

ESTUDO MORFOBIOLÓGICO DE LARVAS NO PERÍODO PRÉ-PARASITÁRIO DE *GAIGERIA PACHYSCELIS* RAILLIET & HENRY, 1910 (NEMATODA: ANCYLOSTOMATIDAE).

ADJAIR ANTONIO DO NASCIMENTO*
PAULO DE TOLEDO ARTIGAS**
ISAÚ GOUVEIA ARANTES*

RESUMO

Em ovos de *Gaigeria pachscelis* naturalmente eliminados, incubados em água destilada "desionizada" (pH 6,0) em placas de Petri, mantidos a temperatura aproximada de 26°C, observamos a eclosão larvar, à partir de 68 horas; a maioria (97,16%) eclodiu entre 92 a 100 horas de incubação. Os ovos incubados em água destilada (pH 6,5) e matidos nas mesmas condições da "cultura" anterior, verificamos a eclosão após 90 horas de incubação; a maioria (93,93%) eclodiu entre 108 e 116 horas. Em cultura de 6420 ovos obtidos através de oviposição de fêmeas "in vitro", também em água destilada (pH 6,0) e mantidos a temperatura de 26°C, a eclosão foi observada a partir de 66 horas; a maioria das larvas (70,5%) eclodiu entre 88 a 100 horas de incubação. A incubação de ovos do nematódeo em tela em água destilada mostrou-se ser promissora, uma vez que é de baixíssimo custo, altamente prático e as larvas obtidas não precisaram ser extraídas por métodos convencionais além disso, revelaram-se viáveis quando das infestações. Em 137 larvas examinadas logo após a eclosão, 135(98,5%) apresentaram descolamento cuticular em uma das extremidades e portanto podem ser consideradas como larvas de 2º estágio de desenvolvimento. Larvas infestantes (3º estágio) foram evidenciadas nas culturas, a partir do 5º dia de incubação.

Palavras-chave: *G. pachscelis*, ciclo evolutivo, morfobiologia, larvas.

1. INTRODUÇÃO

RAILLIET & HENRY⁶, em 1910, erigiram o gênero *Gaigeria*; descreveram a oportunidade *G. pachscelis*, com material oriundo de ovinos e bovinos da Índia e da África.

ORTLEPP^{3, 4} obteve desenvolvimento do nematódeo em apreço, de ovo a adulto maduro, utilizando ovinos como hospedeiros. Verificou em ovos incubados em carvão animal, ou fezes esterilizadas, ou ainda água destilada, mantidos à temperatura de aproximadamente 26°C, que a maioria das larvas eclodiam após 36 a 40 horas; atingiam o 3o. estágio aos 8 dias de "cultura" em condições adequadas de aeração, umidade e alimentação.

ORTLEPP⁵ estudou o ciclo biológico de *Bunostomum trigonocephalum* (Rudolphi, 1808), tendo ovinos como hospedeiros. Observou a eclosão de larvas a partir de 24 horas, em condições adequadas de umidade, aeração e temperatura. Verificou, ainda, que as larvas atingem o estágio infestante após 5 a 8 dias de incubação.

SPRENT⁷ obteve desenvolvimento de *Bunostomum phlebotomum* (Railliet, 1900), de ovo a adulto, tendo bovinos como hospedeiros. Verificou o autor que a eclosão de larvas ocorre após 32 a 40 horas de incubação; que as

mesmas atingem o estágio infestante em cerca de 5 dias de "cultura", à temperatura de 21 a 27°C.

ANSARI & SINGH² observaram o efeito de diferentes temperaturas e da umidade relativa sobre o desenvolvimento e eclosão de larvas infestantes de *G. pachscelis*. Constataram ainda os referidos autores, que a temperatura ótima, para o desenvolvimento de larvas até o estágio infestante, é de 26 a 27°C, com umidade relativa de 95 a 100%.

