

FERNANDA MARA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO FUNGO PREDADOR DE NEMATÓIDE
Duddingtonia flagrans SOBRE LARVAS INFECTANTES DE *Ancylostoma
ceylanicum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

FERNANDA MARA FERNANDES

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO FUNGO PREDADOR DE NEMATÓIDE
Duddingtonia flagrans SOBRE LARVAS INFECTANTES DE
Ancylostoma ceylanicum

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 09 de agosto de 2011.

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin

Dr. Simão Pedro Fernandes Pereira

Prof. Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

“O Senhor é o meu pastor e nada me faltará.
Deitar-me faz em pastos verdejantes, guia-me
mansamente a águas tranquilas. Refrigera a
minha alma, guia-me nas veredas da justiça.”

Salmo 23.

A Deus.

Aos meus pais, Waldemar e Marlene.

Ao meu orientador, Jackson Victor.

Às minhas irmãs e amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser parte de minha vida e por mais essa grande conquista que a ele dedico.

Aos meus pais, Waldemar e Marlene, fonte inesgotável de amor, que sempre me apoiaram em todas as dificuldades.

Às minhas irmãs, Valéria, Greiciane, Paula e Ana Carolina, pelo carinho e força, sempre com palavras amigas nas horas difíceis.

À minha grande amiga Fátima Fazionato, por sempre ter me confortado com palavras amigas e orações.

À igreja Casa da Bênção e ao Pastor Vanderlei, por muitas das vezes ter feito o papel de minha família em Viçosa.

Ao Professor Jackson, pela orientação, oportunidade que me ofereceu.

Aos colegas de laboratório, Fábio, Juliana, Sebastião, Rogério, Manuel, Anderson, Tabela, Wendel e Ingrid, pela imensa ajuda em todas as horas, e colaboração nos trabalhos.

Às secretárias Rosi e Elizabeth (Beth), por sempre estarem disponíveis a ajudar em todas as horas.

À Bel (Izabel), pelo carinho que sempre demonstrou por mim.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia, José Geraldo e Ademir pela amizade e ajuda nos experimentos.

Aos amigos que conquistei no departamento, Ana Estela, Hanna, Lucas, Paulinho, Prof. Laércio, Odilon, Amara, Fernely, Paulo, Vinícius, Margareth, Geraldinho.

Ao Pedro Henrique, Professor Ricardo Fujiwara e toda sua equipe da Universidade Federal de Minas Gerais, pela enorme ajuda e colaboração oferecida durante meu experimento.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões na elaboração final deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDA MARA FERNANDES, filha de Waldemar Antônio Fernandes e Marlene do Carmo Bastos Fernandes, nasceu dia 21 de maio de 1981 em Cataguases – Minas Gerais.

Em 2005, graduou-se em Farmácia pela Faculdade Severino Sombra – RJ, em 2006, graduou-se em Farmácia - Bioquímica pela Universidade Federal de Juiz de Fora - MG.

Em janeiro de 2010 iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa-MG, submetendo-se a defesa de dissertação em agosto de 2011.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	2
2.2. Controle biológico.....	2
2.3. Fungos nematófagos.....	3
2.4. <i>Duddingtonia flagrans</i>	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
4. OBJETIVOS.....	10
CAPITULO 1 - Ação do fungo <i>Duddingtonia flagrans</i> sobre <i>Ancylostoma ceylanicum</i> em fezes de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	11
Resumo.....	12
Referências.....	17
CAPITULO 2 - Controle biológico <i>in vitro</i> de larvas infectantes de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	19
Resumo.....	20
1. Introdução.....	21
2. Material e métodos.....	22
2.1. Fungo.....	22
2.2. Larvas infectantes (L ₃) de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	22
2.3. Ensaio experimental.....	22
3. Resultados e discussão.....	24
4. Referências.....	27
CAPITULO 3 - Ação do fungo <i>Duddingtonia flagrans</i> em diferentes concentrações após a passagem pelo aparelho gastrointestinal de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com larvas infectantes de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	31
Resumo.....	32
1. Introdução.....	33
2. Material e métodos.....	34
2.1. Fungo.....	34
2.1.2. Produção de micélio fúngico.....	34

2.2. Animais.....	35
2.2.3. Obtenção de larvas infectantes de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	35
2.2.4. Infecção experimental de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) com larvas infectantes de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	35
2.2.5. Ensaio experimental.....	35
2.2.6. Análise estatística.....	36
3. Resultados e discussão.....	36
Referências.....	40
CONCLUSÕES GERAIS.....	44

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Pág.

Figura 1. Número médio de larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* não predadas recuperadas de coproculturas pelo método de Baermann após 7 dias de interação com o isolado fúngico *D. flagrans* (AC001) e do controle sem fungo.

17

CAPÍTULO 2

Figura 1- Médias e desvios padrão do número de larvas infectantes (L₃) de *Ancylostoma ceylanicum* não predadas recuperadas das placas de Petri pelo método de Baermann, em diferentes intervalos de exposição do isolado fúngico *Duddingtonia flagrans* (AC001) e no grupo controle (sem fungos). Asterisco denota diferença ($p < 0,01$). Teste de Tukey.

31

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Valores médios da contagem de ovos por gramas de fezes nas diferentes concentrações de micélio fúngico administradas aos animais do grupo tratado com o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) e no grupo controle sem fungo.

45

RESUMO

FERNANDES, Fernanda Mara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Avaliação da ação do fungo predador de nematóide *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*.** Orientador: Jackson Victor de Araújo. Co-orientador: Marcos Pessi Guimarães.

Ancylostoma ceylanicum é um nematoide gastrointestinal de cães e gatos, podendo parasitar o ser humano. Medidas alternativas que possam ser empregadas no combate à disseminação ambiental destes parasitos e suas formas infectantes são importantes, como o uso de antagonistas naturais de helmintos. O controle biológico com fungos nematófagos tem sido sugerido como uma alternativa para a redução desta e de outras infecções causadas por helmintos gastrintestinais. O gênero *Duddingtonia* se destaca pelo controle de nematoides no ambiente. *Duddingtonia flagrans* é considerada como a espécie mais promissora, devido à abundância de clamidósporos, que são estruturas de resistência. O presente estudo avaliou um isolado do fungo *D. flagrans* (AC001) *in vitro* quanto à capacidade de predação de larvas infectantes L₃ de *A. ceylanicum*, e sua eficácia na captura das larvas. Em seguida, foi avaliada a capacidade de suportar a passagem pelo trato gastrointestinal de hamsters, e habilidade de predação das larvas. Foi avaliada qual a dose do micélio seria mais eficaz na redução da infecção. Foram utilizados 50 hamsters que receberam por via oral 100 L₃ de *A. ceylanicum* e formados 5 grupos com 10 animais cada um, que receberam micélio fúngico por um período de 14 dias, a cada dois dias, sendo 4 grupos tratados com o fungo *D. flagrans* em diferentes concentrações: grupo 1 (0,04g); grupo 2 (0,08g); grupo 3 (0,16g); grupo 4 (0,32g) e o grupo controle que não recebeu esse tratamento. Os animais foram colocados em gaiolas separadas e, após o período de patência do *A. ceylanicum* (20 dias), a cada dois dias, 2g de fezes de cada grupo foram coletados das camas dos hamsters para posterior realização da contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Os resultados demonstraram que houve diferença ($p < 0,05$) na redução do OPG dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) na redução do OPG nos grupos tratados nas diferentes concentrações. Os resultados

do presente trabalho sugerem que o fungo *D. flagrans* poderia ser utilizado como uma ferramenta no controle biológico de *A. ceylanicum* em condições naturais.

ABSTRACT

FERNANDES, Fernanda Mara, M.Sc., Federal University of Viçosa, August, 2011. **Evaluation of the fungus nematode predator *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of *Ancylostoma ceylanicum*.** Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-advisers: Marcos Pessi Guimarães.

Ancylostoma ceylanicum is a gastrointestinal nematode of dogs and cats, can parasitize humans. Is important to use alternative ways that can be used to fighting the spread of these parasites and their environmental infective forms, such as the use of natural antagonists of nematodes. The biological control with nematophagous fungi has been suggested as an alternative to reduce this and other gastrointestinal infections caused by nematodes. The genus *Duddingtonia* stands out by control of nematodes in the environment. *Duddingtonia flagrans* is considered as the most promising species, due to the abundance of chlamydospores, which are structures of resistance. This study evaluated a fungus isolated from *D. flagrans* (AC001) *in vitro* for their ability to prey infective L3 larvae of *A. ceylanicum*, and its effectiveness in capturing larvae. Then, evaluated the ability to withstand the passage through the gastrointestinal tract of hamsters and ability to prey on the larvae. Was assessed on the dose of the mycelium would be more effective in relapse of the infection, were used 50 hamsters that received orally 100 L3 of *A. ceylanicum*. After, were formed five groups of 10 animals each, receiving fungal mycelia (25grams by weight) for a period of 14 days, every two days, and four groups treated with the fungus *D. flagrans* in different concentrations: group 1 (0.04 grams), group 2 (0.08 grams), group 3 (0.16 grams), group 4 (0.32 grams) and a control group that don't received this treatment. The animals were placed in separate cages and after the period of patency by *A. ceylanicum* (20 days) every two days, 2 grams of faeces from each group were collected from beds of hamsters for further proceed with the count of eggs per gram of feces (OPG).The results showed that there was difference ($p < 0.05$) in reduction of the OPG of treated groups when compared to the control group. There

was no difference ($p>0.05$) in reducing the OPG in the treated groups at different concentrations. The results of this study suggest that the fungus *D. flagrans* could be used as a tool in biological control of *A. ceylanicum* in natural conditions.

1. INTRODUÇÃO

O papel potencial dos animais de companhia como reservatórios de zoonoses tem sido reconhecido como um problema mundial de saúde pública significativo. *Ancylostoma ceylanicum* é a única espécie de ancilostomídeos conhecida por infectar seres humanos. Isto tem sido demonstrado experimental e naturalmente. A presença de cães infectados em locais públicos contribui para a contaminação ambiental por ovos de ancilostomídeos, pois suas fezes podem ser facilmente confundidas com o solo (Wijers e Smit, 1966).

Segundo Yoshida et al. (1968), a infecção em seres humanos por esse nematóide tem sido relatada desde a década de 1960, com casos de parasitismo em vários países tropicais e sub-tropicais. Atualmente, pesquisadores de todo o mundo buscam medidas alternativas para o controle desta e de outras endoparasitoses de animais domésticos, visando a diminuição do emprego de quimioterápicos e, conseqüentemente, a redução dos níveis de poluentes no ambiente e nos produtos de origem animal (Mota et al., 2003).

Além disso, a ineficiência de anti-helmínticos tem levado a pesquisas alternativas para o controle de helmintos gastrintestinais, onde o controle biológico, realizado com fungos nematófagos, vem demonstrando ser uma medida promissora (Araújo et al., 2007).

Os fungos nematófagos são organismos saprófitas mundialmente estudados, com capacidade de predação de nematóides produzindo armadilhas ao longo de suas hifas (Mota et al., 2002). Esses fungos pertencem a um grupo heterogêneo que utilizam nematóides como fontes principais ou adicionais de nutrientes. São encontrados em todo o mundo em diferentes habitats, em ambientes ricos em material orgânico (Larsen, 2000) com temperaturas que podem variar de 20 a 30°C (Fernandez et al., 1999). No grupo dos fungos predadores destaca-se o gênero *Duddingtonia* devido à eficácia no controle biológico de nematóides (Dimander et al., 2003).

Para que um fungo seja considerado como um agente promissor no controle biológico é necessário que ele tenha habilidade de passar pelo trato gastrintestinal dos animais para que seja disseminado nas fezes, assim como o fungo *Duddingtonia flagrans* (Grønvold, et al., 2004; Larsen et al., 1994).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Ancylostoma ceylanicum*

A presença de cães infectados em locais públicos contribui para a contaminação ambiental por ovos de ancilostomídeos, pelo tato de suas fezes poderem ser facilmente confundidas com o solo. *A. ceylanicum* é a única espécie de Ancylostomatidae conhecida por infectar seres humanos (Wijers and Smit, 1966). Porém, o elenco de espécies e suas respectivas prevalências são afetados por fatores climáticos, hábitos culturais, recursos diagnósticos e nível de notificação (McCarthy e Moore, 2000).

A espécie *A. ceylanicum* é conhecida por ser endêmica em cães e gatos em Portugal e Sudeste da Ásia. Como todas as espécies de ancilostomídeos de cães, são potencialmente zoonóticos e capazes de produzir certo grau de irritação na pele em seres humanos. O *A. ceylanicum* é a única espécie canina de ancilostomídeo conhecido por produzir infecções patentes nos seres humanos (Traub et al., 2008).

Por causa de seu impacto sobre a saúde global, ultimamente tem havido um interesse renovado no desenvolvimento de medidas eficazes de controle para ancilostomídeos e outros nematóides (Fairfax et al., 2009).

Além disso, segundo Yoshida et al. (1968), infecções em seres humanos por esse nematóide tem sido relatada desde a década de 1960, com casos de parasitismo em países sub-tropicais e tropicais.

2.2. Controle biológico

O controle das helmintoses gastrintestinais dos animais domésticos é feito principalmente pela utilização de anti-helmínticos que agirão sobre as formas parasitárias estabelecidas no hospedeiro. Além disso, a seleção de um agente que possa ser empregado comercialmente como controlador biológico de parasitos gastrintestinais é uma proposta viável. Essa proposta se baseia na capacidade de produção do antagonista em escala industrial, nos custos relacionados a esta produção, na competitividade com as drogas tradicionais

estabelecidas no mercado e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais. Por outro lado deve-se atentar para o fato de que as formulações possam oferecer segurança para os produtores, consumidores, animais tratados e ao meio ambiente (Waller, 2005).

O controle biológico realizado com fungos nematófagos é uma alternativa promissora e viável, atuando na contaminação ambiental de parasitos em estágio de vida livre, diminuindo assim a frequência de tratamentos químicos podendo reduzir desta forma, a dependência aos anti-helmínticos (Vasconcellos et al., 2004).

2.3. Fungos nematófagos

Mais de 150 espécies de fungos nematófagos já foram catalogadas. Esses fungos também são conhecidos como destruidores de helmintos. Dessa forma comportam-se como antagonistas naturais, capazes de promover a captura, a morte ou a sua destruição (Mota et al, 2003). Quanto maior a mobilidade dos nematóides maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas que conseqüentemente provocam a destruição do parasita (Nansen et al., 1986, 1988).

Esses fungos são cosmopolitas, ocorrendo em solos naturais, e em todos os tipos de matéria orgânica em decomposição (Silva et al., 2010). No ambiente esses fungos são biologicamente importantes, desempenhando um papel na reciclagem de carbono, nitrogênio e outros elementos que são originados a partir da degradação do nematóide (Graminha, 2004).

Esses fungos se comportam como antagonistas naturais, promovendo a captura e a destruição do parasito, e de acordo com sua ação, são classificados em endoparasitas, predadores e oportunistas, sendo que os grupos dos predadores e oportunistas têm sido estudados no controle biológico das helmintoses com resultados promissores (Araújo et al., 1998; Braga et al., 2007; Araujo et al., 2009; Braga et al., 2009; Carvalho et al., 2009).

A maioria das espécies são classificadas como fungos predadores de nematóides. Eles produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio.

Após o aprisionamento ocorre a penetração de hifas na cutícula do nematóide, onde ocorre o crescimento das hifas e digestão dos conteúdos internos (Larsen et al., 1999; Araújo et al., 2004).

São conhecidos seis tipos de armadilhas: hifas adesivas não modificadas ou não diferenciadas; ramificações de hifas anastomosadas, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas que formam redes simples, bidimensionais; nódulos adesivos; anéis constritores e anéis não constritores (Gray, 1988).

Fungos predadores de nematóides são, certamente, o grupo mais estudado e que apresenta o maior potencial na destruição das formas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de animais e humanos (Braga, et al., 2010b).

Embora muitos fungos predadores de nematóides tenham sido isolados e identificados durante o fim do século XIX muitas informações sobre as características ecológicas, nutricionais e fisiológicas destes organismos só recentemente foram geradas. No solo, onde prevalecem condições nutricionais estressantes para o desenvolvimento dos fungos, a habilidade em predar nematóides propicia a estes tipos de microorganismos, vantagens adicionais de sobrevivência. Algumas espécies desenvolvem estruturas de captura como resultado de estímulos externos, enquanto outras desenvolvem-nas espontaneamente, sendo as mais dependentes de nematóides como fonte de nutrientes (Mota et al., 2003).

2.4. *Duddingtonia flagrans*

O gênero *Duddingtonia* é caracterizado por produzir diversos conídios na extremidade dos conidióforos. A presença do helminto induz à produção de armadilhas. Durante o processo de envelhecimento aumenta sua produção de clamidósporos. *Duddingtonia flagrans* destaca-se por ser a espécie de fungo considerada mais promissora no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos. Apresentam conídios de dois tipos: conídios com paredes delgadas em conidióforos eretos em número limitado ou conídios de paredes grossas mais resistentes - clamidósporos (Mota et al., 2003).

A espécie de fungo nematófago *D. flagrans* é identificada como sendo predador e têm sido estudada como agente controlador biológico de nematoides potencialmente zoonóticos (Braga et al., 2010b).

O fungo é utilizado com sucesso no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos devido a grande produção de clamidósporos que são altamente resistentes a condições adversas. Esses, são formados principalmente em condições de crescimento desfavoráveis, o que o torna um potencial controlador biológico (Sanyal et al., 2004; Terril et al., 2004).

Os clamidósporos formados pelo *D. flagrans* são capazes de germinar, colonizar o bolo fecal e proporcionar a destruição das L3 infectantes que estão emergindo, com isso ocasionando uma interrupção no ciclo de vida do parasito (Faedo et al., 2002).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n.12, p. 65-71, 2004.

ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode – trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.117-122, 1998.

ARAÚJO, J V; RODRIGUES, M. L. A. ; SILVA, W. W. ; VIEIRA, L. S. . Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1177-1181, 2007.

ARAÚJO, J. M. ; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R. ; CARVALHO, R. O. ; FERREIRA, S. R. Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 86-89, 2009.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O.; MACIEL, A.S. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.3, p.356-358, 2007.

BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, P.H.G.; FUJIWARA, R.T.; FRASSY, L.N. *In vitro* predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third stage larvae. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.183-186, 2010a.

BRAGA, F.R ; SILVA, A.R. ; ARAÚJO, J. M. ; CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V. ; FRASSY, L.N. Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 588-590, 2010b.

BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; LIMA, W.S.; TAVELA, A.O.; FERREIRA, S.R. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae, **Journal of Helminthology**, v. 83, p. 303–308, 2009.

CARVALHO, R. O. ; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R. ; FERREIRA, S. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R. E.; FRASSY, L. N.; ALVES, C. D. F. Control of Ancylostomosis in dogs using the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium* in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 179-183, 2009.

DIMANDER, S.O.; HOGLUND, J.; UGGLA, A.; SPORNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n.2-3, p.192-209, 2003.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S.O.; YEATES, G.W.; HOGLUND, J.; WALLER, P.J. Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed fungus to control nematode parasites. **Biological Control**, v. 23, p. 64-70, 2002.

FAIRFAX, K. C.; VERMEIRE, J. J.; HARRISON, L. M.; BLINGIRO, R. D.; GRANT, W.; HUSAN, S. Z.; CAPPELLO, M. Characterisation of a fatty acid and retinol binding protein orthologue from the hookworm *A. ceylanicum*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, Issue 14, p. 1561-1571, 2009.

FERNÁNDEZ A.S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; BJØRN, H. & WOLSTRUP J. The efficacy of two isolates of the nematode-destroying fungus *Duddingtonia flagrans* against *Dictyocaulus viviparus* larvae in faeces. **Veterinary Parasitology**, v.85, p. 289-304, 1999.

GRAY, N.F. Fungi attacking vermiform nematodes. In: Poinar, O.G.; Borne, J.H.(Eds). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, p.3-38, 1988.

GRAMINHA, E.B.N. **Isolamento e atividade predatória de fungos nematófagos sobre nematóides gastrintestinais de ovinos da micro região de Jaboticabal-SP**: UNESP, 2004, 72p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, 2004.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J. LARSEN; M. GILLESPIE, A. GIACOMAZZI, F. Interspecific competition between the nematode trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*, and selected microorganisms and the effect of spore concentration on the efficacy of nematode trapping. **Journal of Helminthology**, n.78, p. 41-46, 2004.

LARSEN, M. Biological control of helminthes. **International Journal Parasitology**, v.29, p.139-146, 1999.

LARSEN, M. ; FAEDO, M. ; WALLER, P.J. The Potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep : survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 53, p. 275-281, 1994.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v.120, p.121-131, 2000.

LANDMANN, J.K. AND PROCIV, P. Experimental human infection with the dog hookworm, *Ancylostoma caninum*. **Medical Journal of Australia**, v. 20, p.67 - 69, 2003.

MCCARTHY, J.; MOORE, T.A. Emerging helminth zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1351-1360, 2000.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Evaluation of the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* submitted to different preservation methods against gastrointestinal parasitic nematodes of bovines. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.11, n.1, p.13-17, 2002.

NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUO, J. Predaceous activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and soil nematodes. **Proceeding Nematology**, v.53, n.2, p.237-243, 1986.

NANSEN, P.; FOLDAGER, J.; HANSEN, J.; HENRIKSEN, S.A.; JORGENSEN, R.J. Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.325-335, 1988.

SANYAL, P.K.; CHAUAN, J.B.; MUKHOPADHYAYA. Implications of fungicidal effects benzimidazole compounds of *Duddingtonia flagrans* in integrated nematode parasite management in livestock. **Veterinary Research Communications**, v.28, n.4, p.375-385, 2004.

SILVA, B. F. ; MAUAD, J. R. C. ; BRAGA, F.R.; AMARANTE, A. F. T. ; ARAÚJO, J. V. ; CAMPOS, A. K. Efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* in controlling sheep parasitic gastroenteritis. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1346-1350, 2010.

TERRILL, T.H.; LARSEN, M.; SAMPLES, O.; HUSTED, S.; MILLER, J.E.; KAPLAN, R.M.; GELAYE, S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat faeces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. **Veterinary Parasitology**, v.120, 285–296, 2004.

TRAUB, R.J.; INPANKAEW, T.; SUTTHIKORNCHAI, C.; SUKTHANA, Y.; THOMPSON, R.C. PCR-based coprodiagnostic tools reveal dogs as reservoirs of zoonotic ancylostomiasis caused by *Ancylostoma ceylanicum* in temple communities in Bangkok. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.67–73, 2008.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, J.L., DUNN, A.M., JENNINGS, F.W. **Parasitologia veterinária**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 373, 1998.

WALLER, P.J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science Technology**, v.126, n.3-4, 277-289, 2005.

WIJERS, D. J.; SMIT, A. M. Early symptoms after experimental infection of man with *Ancylostoma braziliense* var. *ceylanicum*. **Tropical and Geographical Medicine**, v.18, 48–52, 1966.

VASCONCELLOS, V. O.; FURLONG, G.M.; FREITAS, C.; DOLINSKI, M.M. AGUILLERA, R.C.D.; RODRIGUES, M.C.A.P. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) **Parasitology Research**, v.94, p.201-206, 2004.

YOSHIDA, K.; OKAMOTO; C J.; CHIU,K. *Ancylostoma ceylanicum* infection in dogs, cats, and man in Taiwan, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 378–381, 1968.

4. OBJETIVOS

1. Avaliar a eficácia do fungo predador *Duddingtonia flagrans* no controle de larvas de *Ancylostoma ceylanicum*;
2. Determinar se a espécie fúngica será capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal de hamsters, desenvolver nas fezes e capturar larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*;
3. Avaliar a ação do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* e determinar se o isolado fúngico foi promissor na recidiva da infecção por meio do exame parasitológico de fezes (OPG).

CAPÍTULO 1

**AÇÃO DO FUNGO *Duddingtonia flagrans* SOBRE *Ancylostoma ceylanicum*
EM FEZES DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*)**

RESUMO

Introdução: *Ancylostoma ceylanicum* é a única espécie conhecida de ancilostomídeos de cães capaz de produzir infecções patentes nos seres humanos. **Métodos:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação *in vitro* do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (isolado AC001) no controle de larvas infectantes (L₃) de *A. ceylanicum* em fezes de hamsters. **Resultados:** O fungo *D. flagrans* (isolado AC001) apresentou efeito significativo ($p < 0,01$) na redução 68,93% do número médio de L₃ de *A. ceylanicum*. **Conclusões:** O isolado fúngico foi eficiente na redução de L₃ de *A. ceylanicum*, podendo ser utilizado no controle desse nematóide.

Palavras-chaves: *Ancylostoma ceylanicum*; Fungos nematófagos; Controle biológico.

Ancylostoma ceylanicum, assim como outros ancilostomídeos de cães (*Ancylostoma caninum* e *A. braziliensis*), são geohelmintos e tem um ciclo de vida direto ocorrendo no intestino delgado de cães, gatos e seres humanos. O hospedeiro adquire a infecção por ingestão oral ou através de migração percutânea de larvas infectantes de terceiro estágio (L₃) presentes no ambiente¹. Ovos não embrionados são eliminados nas fezes após 14 dias, independentemente da via de entrada, e levam de 2 a 8 dias (em ótimas condições ambientais) para se tornarem L₃. Em cães jovens, infecções maciças resultam em diarreia, com grandes quantidades de sangue e muco nas fezes².

A importância do *Ancylostoma ceylanicum* não está relacionada somente aos danos à saúde dos cães, mas também ao potencial zoonótico da espécie. Além disso, é a única espécie conhecida de ancilostomídeo de cães capaz de produzir infecções patentes nos seres humanos³.

O controle desse nematóide é feito pelo uso de anti-helmíntico, no entanto, este não tem sido totalmente eficaz. Por outro lado, o desenvolvimento de novos métodos alternativos de controle de geohelmintos são importantes para a redução da contaminação ambiental por formas infectantes (ovos e/ou larvas)⁴.

Nesse contexto, a utilização do controle biológico tem sido promissora⁵. Dentre os potenciais controladores biológicos, a espécie *Duddingtonia flagrans*, é a mais estudada e se destaca como agente de biocontrole. Vários trabalhos têm demonstrado a utilização de estruturas (clamidósporo, conídios e micélio) deste fungo no combate às L₃ de nematóides em ensaios *in vitro* contendo meio de cultura sólido⁶. Este fato está relacionado principalmente a sua alta capacidade de produção de clamidósporos, que são altamente resistentes a condições adversas, o que o torna um potencial controlador biológico⁶. Além disso, apresenta conídios de dois tipos: conídios com paredes delgadas em conidióforos eretos em número limitado ou conídios de paredes grossas⁷.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação *in vitro* de conídios do fungo nematófago *D. flagrans* no controle de *A. ceylanicum* em coproculturas.

Foi utilizado neste ensaio um isolado da espécie do fungo nematófago *D. flagrans* (isolados AC001) proveniente de solo brasileiro, obtido com a técnica de espalhamento descrita por Duddington⁸, modificada por Santos e cols⁹. Este isolado foi mantido em tubos de ensaio contendo o meio corn-meal-agar 2% (CMA 2%) e armazenado ao abrigo de luz e em temperatura de 4°C.

Discos de cultura (4mm de diâmetro) do isolado fúngico foram transferidos de tubos de ensaio contendo CMA 2% para placas de Petri de 9cm contendo o meio batata-dextrose-ágar 2%. As placas foram mantidas em estufa BOD a 25°C, no escuro, durante 10 dias. Após o crescimento micelial, novos discos de cultura (4 mm de diâmetro) foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio ágar-água 2% durante 21 dias com o intuito de induzir a formação de conídios. Após este período, 5ml de água destilada foi adicionada a cada placa de Petri, e os fragmentos de micélio e conídios foram retirados, conforme a técnica descrita por Araújo e cols¹⁰. Em seguida, duas alíquotas da suspensão de conídios foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para a concentração de 10³ conídios.

Foram utilizadas fezes de hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos e fêmeas, com idade entre 1 a 5 meses. Esses animais foram mantidos em gaiolas plásticas forradas com maravalha. A limpeza dessas gaiolas foi realizada duas vezes por semana, usando água e detergente de hipoclorito de sódio a 12%. Os animais receberam ração granulada (Labina, a Cargill Nutrição Animal, Brasil) e água potável *ad libitum*. Os animais foram previamente submetidos ao tratamento oral

com 4mg/kg¹ de ivermectina (Chemitec Agro, Brasil) durante 7 dias consecutivos¹¹ e aguardando-se o período de carência da droga (20 dias). A seguir, os animais foram infectados com 100 L₃ de *Ancylostoma ceylanicum* por seringa de gavagem e por via oral. Vinte dias após a infecção foi realizada a contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com Gordon e Whitlock¹² para confirmação da infecção.

O ensaio experimental foi constituído de coproculturas contendo o isolado fúngico (conídios) e coproculturas sem o fungo. No grupo tratado, cada coprocultura foi constituída de 1000 conídios fúngicos (AC001) e aproximadamente 1 grama de fezes de hamsters positivas para *Ancylostoma ceylanicum* misturado em vermiculita autoclavada. No grupo controle as coproculturas continham apenas as fezes positivas sem o conídio fúngico. Foram realizadas 10 repetições para os grupos tratados e controle. A seguir, as coproculturas dos dois grupos foram incubadas durante 7 dias, no escuro, a 26°C. Ao final desse intervalo, as larvas presentes em cada grupo estudado foram recuperadas por meio de aparelho de Baermann e identificadas de acordo com os critérios estabelecidos por Barçante e cols¹³.

Os dados obtidos do ensaio experimental foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, ao teste de Tukey com 1% de probabilidade. O cálculo do percentual de redução da média de L3 nos tratamentos foi feito pela seguinte equação:

$$\text{Redução(\%)} = \frac{\text{Média de L3 recuperadas do controle} - \text{Média L3 recuperadas do tratamento}}{\text{Média de L3 recuperadas do controle}} \times 100$$

O isolado do fungo predador de nematóides testado, *D. flagrans* (AC001), apresentou efeito significativo ($p < 0,01$) na redução 68,93% do número médio de L₃ de *A. ceylanicum* (**Figura 1**).

Fungos predadores de nematoides certamente são o grupo mais estudado e que apresenta o maior potencial na destruição das formas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de animais e humanos⁵.

D. flagrans tem sido relatada como a espécie mais promissora no controle de nematóide de animais domésticos⁷. Recentemente, trabalhos têm demonstrado a capacidade predatória *in vitro* da espécie do fungo nematófago em nematóides

parasitas de cães¹⁴. Porém, não existem relatos na literatura sobre a ação dos conídios desse isolado em coproculturas sobre L₃ de *A. ceylanicum*.

Braga e cols⁵ observaram em estudo *in vitro* que este mesmo isolado foi promissor na redução (95,6%) de L₃ de *A. ceylanicum*. Da mesma forma, Carvalho e cols¹⁵ observaram que este isolado apresentou eficácia significativa na predação de L₃ de *Ancylostoma sp.* Porém, ambos os testes foram conduzidos em placas de Petri contendo o fungo crescido em meio AA2%.

A disseminação de L₃ de *A. ceylanicum* no meio ambiente é comum em países de clima tropical e subtropical devido às temperaturas que facilitam o desenvolvimento de suas larvas e eclosão dos ovos. Nesse contexto o *A. ceylanicum* assim como outros Ancilostomídeos são eliminados pelas fezes de seus hospedeiros (cães e gatos) esse isolado fúngico pode se tornar parte de um programa alternativo complementar para o controle desse nematóide no ambiente, e por conseguinte ajudar na redução da utilização de agentes controladores químicos.

No presente trabalho, conídios do fungo *D. flagrans* demonstraram ação nas fezes contaminadas por L₃ de *A. ceylanicum*, causando sua destruição. Sendo assim, este fungo poderia ser uma alternativa promissora a ser utilizada no controle biológico de *A. ceylanicum*.

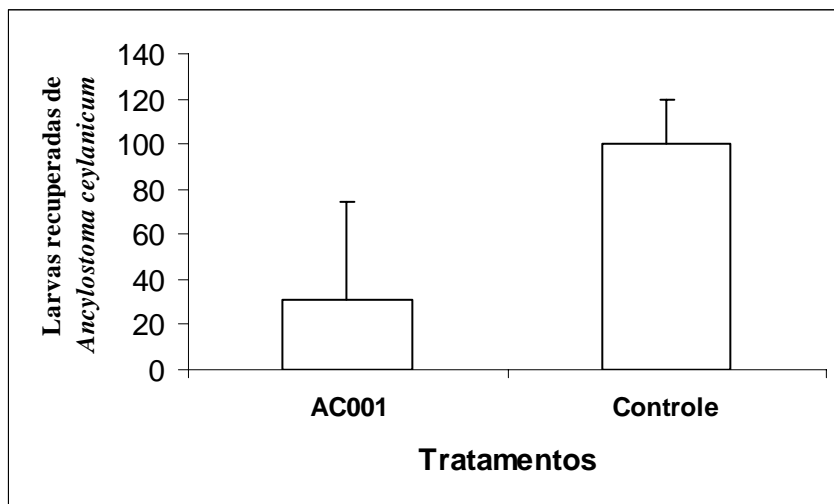


Figura 1. Número médio de larvas infectantes de *A. ceylanicum* não predadas recuperadas de coproculturas pelo método de Baermann após 7 dias de interação com o isolado fúngico *D. flagrans* (AC001) e do controle sem fungo.

REFERÊNCIAS

1. Ray DK, Bhopale KK, Shrivastava VB. Migration and growth of *Ancylostoma ceylanicum* in golden hamsters *Mesocricetus auratus*. J Helminthol 1972; 46:357-362.
2. Carroll SM, Grove DI. Parasitological, hematologic, and immunologic responses in acute and chronic infections of dogs with *Ancylostoma ceylanicum*: a model of human hookworm infection. J Infect Dis 1984; 150:284-294
3. Traub RJ, Inpankaew T, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Thompson RC. PCR-based coprodiagnostic tools reveal dogs as reservoirs of zoonotic ancylostomiasis caused by *Ancylostoma ceylanicum* in temple communities in Bangkok. Vet Par 2008; 155:67-73.
4. Labarthe NA, Serrão ML, Ferreira AMR, Almeida NKO, Guerrero J. A survey of gastrointestinal helminths in cats of the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. Vet Par 2004; 123: 133-139.
5. Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araújo JV, Guimarães PHG, Fujiwara RT. In vitro predatory activity of the fungi *Duddingtona flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third stage larvae. Vet Mic 2010; 146:183-186.
6. Larsen M. Biological control of helminths. Int J Parasitol 1999; 29: 139-146.
7. Mota MA, Campos AK, Araújo JV. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. Pesq Vet Bras 2003; 23: 93-100.
8. Duddington CL. Notes on the technique of handling predaceous fungi. *Transactions of British Mycology Society* 1955; 38: 97-103.

9. Santos, MA; Ferraz, S.; Muchovej, J. Detection and ecology of nematofagous fungi from Brazilian soils. *Nematol Brasileira* 1991; 15: 121-134.
10. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S, Maia AS. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys fungi* on infective *Haemonchus placei* larvae. *J Helminthol* 1993; 67:136-138.
11. Klement P, Augustine JM, Delaney KH, Klement G, Weitz JI. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. *Lab Anim Sci* 1996; 46: 286-290.
12. Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Council Sci Ind Res* 1939; 12: 50-52.
13. Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Vieira LQ, Lima WS, Negrão- Corrêa D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res* 2003; 89: 89-93.
14. Maciel AS, Araújo JV, Campos AK, Lopes E, Freitas, LG. Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. *Vet Par* 2009; 161: 239-247.
15. Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Silva AR, Tavela AO. Predatory activity of nematophagous fungi on *Ancylostoma* ssp. infective larvae: evaluation in vitro and after passing through gastrointestinal tract of dogs. *J Helminthol* 2009; 83: 231-236.

CAPÍTULO 2

Controle biológico *in vitro* de larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade predatória do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* após o trânsito gastrointestinal em hamsters. Foram utilizados vinte animais que foram divididos em dois grupos: um grupo tratado (10 animais) e um grupo controle (10 animais). No grupo tratado com o fungo, cada animal recebeu 5mg/25g de peso vivo de micélio do isolado AC001 por via oral. Os animais do grupo controle não receberam esse tratamento. Para avaliar a atividade predatória do isolado AC001, amostras fecais foram coletadas de ambos os grupos de animais nos horários: 6, 8, 12, 24 e 36 horas após o tratamento. Após a homogeneização dessas amostras, cerca de 2g de fezes foram colocados em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar-água 2% (AA2%) e 1000 L₃ de *A. ceylanicum*, sendo acondicionadas em estufa a 25°C, no escuro, por 10 dias. Ao longo dos horários estudados os seguintes percentuais de redução foram observados: 43,2% (6 horas); 30,8% (8 horas); 25,8% (12 horas); 30% (24 horas) e 11% (36 horas). Observou-se em cada horário estudado, diferença ($p < 0,01$) no número de L₃ recuperadas das placas do grupo tratado em relação ao grupo controle. O fungo *D. flagrans* (AC001) apresentou atividade predatória sobre as L₃ de *A. ceylanicum* após o trânsito pelo trato gastrointestinal de hamsters. Conclui-se, portanto, que o fungo *D. flagrans* pode ser uma alternativa de controle biológico das L₃ de *A. ceylanicum*.

Palavras-chaves: Fungos nematófagos; *Ancylostoma ceylanicum*; *Duddingtonia flagrans*; Controle biológico.

1- INTRODUÇÃO

O papel dos animais de companhia (cães e gatos) como reservatórios de nematóides potencialmente zoonóticos é reconhecidamente um problema mundial de saúde pública (Fairfax et al., 2009). Dentre esses nematóides, destaca-se o gênero *Ancylostoma*, que inclui várias espécies (*A. caninum*, *A. braziliense*, *A. ceylanicum*). Landmann e Prociv (2003) e Traub et al. (2004) mencionam que os ancilostomatídeos de cães e gatos são importantes do ponto de vista médico veterinário e também pela sua perspectiva para a saúde pública. Sendo assim, alguns trabalhos têm visado o emprego do controle biológico com fungos nematófagos que possa ajudar na descontaminação ambiental das formas infectantes (ovos e/ou larvas) de parasitos gastrintestinais (Braga et al., 2010a).

Em relação ao uso como alternativa de controle, os fungos predadores são estudados em condições laboratoriais e naturais no combate a ovos e/ou larvas de nematóides (Nordbring-Hertz et al., 2002; Araujo et al., 2010). Nesse contexto, a espécie *Duddingtonia flagrans*, fungo do grupo predador, tem sido a mais estudada e tem demonstrado sucesso na redução de larvas infectantes de nematóides parasitos em ensaios sob condições laboratoriais e ambientais. Por outro lado, trabalhos recentes têm demonstrado seu potencial para a utilização na descontaminação ambiental por geohelmintos (Carvalho et al., 2009; Braga et al., 2010b). Contudo, existe apenas um trabalho na literatura mencionando a ação de *D. flagrans* sobre L3 de *A. ceylanicum*. No entanto, esse trabalho não objetivou e tão pouco demonstrou a viabilidade de *D. flagrans* após a passagem pelo aparelho gastrintestinal de animais de laboratório (hamsters) e sua atividade predatória sobre *A. ceylanicum*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade predatória do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* após o trânsito gastrintestinal de hamsters.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fungo

Foi utilizado um isolado do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) que tem sido mantido em tubos de ensaio contendo corn meal agar 2% (CMA 2%), a 4°C, no escuro. Este fungo foi crescido em meio de cultura líquido GPY (glicose, peptona sódica e extrato de levedura), sob agitação de 120 rpm de acordo com a metodologia descrita por Carvalho et al. (2009).

2.2. Larvas infectantes (L₃) de *Ancylostoma ceylanicum*

L₃ de *A. ceylanicum* foram obtidas de coproculturas realizadas com fezes de hamsters contaminadas, que foram previamente infectados com 100 larvas de *A. ceylanicum* por animal. Ao final desse período, as L₃ foram recuperadas por meio da utilização do aparelho de Baermann, de acordo com a metodologia descrita por Araújo et al. (1993). A seguir, essas larvas foram identificadas de acordo com os parâmetros estabelecidos por Bowman et al. (2006).

2.3. Ensaio experimental

Vinte hamsters (*Mesocricetus auratus*) com 90 a 110g de peso e idade de 6 a 8 semanas foram submetidos previamente ao tratamento oral com 4mg/Kg de Ivermectina (Chemitec Agro, Brasil) por 7 dias consecutivos aguardando-se o

período de carência da droga (20 dias). A seguir, esses animais foram separados aleatoriamente em dois grupos, contendo 10 animais cada. Os grupos de animais formados foram separados em gaiolas apropriadas e adequadas para abrigar esse número. Durante o experimento os animais receberam água *ad libitum* e ração comercial para hamsters (Labina Cargill Nutrição Animal, Brasil).

No ensaio *in vivo* cada animal do grupo tratado recebeu por via oral uma dose de 5mg/25g peso vivo de micélio fresco do isolado fúngico *D. flagrans* (AC001). Esse procedimento foi realizado por meio da utilização de uma agulha de gavagem (agulha de aço inox BD-10). Os animais do grupo controle receberam apenas água de acordo com Braga et al. (2009a). A seguir, amostras fecais dos animais dos grupos tratado e controle foram coletadas nos horários de 6, 8, 12, 24 e 36 horas após a administração dos tratamentos com o fungo (Carvalho et al. (2009). As amostras coletadas foram homogeneizadas, sendo removidos 2g de fezes que foram colocados em placas de Petri com 4,5cm de diâmetro contendo AA2%. Em cada placa de Petri dos grupos tratado e controle foram vertidas 1000 L₃ de *A. ceylanicum* que foram acondicionadas em estufa a 25°C, no escuro, por 10 dias. De cada horário estabelecido foram realizadas seis repetições para cada grupo de animais. Diariamente, as placas de Petri foram observadas para a pesquisa de estruturas do fungo *D. flagrans* (AC001) como conídios, conidióforos e clamidósporos característicos, segundo a chave de classificação de Van Oorschot (1985). No décimo dia, foram recuperadas as L₃ não predadas das placas de Petri pelo método de Baermann. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A seguir, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 1 % de probabilidade (Ayres et al., 2003).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e sobre a orientação de um médico veterinário.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das L₃ de *A. ceylanicum* recuperadas nos distintos horários das coletas das fezes (6, 8, 12, 24 e 36 horas) das placas de Petri estão representadas na Figura 1. Foi observado que a partir do quinto dia após a administração do fungo, conídios e clamidósporos de *D. flagrans* estavam presentes nas placas de Petri dos animais do grupo tratado, comprovando a sua passagem pelo aparelho gastrintestinal de hamsters. Além disso, este fato foi observado após o intervalo de coleta de 12 horas.

Em relação à atividade predatória, o fungo *D. flagrans* (AC001) apresentou capacidade de predação das L₃ de *A. ceylanicum* comprovando sua viabilidade. Ao longo dos horários estudados os seguintes percentuais de redução foram observados: 43,2% (6 horas); 30,8% (8 horas); 25,8% (12 horas); 30% (24 horas) e 11% (36 horas). Observou-se em cada horário estudado diferença ($p < 0,01$) no número de L₃ recuperadas das placas do grupo tratado em relação ao grupo controle. Por outro lado, em relação ao percentual de redução das L₃, o resultado demonstrado no presente trabalho foi significativo em todos os tempos (6 às 36hs) ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle.

No presente trabalho, *D. flagrans* (AC001) germinou nas fezes após a passagem pelo aparelho gastrintestinal de hamsters. Por outro lado, observou-se a produção de clamidósporos em todas as placas de Petri dos animais do grupo tratado com conseqüente redução no número de L₃ recuperadas. Estes resultados estão de acordo com as observações realizadas por Maciel et al. (2009) e

Carvalho et al. (2009) que trabalharam com o fungo *D. flagrans* sobre L₃ de nematóides parasitos gastrintestinais de animais domésticos potencialmente zoonóticos. Por outro lado, de acordo Braga et al. (2010a, b) a espécie *D. flagrans* (AC001) tem sua capacidade predatória já bastante discutida e comprovada no controle de L₃ de geohelminthos. No entanto, a capacidade predatória dessa espécie nunca tinha sido testada após o trânsito gastrintestinal de hamsters.

Em relação ao melhor local de atividade predatória de fungos nematófagos, Mota et al. (2003) mencionam que são nas fezes frescas, uma vez que os nematóides parasitos de animais e humanos têm que passar desde estágio de ovo até os estádios larvais antes de migrar para a pastagem como larva infectante. Dessa forma, alguns trabalhos utilizando o fungo *D. flagrans* (AC001) têm sido realizados em condições laboratoriais e naturais (Dias et al., 2007; Braga et al. 2009a; Braga et al., 2010a).

Na literatura, menciona-se que a principal premissa para a utilização de fungos nematófagos no controle biológico deve obedecer à regra de passagem e germinação posterior nas fezes (Larsen 1999). Este fato está de acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, comprovando mais uma vez que *D. flagrans* possui uma ampla ação e atividade predatória. Por outro lado, a produção de clamidósporos também é um importante requisito para que um fungo seja capaz de causar a redução efetiva de fases de vida livre dos nematóides parasitos gastrintestinais em animais domésticos (Campos et al., 2008). Este fato também está de acordo com o presente trabalho, uma vez foi registrada a presença de clamidósporos nas placas de Petri dos animais dos grupos tratados com *D. flagrans* (AC001). Por outro lado, no presente trabalho, a presença das L₃ de *A. ceylanicum* nas placas de Petri contendo AA2% foi essencial para a formação das

armadilhas pelo isolado AC001. Essa informação está de acordo com Scholler e Rubner (1994), que relatam que os fungos nematófagos não possuem exigência nutricional, mas a presença de nematóides nas condições laboratoriais dos ensaios confere uma maior produção de armadilhas.

Em relação ao fato da maior predação das larvas, isso está relacionado diretamente com o período de maior eliminação fúngica por parte dos animais, podendo ainda ser influenciada pelo tipo e quantidade de alimento fornecido durante o experimento, bem como a dose de fungo testada (Araújo e Ribeiro 2003). No presente trabalho o maior percentual de redução foi observado no horário de 6 horas (43,2%). Contudo, vale ressaltar que não existe nenhum trabalho na literatura que mencione o tempo de trânsito no aparelho gastrointestinal de hamsters, sendo este o primeiro relato. Dessa forma, esse fato poderia ser útil para futuras comparações a respeito do tempo e qual as doses de fungos a serem administrados a esses animais. O fungo *D. flagrans* (AC001) apresentou atividade predatória sobre as L₃ de *A. ceylanicum* após o trânsito pelo trato gastrointestinal de hamsters, constituindo-se numa alternativa de controle biológico das L₃ de *A. ceylanicum*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

Araújo, J. V.; Ribeiro, R. R.. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos (Nematoda: *Trichostrongyloidea*) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica-RJ, v. 12, n. 2, p. 76-81, 2003.

Araújo, J.V.; Santos, M.A.; Ferraz, S.; Maia, A.S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae, **J. Helminthol**, 67 , p. 136–138, 1993.

Araujo, J. M.; Araújo, J. V.; Braga, F.R ; Carvalho, R. O. *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. **Parasitology Research**, v. 107, p. 103-108, 2010.

Ayres, M.; Ayres, J.R.M.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Belém: Sociedade Civil Mamiraua: Brasília CNPq, p. 290, 2003.

Braga, F.R.; Carvalho, R.O., Araújo, J.M.; Silva, A.R.; Araújo, J.V.; Lima, W.S.; Tavela, A.O.; Ferreira, S.R. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae, **J. Helminthol**, v.83, p. 303-308, 2009a.

Braga, F.R.; Silva, A.R.; Carvalho, R.O.; Araújo, J.V.; Guimarães, P.H.G.; Fujiwara R.T. *In vitro* predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third stage larvae. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.183-186, 2010 a.

Braga, F.R ; Silva, A.R. ; Araujo, J. M ; Carvalho, R. O. ; Araújo, J. V. ; Frassy, L.N. Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Artrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 588-590, 2010b.

Bowman, R.C.; Lynn, M.; Eberhard and L. Alacarez. **Parasitologia Veterinária de Georgis**, Manole, Rio de Janeiro, 2006.

Campos, A.K; Araújo, J.V.; Guimarães, M.P. Interaction between the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* and infective larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea), **J. Helminthol**, v. 82, p. 337-341, 2008.

Carvalho, R.O.; Araújo, J.V.; Braga, F.R.; Ferreira, S.R.; Araújo, J.M.; Silva, A.R.; Frassy, L.N.; Alves, C.D.F. Biological control of Ancylostomosis in dogs using the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium* in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.179-183, 2009a.

Dias, A.S., Araújo, J.V., Campos, A.K., Braga, F.R., Fonseca, T.A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1245-1252, 2007.

Fairfax, K. C.; Vermeire, J. J.; Harrison, L. M.; Blingiro, R. D.; Grant, W.; Husan.; S. Z.; Cappello, M. Characterisation of a fatty acid and retinol binding protein orthologue from the hookworm *A. ceylanicum*. **International Journal for Parasitology**, v. 39,p. 1561-1571, 2009.

Larsen, M. Biological control of helminthes. **International Journal Parasitology**, v.29, p.139-146, 1999.

Landmann, J.K., Prociv, P. Experimental human infection with the dog hookworm, *Ancylostoma caninum*. **Medical Journal of Australia**, v.178, p.69-71, 2003.

Maciel, A. S.; Araújo, J.V.; Campos, A.K.; Benjamin, L.A.; Freitas, L.G. Scanning electron microscopy of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae captured and destroyed by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Micron** (Oxford. 1993), v. 40, p. 463-470, 2009.

Mota, M.A.; Campos, A.K.; Araújo, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

Nordbring-Hertz, B.; Jansson, H.B.; Tunlid, A. Nematophagous fungi. Encyclopedia of life sciences. Basingstoke, Macmillan Publishers, p.1-10, 2002.

Traub, R. J.; Inpankaew, T.; Sutthikornchai, C.; Sukthana, Y; Thompsom, R.C.A. PCR – Based coprodiagnostic tools reveal dogs as revervoirs of zoonotic ancylostomiasis caused by *A. ceylanicum* in temple communities in Bangkok. **Veterinary Parasitology**, v.155, p. 67-73, 2004.

Scholler, M. and Rubner, A. Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. **Microbiological Research**, v. 149, p.145-149, 1994.

Van Oorschot, C.A.N. Taxonomy of the Dactylaria complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. **Studies in Mycology**, v.26, n.1, p.61-95, 1985

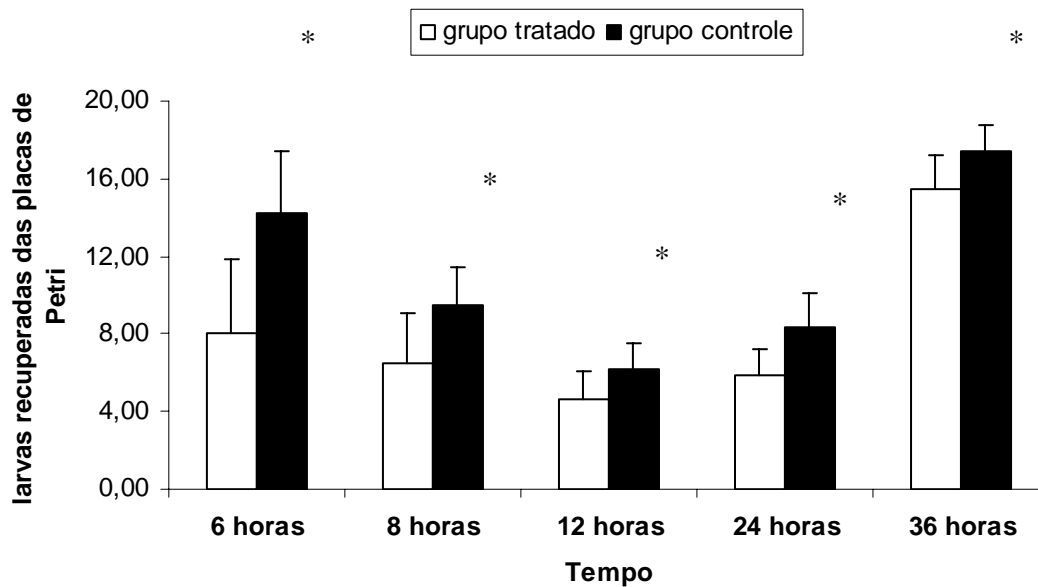


Figura 1- Médias e desvios padrão do número de larvas infectantes (L_3) de *Ancylostoma ceylanicum* não predadas recuperadas das placas de Petri pelo método de Baermann, em diferentes intervalos de exposição ao isolado fúngico *Duddingtonia flagrans* (AC001) e no grupo controle (sem fungos). Asterisco denota diferença ($p < 0,01$). Teste de Tukey.

CAPÍTULO 3

Ação do fungo *Duddingtonia flagrans* em diferentes concentrações após a passagem pelo aparelho gastrointestinal de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) após passagem pelo aparelho gastrointestinal de 50 hamsters (*Mesocricetus auratus*) e sua capacidade predatória sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*. Cada animal foi infectado com 100 L₃ de *A. ceylanicum*. Após 20 dias de infecção os animais foram divididos em 5 grupos, sendo que 4 grupos receberam o tratamento com o fungo *D. flagrans* por um período de 14 dias, a cada dois dias, em diferentes concentrações: grupo 1 (0,04g); grupo 2 (0,08g); grupo 3 (0,16g) e o grupo 4 (0,32g) para cada 25g por peso vivo. Animais do grupo controle não receberam tratamento com fungo. A cada dois dias, 2g de fezes de cada grupo foram coletadas das gaiolas dos animais dos grupos tratados e controle para posterior realização da contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Os resultados do presente trabalho demonstraram que houve diferença ($p < 0,05$) na redução do OPG dos animais dos grupos tratados em relação aos animais do grupo controle. Contudo, não foi observada diferença ($p > 0,05$) na redução do OPG entre os animais dos grupos tratados nas diferentes concentrações utilizadas. Os resultados do presente trabalho sugerem que o fungo *D. flagrans* poderia ser utilizado como uma ferramenta no controle biológico de *A. ceylanicum* em condições naturais.

Palavra-chave: Fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, *Ancylostoma ceylanicum*, Hamsters, Controle biológico.

1. Introdução

De acordo com Traub et al. (2008), o *Ancylostoma ceylanicum* é a única espécie canina de ancilostomatídeo conhecido por produzir infecções patentes em seres humanos. Além disso, essa espécie é endêmica em países europeus e no sudeste asiático, sendo amplamente distribuída em roedores e animais de companhia como cães e gatos (Carrol et al., 1986). Por outro lado, a infecção em humanos por esse helminto tem sido relatada desde os anos de 1960 com casos de parasitismo em vários países de clima tropical e subtropical. Gennari et al. (2002) chamam a atenção para o fato da presença de cães infectados em lugares públicos que contribui para a contaminação ambiental com ovos de ancilostomatídeos presentes em suas fezes, uma vez que são facilmente misturadas no solo e permanecem no ambiente por muito tempo, aumentando significativamente o risco de transmissão de geohelminhos e, em especial, de *A. ceylanicum*. Nesse contexto, medidas alternativas de controle ambiental de ovos e larvas de geohelminhos de ancilostomatídeos são bem vindas (Araújo et al., 2004; Carvalho et al., 2009).

O controle biológico com fungos nematófagos tem sido sugerido como uma alternativa viável e promissora para a redução desta e de outras infecções causadas por geohelminhos (Braga et al., 2008). Estes fungos são divididos em três grupos: endoparasitos, predadores e oportunistas (Mota et al., 2003). No grupo predador destaca-se a espécie *D. flagrans*, útil no controle de nematóides parasitos gastrintestinais de animais domésticos, em condições laboratoriais e a campo (Braga et al., 2009). Por outro lado, Dimander et al. (2003) mencionam algumas razões para o uso da espécie *D. Flagrans*, como grande produção de clamidósporos, capacidade predatória já bastante evidenciada em condições

naturais e viabilidade após a passagem pelo aparelho gastrointestinal de animais domésticos com atividade predatória sobre vários gêneros de helmintos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) após passagem pelo aparelho gastrointestinal de hamsters (*Mesocricetus auratus*) e sua capacidade predatória sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*.

2. Material e Métodos

2.1. Fungo

O fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) foi mantido em tubos de ensaio a 4°C, com meio ágar 2% (CMA 2%), no escuro durante 10 dias. Esse isolado foi obtido de solo brasileiro e mantido no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Brasil.

2.1.2. Produção de micélio fúngico

Após o crescimento do fungo em CMA 2% discos de cultura de aproximadamente 4 mm de diâmetro, em ágar-água 2% , foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 250ml, contendo 150ml de meio líquido GPY (glicose, peptona sódica e extrato de levedura), sob agitação de 120 rpm, no escuro, em temperatura de 26°C por 10 dias. Após esse período, os micélios foram retirados, filtrados e pesados em balança analítica de acordo com a metodologia descrita por Carvalho et al. (2009).

2.2. Animais

Foram utilizados cinquenta hamsters (*Mesocricetus auratus*) com aproximadamente 90 a 110g de peso e idade de 6 a 8 semanas. Todos os animais foram previamente vermifugados com 4mg/Kg de Ivermectina (Chemitec Agro, Brasil) por 7 dias consecutivos (Klement et al., 1996).

2.2.3 Obtenção de larvas infectantes de *A. ceylanicum*

Larvas infectantes (L₃) de *A. ceylanicum* foram obtidas de coproculturas realizadas com fezes de hamsters previamente infectados. Ao final de 8 dias as L₃ foram recuperadas por meio da utilização do aparelho de Baermann de acordo com a metodologia descrita por Araújo et al. (1993). A seguir, essas larvas foram identificadas de acordo com os parâmetros estabelecidos por Urquhart et al. (1998).

2.2.4. Infecção experimental de hamsters (*Mesocricetus auratus*) com larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*

Após 15 dias de aplicação do anti-helmíntico, os cinquenta hamsters foram infectados com aproximadamente 100 L₃ de *A. ceylanicum*. A seguir, esperou-se o período de patência (20 dias) antes do início do ensaio experimental.

2.2.5. Ensaio experimental

Os animais foram separados aleatoriamente em 5 grupos, cada grupo contendo 10 animais. Os grupos de animais foram separados em gaiolas que foram limpas com solução de hipoclorito 4% e maravalha trocada a cada 3 dias.

Durante o experimento os animais receberam água e ração comercial para hamster (Labina Cargill Nutrição Animal, