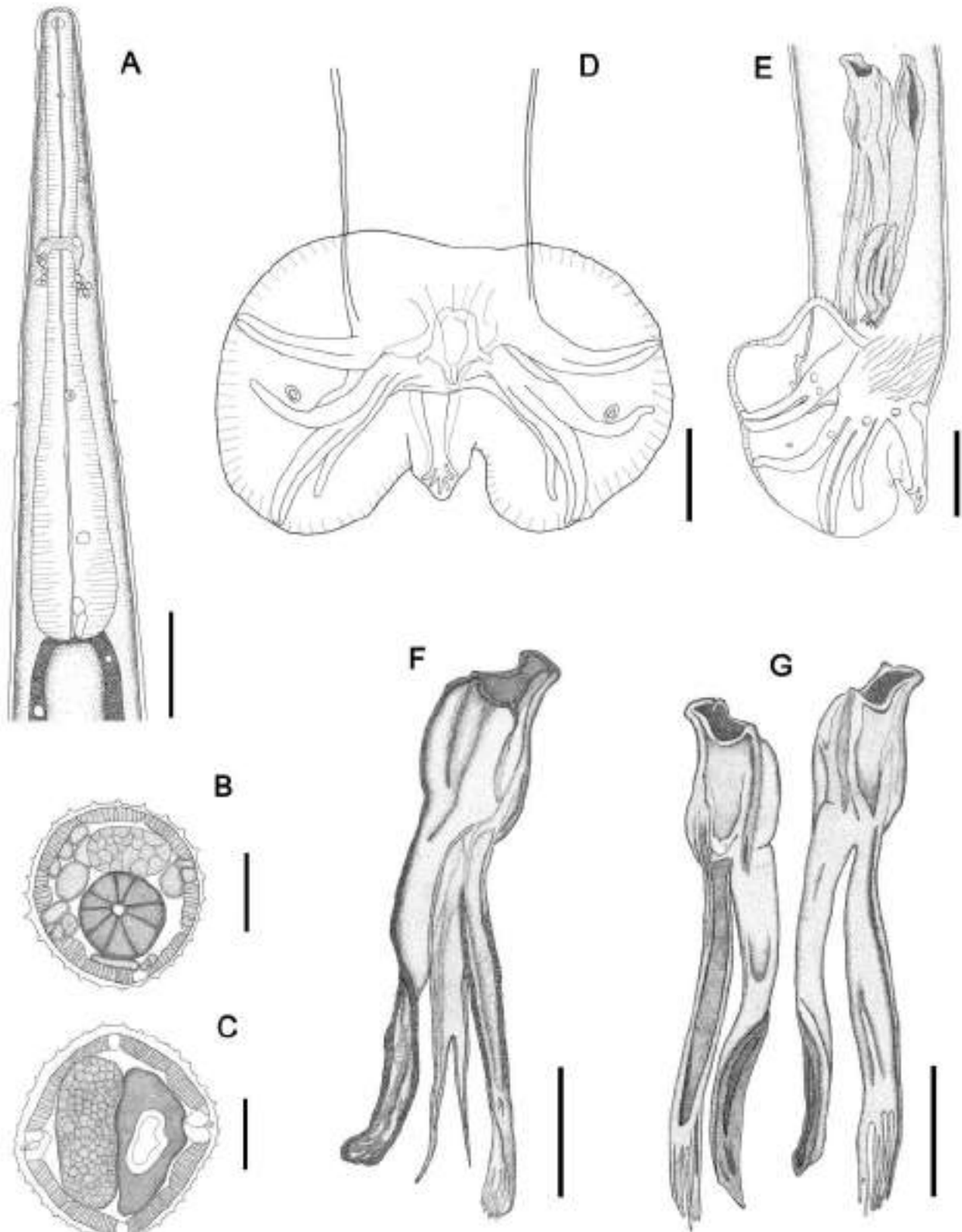


Fig. 1. Line drawings of *Oswaldocruzia chambrieri* males from *Rhinella margaritifera*. **A** – Anterior end, ventral view; **B** – Transverse section at esophagus level; **C** – Synlophe in transverse section at mid-body; **D** – Ventral view of caudal bursa; **E** – Lateral view of caudal bursa; **F** – Lateral view of the spicule; **G** – Dorsal view of the spicule. Scale bars: A = 75 μ m; B = 30 μ m, C, F, G = 40 μ m; D = 25 μ m; E = 50 μ m

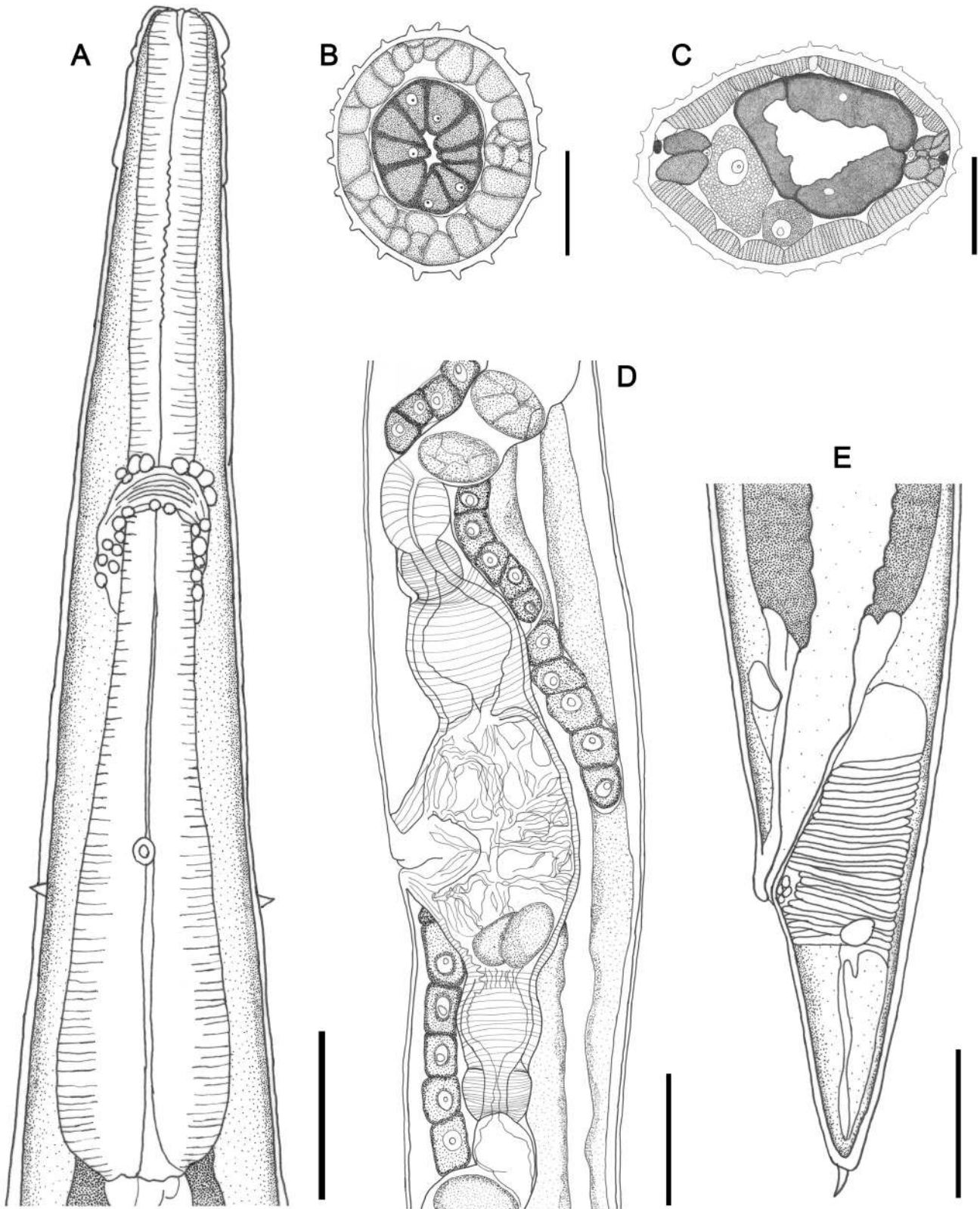


Fig. 2. Line drawings of *Oswaldocruzia chambrieri* females from *Rhinella margaritifera*. **A** – Anterior end, ventral view; **B** – Transverse section at esophagus level; **C** – Synlophe in transverse section at mid-body; **D** – Lateral view of vulva and ovojector; **E** – Lateral view of tail, with cuticular spine. Scale bars: A, D = 50 µm; B = 30 µm, C = 40 µm; D = 100 µm

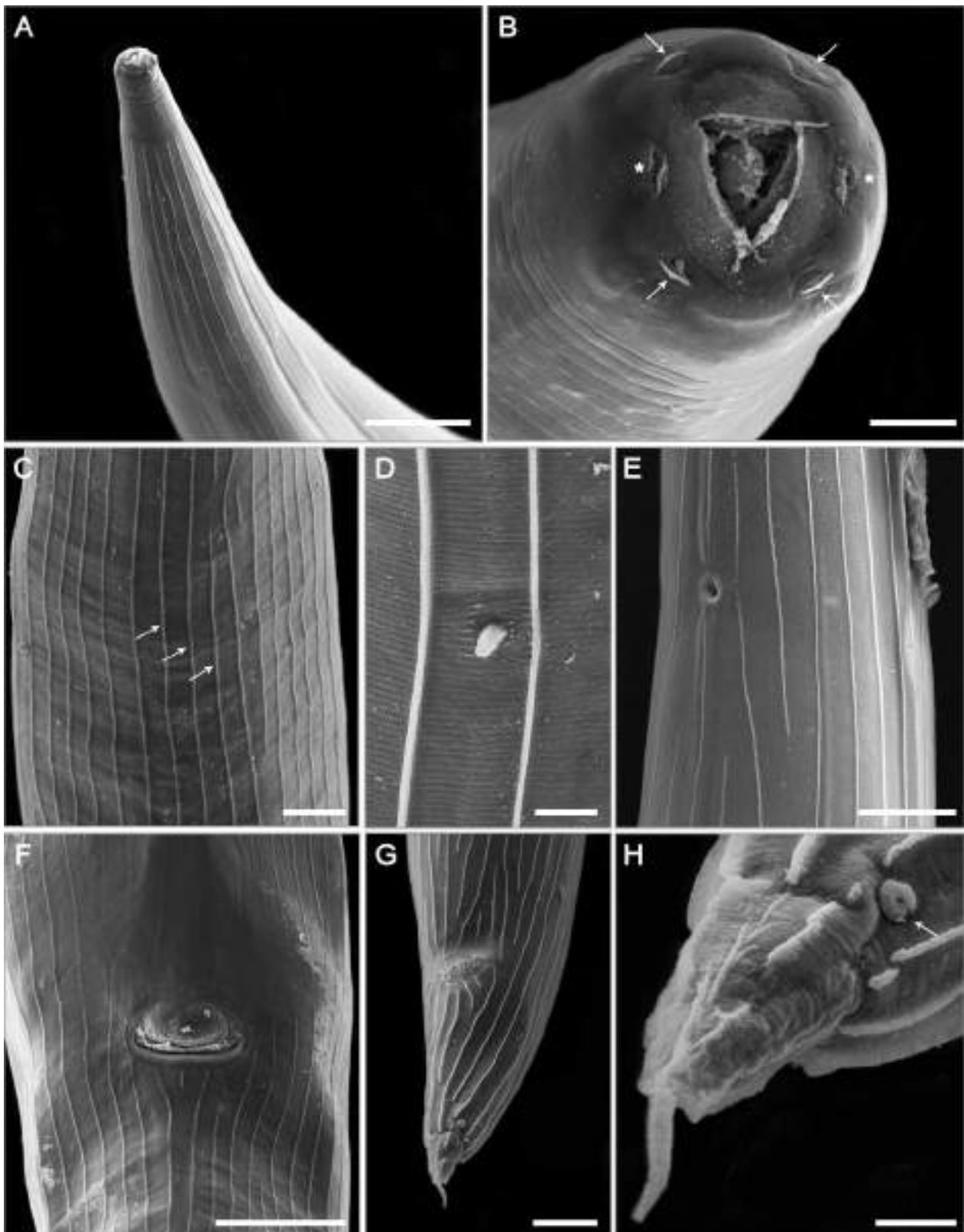


Fig. 3. *Oswaldocruzia chambrieri*, scanning electron photomicrographs. **A** – Anterior region and cephalic structures; **B** – Apical view of the anterior end, mouth opening with esophageal teeth, 4 cephalic papillae (arrow) and 2 amphids; **C** – Details of longitudinal ridges; **D** – Deirid; **E** – Excretory pore; **F** – Posterior third of female body showing the vulva and the distribution of the ridges, **G** – Female posterior end showing anus and pattern of the ridges; **H** – Details of tail, showing the phasmid (arrow) and the cuticular spine. Scale bars: A, F = 50 μ m; B, D, H = 5 μ m; C, E, G = 20 μ m; D, E

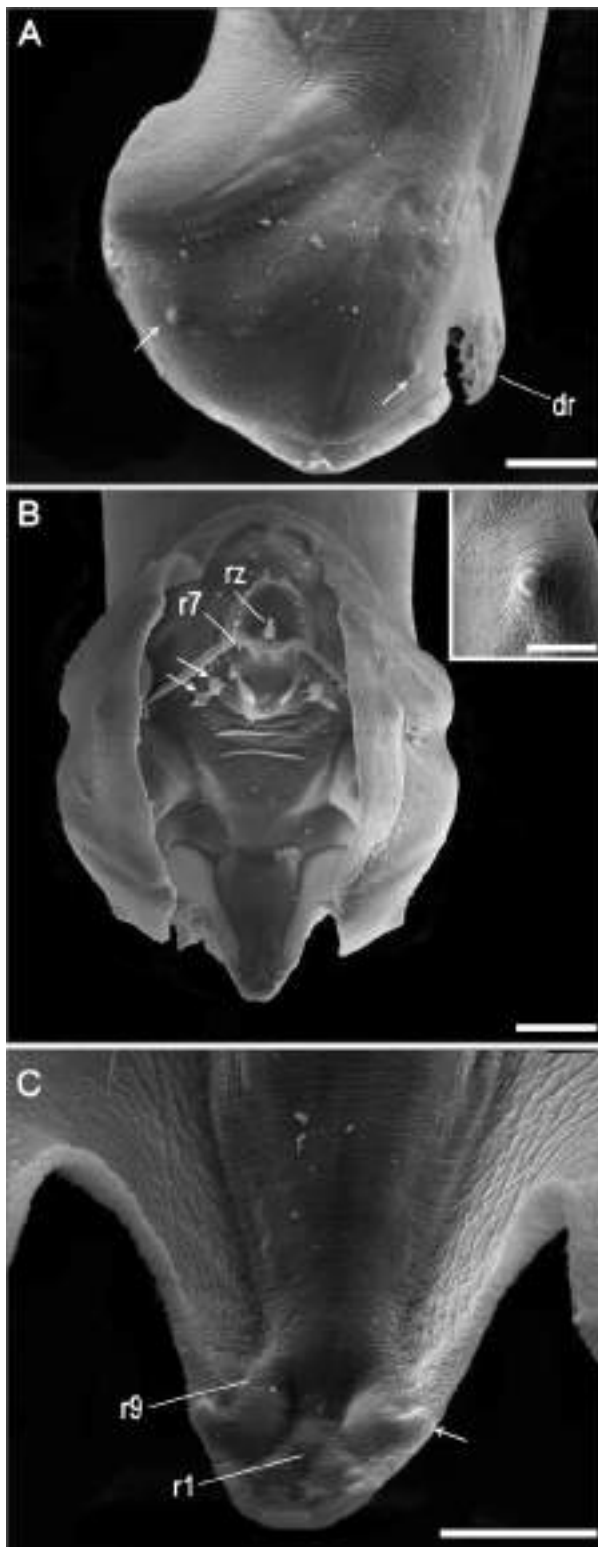


Fig. 4. *Oswaldocruzia chambrieri*, scanning electron photomicrographs. **A** – Lateral view of posterior region of male, showing rays 2–6 and 8 supporting caudal bursa, two bursal papillae (arrows) and dorsal ray (dr). **B** – Ventral view of caudal bursa evidencing genital cone, rays 7 (r7), and zero (rz) and two papillae (arrows). Inset. Details of bursal papillae. **C** – Details of the dorsal lobe with rays 9 (r9) with papilla (arrow) and ray 10 (r10). Scale-bars: A, B = 20 μm , C = 10 μm

pendent origin. Origin of ray 8 running parallel to ray 6, except distally and not reaching bursal margin, but ending in a dorsal papilla in bursa (Fig. 1D, 4A). Dorsal ray ending with a small pair of papillae (Fig. 4C). Genital cone well developed; ray zero present at anterior margin, with a small anterior projection and flanked by rays 7. Two pairs of ventral bursal papilla anterior to genital cone (Fig. 4B). Right spicule 181.56 ± 8.59 (174–193) and left spicule 181.22 ± 8.76 (171–192) long, both divided proximally in 3 branches: shoe spoon-like, blade divided distally in 6 processes and fork divided in posterior third occupying about 23% of spicule length.

Female (based on 9 specimens). Length 7.97 ± 1.29 (6.93–11) mm. Approximately 21 longitudinal crests at esophagus level and 33 at mid body level (Fig. 2B, 2C). Cephalic vesicle length 65.11 ± 5.42 (61–72). Nerve ring 168.89 ± 10.08 (152–184), excretory pore 291 ± 29.92 (256–344) and deirids at 312.44 ± 35.91 (277–371) from apex respectively. Esophagus length 479 ± 19.81 (440–504). Excretory pore-esophagus ratio 0.61 ± 0.06 (0.53–0.71). Width at midbody 168.89 ± 17.55 (147–187). Vulva, with dorsal lip prominent, with transverse semilunar shape, at 2.34 ± 0.22 (2.7–2.04) mm from de apex. Vagina vera length 109.56 ± 16.75 (139–93). Ovojector divided in vestibule 379.22 ± 39.48 (326.66–389.33) length, anterior and posterior sphincters 40.78 ± 9.55 (21–53) and 35.11 ± 8.96 (24–56) length; and anterior and posterior infundibula 40.44 ± 6.86 (34–53) and 43.22 ± 6.72 (34–53) length respectively (Fig. 2D). Tail length 121.22 ± 9.73 (105–138) and width at anus level 67.11 ± 11.46 (58–93) ending with cuticular spine 15.44 ± 4.59 (12–24), phasmids, circular, with prominent border (Fig. 2E, 3G, 3H). Eggs in morula stage 41.78 ± 2.28 (38–44) \times 71.22 ± 2.33 (67–74).

Discussion

The nematodes described here possess a club-shaped esophagus, a cephalic vesicle divided into two portions, a cuticle with fine transverse striations and longitudinal low ridges along the body without chitinous support that constitute the synlophes. Males are devoid of gubernaculum and have robust spicules divided into three parts that are surrounded by a hyaline membrane. The caudal bursa is supported by rays in a 2-1-2 pattern and has triangular dorsal lobe. Females have an amphidelphic uterus, a vulva located in the posterior half of the body, and a tapered tail ending with a cuticle spine. Based on the findings of Vicente *et al.* (1991) and Anderson *et al.* (2009), these morphological features allowed us to assign the species to the genus *Oswaldocruzia*.

Oswaldocruzia species are divided into five groups that are characterized by spicule morphology and distribution region. Morphologically, the species within each group are extremely similar. However, the morphologies of the caudal bursa and the male spicules are the important morphological characters that contribute to specific diagnoses of these helminths (Ben Slimane *et al.* 1996).

Table 1. Comparison of selected characteristics of male specimens of *Oswaldocruzia chambrieri* found parasitizing *Rhinella margaritifera* from Brazil and Neotropical species presenting type III bursa

Species	Host Group	Length (mm)	Ex-pore-eso ratio	Cervical alae	Synlophe at mid-body	Spicules length (µm)	Blade morphology	Reference
<i>Oswaldocruzia chambrieri</i>	Bufoiidae	4–6	0.67	Absent	41 ridges	174–193	5 processes	Present Study
<i>O. albareti</i>	Hylidae Leptodactylidae	7.75	1.03	Absent	36–43 ridges	190	4 processes	Ben Slimane and Durette-Desset, 1996
<i>O. anolisi</i>	Polychrotidae Teiidae Tropiduridae	8.01–8.68	0.48	Present	38–45 ridges	183–206	Numerous processes	Barus and Coy Otero, 1968
<i>O. binae</i>	Polychrotidae	7.1	0.72	Absent	35–44 crests	190	Bifurcate, with numerous small processes	Ben Slimane and Durette-Desset, 1996
<i>O. brevispicula</i>	Leptodactylidae	2.56–2.68	0.39	Present	indistinct	93	3 processes	Moravec and Kaiser, 1995
<i>O. cassonei</i>	Leptodactylidae	4.2	0.55	Absent	30–35 ridges	125	Spatulate	Ben Slimane and Durette-Desset, 1996
<i>O. chabaudi</i>	Hylidae	6.9	0.79	Absent	32–43 ridges	175	5 processes	Ben Slimane and Durette-Desset, 1996
<i>O. chambrieri</i>	Bufoiidae	5.4	0.62	Absent	40–49 ridges	190	5–7 processes	Ben Slimane and Durette-Desset, 1993
<i>O. jeanbarrii</i>	Leptodactylidae Polychrotidae	8.85	0.65	Present	50 ridges	185	Numerous processes	Ben Slimane and Durette-Desset, 1995
<i>O. lenteixeirai</i>	Hylidae Leptodactylidae	7.5–8	0.6	Absent	31–38 ridges	160–170	Numerous processes	Perez-Vigueras, 1938
<i>O. petterae</i>	Leptodactylidae	5	0.7	Absent	26–30 ridges	140	6 processes	Ben Slimane and Durette-Desset, 1996
<i>O. subauriacularis</i>	Bufoiidae Leptodactylidae	8.2–9.6	0.82	Present	51 ridges	190–205	8 processes	Travassos, 1917
<i>O. taranchoni</i>	Bufoiidae	6.45	0.91	Absent	Not stated	175	Spatulate	Ben Slimane and Durette-Desset, 1995
<i>O. tcheptrakovae</i>	Leptodactylidae	3.65	0.62	Absent	Smooth	130	Bifurcate	Ben Slimane and Durette-Desset, 1996

Among the 41 Neotropical species of the genus, the *Oswaldocruzia* found in the present study has a type III caudal bursa. Among the 13 congeners with a type III bursa, this nematode differs from *O. anolisi*, *O. brevispicula*, *O. jeanbarti* and *O. subauricularis* due to the absence of cervical alae; from *O. bainae*, *O. cassonei*, *O. chabaudi*, *O. taranchoni* and *O. tcheprakovae* due to the length and morphology of the spicules; and from *O. albareti* and *O. petterae* due to the number of ridges at the midbody, total body length and the excretory pore-esophagus ratio. This species is closely related to *O. chambrieri* with respect to morphologic characters and morphometry (Table I).

In the present study, using light microscopy, we also observed that the analyzed specimens have a pair of internal bursal papillae and that ray 4 has a medial groove. The presence of a medial groove in ray 4 has also been observed in another Molineidae nematode species by Feitosa *et al.* (2015). This character could be present in all species of the family and should be added to diagnostic traits for the family; however, detailed studies of these species are necessary.

SEM revealed ultrastructural features of the nematodes, allowing us to observe taxonomically relevant details for the genus that cannot be seen using light microscopy (Feitosa *et al.* 2015; Santos *et al.* 2008). In the present study, we utilized SEM analysis to confirm the structure of the oral opening and the papilla distribution as well as the shape of the excretory pore, the deirids and the longitudinal cuticular ridges along the body. In addition, we confirmed the disposition of the bursal rays and the presence of dorsal bursal papillae.

The examined species is the third *Oswaldocruzia* species observed using SEM. Santos *et al.* (2008) described ultrastructural features of various structures, such as cuticular ridges, cephalic structures, deirids, the rays and papillae of the caudal bursa (which were characterized in detail), the genital cone of males, and the corresponding rays, as potentially representative of the genus; these researchers also indicated the discontinuous nature of the longitudinal ridges along the body, which resulted in varying numbers of ridges. Feitosa *et al.* (2015) also observed this variation in a species of nematode from a different genus in the Molineidae family; thus, we emphasize that this feature is not consistently observed among *Oswaldocruzia* species alone and must therefore be carefully analyzed before being included as a taxonomic character.

The results of molecular analysis suggest that the relationship between *O. chambrieri* of the present study and *Oswaldocruzia* sp. parasite of *Trachycephalus venulosus* might be hardly established because of the absence of molecular information on other species from Neotropics and from related hosts, as well as on the morphology of *Oswaldocruzia* sp.

Thus, the present study represents the first report of *O. chambrieri* in Brazil, the third *Oswaldocruzia* species observed by SEM, the second sequence deposited for this genus and the first such sequence for which the species has been identified.

Acknowledgements. We are grateful to Dra. Elane Guerreiro Giese from the Laboratory of Animal Embriology and Histology from the Universidade Federal da Amazônia, Belém for their technical support with the SEM analyses. Financial support for this study was provided by the PROPESP/PPGBAIP/UFPA, CAPES Foundation, the Ministry of Education of Brazil (grant CAPES–PARASITOLOGIA BÁSICA/2010), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grants SISBiota 2010-Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade, PVE CAPES/CNPq A_033/2013; CNPq Research grant productivity of JNS; scientific initiation research fellowship to YWOC). This study is part of the monograph of the first author presented at Federal University of Pará, Brazil.

References

- Anderson C.R., Chabaud G.A., Willmott S. 2009. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates, Archival Volume London: Cab International
- Barus V., Coy Otero A. 1968. *Freitasia teixerai* gen. n., sp. n. and other nematodes parasitizing *Anolis equestris* (Squamata: Iguanidae). *Folia Parasitologica*, 15, 41–45
- Ben Slimane B., Chabaud A.G., Durette-Desset M. 1996. Nematodes Trichostrongylidae parasites of amphibians and reptiles: taxonomic, phylogenetic and biogeographic problems. *Systematic Parasitology*, 35, 179–206. DOI: 10.1007/BF00009639 (In French)
- Ben Slimane B., Durette-Desset M.C. 1993. Four new species of *Oswaldocruzia* Travassos, 1917 (Nematoda: Trichostrongylidae) parasites of Ecuador Amphibians. *Revue Suisse de Zoologie*, 100, 113–136. 9 (In French)
- Ben Slimane B., Durette-Desset M.C., Chabaud A.G. 1995. Speciation events in *Oswaldocruzia* (Nematoda: Trichostrongylidae Molineidea) of Guadeloupe Lizards parasites. *Parasite*, 2, 373–383 (In French)
- Campião K.M., Morais D.H., Dias O.T., Aguiar A., Toledo G., Tavares L.E.R., Da Silva R.J. 2014. Checklist of helminth parasites of amphibians from South America. *Zootaxa*, 3843, 1–93. DOI: 10.11646/zootaxa.3843.1.1
- Dos Santos S.P., Ibáñez R., Ron S.R. 2015. Systematics of the *Rhinella margaritifera* complex (Anura, Bufonidae) from western Ecuador and Panamá with insights in the biogeography of *Rhinella alata*. *ZooKeys*, 501, 109–145. DOI: 10.3897/zookeys.501.8604
- Feitosa L.A., Furtado A.P., dos Santos J.N., Melo F.T. 2015. 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*, 92, 251–259. DOI: 10.1007/s11230-015-9600-1
- Frost D.R. 2014. Amphibian Species of the World: An Online Reference, Version 6.0. American Museum of Natural History, USA. Available at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.html>. Archived by WebCite at <http://www.webcitation.org/6RVXmH2Ls> on 31 March 2015
- Guerrero R. 2013. Two new species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Trichostrongylina: Molineoidea) parasites of the cane toad *Rhinella marina* (Amphibia: Anura) from Peru. *Acta Parasitologica*, 58, 30–36. DOI: 10.2478/s11686-013-0103-4
- Lavilla E.O., Caramaschi U., Langone J.A., Pombal Jr. J.P., De Sá R.O. 2013. The identity of *Rana margaritifera* Laurenti, 1768 (Anura, Bufonidae). *Zootaxa*, 3646, 251–264. DOI: 10.11646/zootaxa.3646.3.4
- Moravec F., Kaiser H. 1995. Helminth parasites from West Indian frogs, with descriptions of two new species. *Caribbean Journal of Science*, 31, 252–268

- Moravec J., Cusi J.C., Córdova J.H., Gvoždík V. 2014. A new species of the *Rhinella margaritifera* species group (Anura, Bufonidae) from the montane forest of the Selva Central, Peru. *ZooKeys*, 371, 35–56. DOI: 10.3897/zookeys.371.6580
- Pérez-Vigueras I. 1938. Notes on some new parasitic nematodes of Cuba. *Livro Jubilar de Travassos*, 501–508 (In Spain)
- Prosser S.W., Velarde-Aguilar M.G., León-Règagnon V., Hebert P.D. 2013. Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources*, 13, 1108–1115. DOI: 10.1111/1755-0998.12082
- Santos J.N., Giese E.G., Maldonado Jr. A.J., Lanfredi R.M. 2008. A new species of *Oswaldocruzia* (Molineidae: Nematoda) in *Chaunus marinus* (Amphibian: Bufonidae) (Linnaeus, 1758) from Brazil. *Journal of Parasitology*, 94, 264–268. DOI: 10.1645/GE-1336.1
- Svitin R., Kuzmin Y. 2012. *Oswaldocruzia duboisi* (Nematoda, Molineidae): morphology, hosts and distribution in Ukraine. *Vestnik Zoologii*, 46, 195–203. DOI: 10.2478/v10058-012-0017-x
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673
- Travassos L. 1917. Trichostrongylidas brazileiras (5a Nota previa). *Brasil Medico*, 31, 1–4
- Vicente J.J., Rodrigues H.O., Gomes D.C., Pinto R.M. 1991. Nematodes in Brazil 2nd part: Amphibian Nematodes. *Revista Brasileira de Zoologia*, 7: 549–626 (In Portuguese)

Received: March 1, 2016

Revised: March 28, 2016

Accepted for publication: March 31, 2016