ARANTES¹ obteve desenvolvimento de ovo a adulto jovem de *G. pachscelis*, utilizando caprinos como hospedeiros. Verificou, o referido autor, que a eclosão de larvas ocorria após 62 horas de incubação, à temperatura de 26°C; que o estágio infestante é atingido após 6 dias, à temperatura acima citada.

A importação, no Brasil, de ruminantes domésticos de médio porte, possivelmente oriundos da Índia e África, deve ter sido responsável pela introdução de *G. pachscelis*, no Estado de São Paulo. Tal suposição tem suporte na circunstância da alta prevalência do nematódeo em caprinos e ovinos naquelas duas áreas geográficas.

A preocupação primordial, na realização deste trabalho, é a discussão de algumas controvérsias pertinentes à biolo-

gia de *G. pachyscelis*: período decorrido até a eclosão de larvas; estudo morfológico de larvas recém-eclodidas; verificação do tempo decorrido, para o aparecimento de larvas infestantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de ovos

Os ovos de *G. pachyscelis*, para a obtenção de larvas, foram colhidos em fezes de caprino sem raça definida, com idade aproximada de 10 meses, infestado experimentalmente e com cerca de 4 meses de período de patência.

Diariamente as fezes do caprino doador eram recebidas em sacos coletores, a partir de 7 horas até às 18 horas e recolhidas de 2 em 2 horas. As fezes obtidas eram submetidas à técnica de Willis-Mollay, durante um período de tempo aproximado de 15 minutos; a seguir as lâminas eram mergulhadas em cálice de decantação, contendo aproximadamente 400 ml de água destilada, nele permanecendo durante 40 minutos.

Depois, desprezava-se o sobrenadante e acrescentava-se água destilada (aproximadamente 400ml), aguardando-se mais 40 minutos para decantação de ovos. Repetia-se esta operação por mais duas vezes, com o propósito de lavar os ovos.

Foram também obtidos ovos naturalmente eliminados por fêmeas do nematódeo, mantidas em água destilada à temperatura aproximada de 37°C, durante 2 a 4 horas.

Estas fêmeas, antes de serem submetidas à observação "in vitro", eram lavadas três vezes com água destilada morna.

2.2. Cultura dos ovos

Os ovos de *G. pachyscelis* assim obtidos eram transferidos para placas de Petri, ou placas de hemoaglutinação, contendo fina camada de água destilada, mantidas à temperatura aproximada de 26°C.

As culturas foram examinadas a cada 8 horas, com o propósito de acompanhar o desenvolvimento larvar até a sua eclosão.

As larvas recém-eclodidas eram imediatamente submetidas ao exame microscópico, para estudo morfológico.

Diariamente, a partir das primeiras eclosões, foram colhidas amostragens de 100 larvas, sempre na mesma hora em que foi retirada a primeira amostragem, até o 8o. dia de incubação; essas larvas foram fixadas em formol a 3% (temperatura mais ou menos de 60°C), para estudos ulteriores.

De cada estágio larvar, foram tomadas medidas de 10 larvas (comprimento do corpo e do esôfago, largura do corpo e do esôfago e outras medidas).

3. RESULTADOS

Deixamos de apresentar dados morfológicos de larvas de 1o. estágio; não tivemos condições para seu estudo. Conseguimos apenas oito larvas L₁; estas, muito frágeis,

estavam rotas ou em má condição para sua análise anômica.

3.1. Eclosão de larvas

Em ovos naturalmente eliminados, incubados em água destilada "desionizada" (pH 6,0), em placa de Petri, mantidos à temperatura aproximada de 26°C, observamos a eclosão larvar, a partir de 68 horas; a maioria (97,16%) eclodindo entre 92 a 100 horas de incubação (Quadro 1). Na "cultura", após 120 horas de incubação, verificamos, em 600 ovos utilizados, que houve 97,66% de eclosões; em apenas de 2,4% dos ovos não foi evidenciado qualquer desenvolvimento larvar e os consideramos estéreis.

Em 412 ovos incubados em água destilada não "desionizada" (pH 6,5) e mantidos nas mesmas condições da cultura anterior, verificamos a eclosão de 4 larvas, após 90 horas; a maioria (93,93%) eclodiu entre 108 e 116 horas (Quadro 1). O exame desta cultura, após 120 horas de incubação, demonstrou a ocorrência de 93,93% de eclosões.

Ovos naturalmente eliminados, incubados em água destilada desionizada (pH 6,0), em placas de hemoaglutinação, contendo 10 a 20 em cada compartimento, mantidos em condições idênticas, a eclosão larvar foi constatada a partir de 69 horas e a maioria das larvas (71,92%) eclodiu entre 100 e 108 horas (Quadro 1).

Em cultura de 6420 ovos obtidos através de oviposição de fêmeas "in vitro", também em água destilada (pH 6,0), contidos em placas de Petri e mantidos à temperatura de 26°C, a eclosão foi observada a partir de 66 horas de incubação e a maioria das larvas (70,50%) eclodiu entre 88 a 100 horas. Nesta cultura, com aproximadamente 120 horas de incubação, foram observadas 70,5% de eclosões; 1894 ovos (29,5%) foram considerados estéreis, por não terem apresentado sinais de desenvolvimento larvar.

Em 137 larvas, desenvolvidas em ovos colhidos nas fezes e examinadas imediatamente após a eclosão, verificamos o seguinte: em 25 larvas eclodidas após 72 horas, 12 larvas eclodidas após 80 horas e 100 larvas eclodidas após 84 horas, estava presente e deslocada do corpo a cutícula da L₁ em 135 delas, isto é, em 98,5% do total; apenas 2 larvas (1,5%) ainda estavam na fase L₁.

De 100 larvas oriundas de ovos ovipostos "in vitro", após 94 horas de incubação e examinadas 8 horas após a eclosão, eram L₂ 94 larvas (94%); entretanto, 6 larvas (6%) estavam no estágio L₃.

Fato curioso e digno de nota foi o seguinte: sempre nas mesmas condições já assinaladas, num lote de 100 larvas, após 100 horas de incubação e 16 horas pós-eclosão, todos os exemplares estavam em fase L₃; o outro lote, também de 100 larvas, nas mesmas condições, após 112 horas de incubação e 24 horas pós-eclosão, apresentavam 36 larvas L₂ e 64 larvas L₃.

Noutra verificação, após 120 horas de incubação e 32 horas pós-eclosão, verificamos 59 larvas L₂ e 41 larvas L₃. Em outro lote de 100 larvas, decorridas 128 horas de incubação e 44 horas de pós-eclosão verificamos exclusivamente larvas L₃.

3.2. Estudo morfológico de larvas do 2o. estágio.

Em 137 larvas examinadas logo após a eclosão, 135 (98,5%) apresentaram deslocamento cuticular nas extremidades, mais acentuado na extremidade posterior (Figs. 1 e 2). Certamente, tais larvas devem ser consideradas larvas L₂. Estas larvas podem ser descritas da seguinte forma: corpo com extremidades afiladas, sendo o afilamento da posterior mais acentuado. A largura do corpo aumenta paulatinamente desde a extremidade anterior, para atingir a largura máxima na porção compreendida entre o final do esôfago e o primórdio genital. Desta forma, em toda a extensão posterior há o afilamento progressivo até a altura do ânus. Na porção caudal o estreitamento é mais evidente, sendo a extremidade arredondada (Fig. 2). Esôfago com ligeira dilatação na sua porção terminal (Fig. 1). Anel nervoso e poro excretor, situam-se depois da porção mediana do esôfago.

No interior do corpo observam-se numerosas granulações opacas, que deixam de aparecer nas duas extremidades.

O comprimento e a largura do corpo e do esôfago e demais medidas, obtidas de 10 larvas L₂, estão apresentadas no quadro 2.

3.3. Estudo morfológico de larvas do 3o. estágio

As seguintes referências são de larvas antes da penetração no hospedeiro. Apresentam-se envolvidas pela cutícula do 2o. estágio larvar, à semelhança de outros Strongyloidea (Fig. 4). São dotadas de longa bainha caudal que facilita a adesão entre elas, ou a substratos sólidos eventualmente presentes e, também, ao fundo da placa de Petri. Desde a eclosão até atingirem o estágio L₃, as larvas mostram discreto aumento no seu comprimento.

As larvas L₃ também apresentam no pseudo-celoma granulações opacas, semelhantes às observadas em larvas L₂. A abertura oral é um pequeno orifício e liga-se ao esôfago por meio de curto vestibulo. Esôfago com dilatação no terço posterior, porém mais pronunciada do que a observada nas larvas L₂ (Fig. 3). Anel nervoso e poro excretor situados na porção mediana do esôfago. O comprimento e a largura do corpo e do esôfago e outras dimensões estão assinaladas no Quadro 2.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

ORTLEPP⁴ observou a eclosão da maioria das larvas de *G. pachyscelis*, entre 36 a 48 horas de cultura de ovos em carvão animal úmido ou fezes esterilizadas e mantidos à temperatura de 26°C.

Por outro lado, o período de tempo de incubação, necessário para a ocorrência da eclosão da maioria das larvas do gênero *Bunostomum*, observado por ORTLEPP⁵ em *B. trigonocephalum* e por SPRENT⁷ em *B. phlebotomum*, coincide com os resultados obtidos por ORTLEPP em *G. pachyscelis*.

ARANTES¹ verificou em ovos oriundos de oviposição "in vitro", mantidos em água destilada à temperatura de 26°C, que a eclosão da maioria das larvas ocorrera após

decorridas 80 horas de incubação.

ANSARI & SINGH² observaram que ovos mantidos à temperatura de 26 a 27°C e em meio úmido (umidade relativa de 100%), algumas larvas eclodiram após 24 horas, mas a maioria delas somente após decorridas 26 a 40 horas de incubação.

Nossas observações neste particular, divergem daquelas de ORTLEPP⁴ e de ANSARI & SINGH², assemelhando-se em parte às obtidas por ARANTES², quanto ao período de tempo necessário para a eclosão de larvas em água destilada e mantidas à temperatura de 26°C.

Verificamos que a maioria das larvas eclodiam a partir de 92 a 100 horas de incubação, com ovos naturalmente eliminados, e a partir de 88 a 100 horas com ovos oriundos de oviposição "in vitro".

ANSARI & SINGH² fizeram observações sobre o desenvolvimento e eclosão de larvas em diferentes temperaturas e diferentes "níveis" de umidade relativa; verificaram que à temperatura de 26 a 27°C e umidade relativa de 100%, obtiveram no máximo 38% de eclosão de larvas até o 8o. dia de incubação.

Nossas observações com ovos incubados em água destilada, com pH variando de 6,0 a 6,5, à temperatura aproximada de 26°C, divergem das obtidas por ANSARI & SINGH, uma vez que obtivemos de 70,5% a 97% de eclosões em ovos incubados e examinados no 5o. dia de incubação.

As larvas recém-eclodidas encontravam-se no primeiro estágio de desenvolvimento de acordo com os resultados apresentados por ORTLEPP⁵ e ANSARI & SINGH². Nossas constatações neste particular divergem em parte das observações descritas por ORTLEPP⁴ e das de ANSARI & SINGH², uma vez que verificamos a ocorrência de apenas 8 larvas do 1o. estágio de desenvolvimento (L₁).

Por outro lado, ORTLEPP⁴ verificou que larvas contidas no interior dos "ovos" mantidos à temperatura inferior a 20°C e eclodidas artificialmente no 6o. dia de incubação, encontravam-se no 2o. estágio de desenvolvimento; ARANTES¹ também observou fato similar tanto em larvas recém-eclodidas após decorridas 80 horas de incubação à temperatura de 26°C, como naquelas artificialmente liberadas das cascas dos ovos" após 48 horas de cultura à mesma temperatura.

Com relação à possibilidade de eclosão das larvas do 2o. estágio de desenvolvimento, nossas observações assemelham-se aos dados fornecidos por aqueles dois autores, uma vez que a maioria das larvas por nós estudadas encontravam-se naquele estágio evolutivo; parece-nos que esta muda no interior da "casca do ovo" seja função biológica própria e dependente do tempo de incubação.

Quanto ao período de tempo necessário para o aparecimento de larvas infestantes, as opiniões dos autores que estudaram o assunto são: ORTLEPP⁴ verificou que larvas cultivadas à temperatura de 26°C, atingem o estágio infestante aos 8 dias de incubação, em condições adequadas de alimentação e umidade relativa.

ARANTES¹ obteve larvas infestantes à partir do 6o. dia de incubação de ovos em água destilada e temperatura aproximada de 26°C.

ANSARI & SINGH² obtiveram 3% de larvas infestantes aos 5 dias de incubação de ovos de *G. pachyscelis* e aos 8 dias 25,8%, quando incubados à temperatura de 26 a 27°C e 100% de umidade relativa.

Nossos resultados, neste particular, diferem dos obtidos por ORTLEPP; divergem levemente dos dados apresentados por ANSARI & SINGH e assemelham-se aos apresentados por ARANTES, embora nós obtivéssemos até 100% de larvas do 3o. estágio no 5o. dia de incubação e aquele autor

não menciona a prevalência das referidas larvas naquele período de tempo.

O período de tempo de incubação necessário para que larvas de *Bunostomum trigonocephalum* atinjam o estágio infestante, de acordo com ORTLEPP⁵ foi de 5 dias; SPRENT⁷ obteve larvas infestantes de *B. phylebotomum* aos 5 dias de incubação. Nossas constatações, obtidas em *G. pachyscelis* aproximam das descritas pelos autores citados, para as duas espécies de *Bunostomum* parasitas de animais domésticos.

Quadro 1 – Número de larvas de *G. Pachyscelis* oriundas de ovos, obtidos de fêmeas submetidas à oviposição "in vitro" e naturalmente eliminados, incubados à temperatura de 26°C.

| n. de ovos incubados | | 6420 | 552 | 600 | 412 | | | | |
|----------------------|------------|--|---|---|--|-----|-------|-----|-------|
| Horas de incubação | "Culturas" | H ₂ O dest. (pH6,0) em Placa de Petri | H ₂ O dest. deionizado (pH6,0) em Placa H.I. | H ₂ O dest. deionizada (pH6,0) em Placa de Petri | H ₂ O dest. (pH6,5) em Placa de Petri | | | | |
| | | Larvas eclodidas | %* Larvas eclodidas | %* Larvas eclodidas | %* Larvas eclodidas | %* | | | |
| 60 – 68 | | 2 | 0,031 | | | | | | |
| 68 – 76 | | 30 | 0,46 | 4 | 0,66 | | | | |
| 76 – 84 | | 42 | 0,65 | 4 | 26,16 | | | | |
| 84 – 92 | | 1284 | 20,0 | 4 | 46,00 | | | | |
| 92 – 100 | | 4526 | 70,5 | 201 | 96,83 | 4 | 0,97 | | |
| 100 – 108 | | 4526 | 70,5 | 397 | 71,92 | 583 | 97,16 | 126 | 30,58 |
| 108 – 116 | | 4526 | 70,5 | 435 | 78,80 | 583 | 97,16 | 387 | 93,93 |
| 116 – 124 | | 4526 | 70,5 | 500 | 90,57 | 586 | 97,16 | 387 | 93,93 |
| 124 – 132 | | 4526 | 70,5 | 502 | 90,94 | 586 | 97,66 | 387 | 93,93 |
| 132 – 140 | | 5426 | 70,5 | 505 | 91,48 | 586 | 97,66 | 387 | 93,93 |

* – Em relação ao número total de ovos incubados.;

QUADRO 2 – Medidas (mm) de larvas do 2o. e 3o. estágio de *G. Pachyscelis*

| Estádio evolutivo | 2o. | | | 3o. | | |
|--------------------------------|-----------------------|-------|---------------|-----------------------|-------|---------------|
| | AMPLITUDE DE VARIAÇÃO | MÉDIA | DESVIO PADRÃO | AMPLITUDE DE VARIAÇÃO | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
| No. de larvas examinadas | | 10 | | | 10 | |
| Corpo | | | | | | |
| Comprimento | 0,500 – 0,569 | 0,543 | 0,018 | 0,523 – 0,577 | 0,559 | 0,020 |
| largura ¹ | 0,019 – 0,023 | 0,021 | 0,001 | 0,021 – 0,025 | 0,023 | 0,001 |
| Esôfago: | | | | | | |
| comprimento | 0,128 – 0,140 | 0,134 | 0,031 | 0,144 – 0,157 | 0,149 | 0,049 |
| largura ² | 0,009 – 0,012 | 0,010 | 0,001 | 0,009 – 0,012 | 0,010 | 0,001 |
| Anel nervoso ² | 0,066 – 0,087 | 0,074 | 0,066 | 0,083 – 0,103 | 0,089 | 0,005 |
| Poros excretor ² | 0,079 – 0,101 | 0,087 | 0,005 | 0,091 – 0,113 | 0,097 | 0,006 |
| Cauda: | | | | | | |
| comprimento | 0,031 – 0,060 | 0,049 | 0,012 | 0,052 – 0,066 | 0,057 | 0,005 |
| Bainha caudal | | | | | | |
| comprimento | 0,087 – 0,105 | 0,094 | 0,007 | 0,095 – 0,105 | 0,099 | 0,003 |
| Primórdio genital ² | 0,221 – 0,252 | 0,244 | 0,009 | 0,233 – 0,272 | 0,261 | 0,011 |

¹ Ao nível da junção esôfago-intestino

² Distância à extremidade anterior.

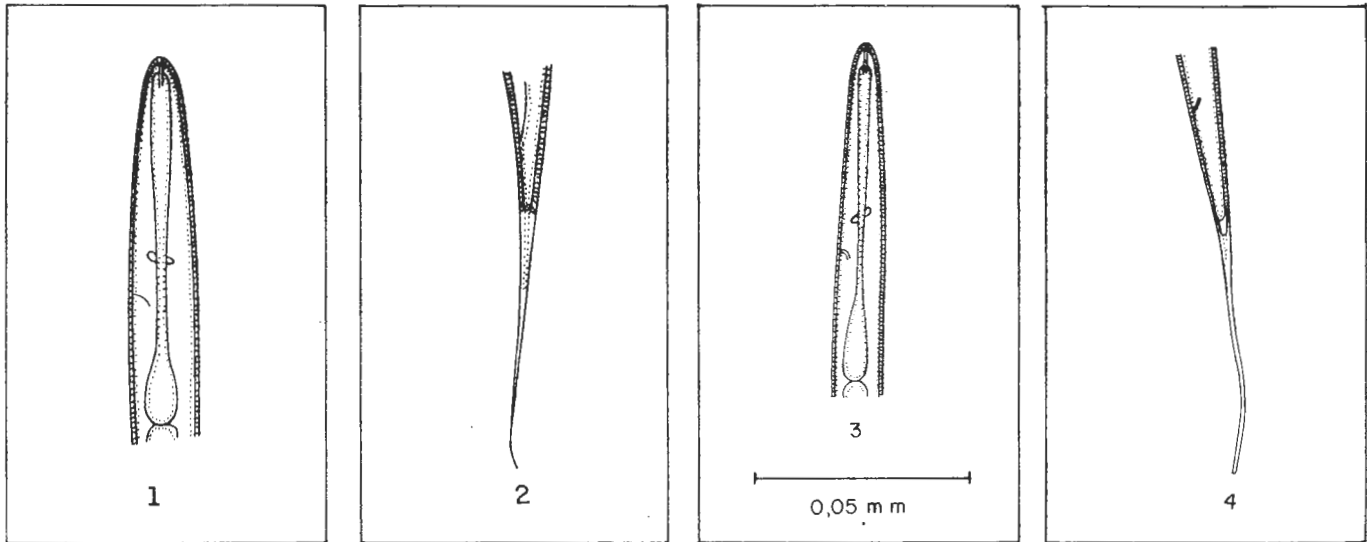


Fig. 1 - Extremidade anterior de larva do 2o. estágio, mostrando a cutícula do estágio anterior descolada do corpo.

FIG. 2 - Extremidade posterior de larva do 2o. estágio, com a cutícula do estágio anterior descolada do corpo.

FIG. 3 - Extremidade anterior de larva do 3o. estágio.

FIG. 4 - Extremidade posterior de larva do 3o. estágio mostrando duas cutículas distintas, descoladas do corpo.

ABSTRACT

Larval ecdision was observed in eggs of *Gaigeria pachyscelis* naturally eliminated, incubated in deionized distilled water (pH 6,5) in Petri dishes at 26°C been that the majority (97,16%) has ecdised between 92 to 100 hs of incubation. Eggs incubated in distilled water (pH 6,5) and kept at the same conditions of "culture" as previously it was observed eclosion after 90 hs of incubation; the majority (93,93%) ecdised between 108 to 116 hs. Culture of 6420 eggs obtained through female "in vitro" oviposition, under distilled water (pH 6,5) and kept at 26°C eclosion was observed after 66 hs of incubation; the majority of the larvae (70,5%) ecdised between 88 to 100 hs. The nematode eggs incubation on screen immersed in distilled water has shown promising results, since the cost is quite low, highly practical procedure and the resulting larvae do not need to be extracted by the conventional methods, show viability when tested for infectivity. On 137 larvae examined just after eclosion, 135 (98,5%) showed cuticular displacement on one extremity, and can be considered larvae belonging to the 2nd instar of development. Infesting larvae (3rd instar) were detected on the cultures after the 5th day of incubation.

Key words: *G. pachyscelis*, life cycle, morphological and biological, larvae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANTES, I.G. *Gaigeria pachyscelis* Railliet & Henry, 1910 (Nematoda: Ancylostomatidae). I. Estudo morfológico de machos e de fêmeas. II. Estudo morfológico de ovos, de larvas e de adultos jovens. São Paulo. Tese (Doutoramento) Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
- ANSARI, M.Z. & SINGH, K.S. On the incidence of *Gaigeria pachyscelis* Railliet & Henry, 1910 in sheep and goats. *Indian J. Anim. Sci.*, New Delhi, 51(4): 459-65, 1981.
- ORTLEPP, R.J. Preliminary note on the life-history of *Gaigeria pachyscelis* (Railliet & Henry, 1910), a hookworm of sheep, Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Industr., Pretoria, 3:347-9 1934.
- ORTLEPP, R. J. Observations on the morphology and life-history of *Gaigeria pachyscelis* Railliet & Henry, 1910. A hookworm parasite of sheep and goats. *Onderstepoort J. vet. Sci. Anim. Industr.*, Pretoria 8 (1) :193-212, 1937.
- ORTLEPP, R. J. Observations on the life-history of *Bunostomum trigonocephalum*, a hookworm of sheep and goats. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Industr.*, Pretoria, 12 (2) : 305-18, 1939.
- RAILLIET, A. & HENRY, A. Quelques helminthes nouveaux ou peu connus du groupe des Bunostomiens. *Bull. Soc. Path. exot.*, Paris, 3 : 311-5, 1910.
- SPRENT, J. F. A. Studies on the life-history of *Bunostomum phlebotomum* (Railliet, 1900), a hookworm parasite of cattle. *Parasitology*, London, 37(3/4): 192-201, 1946.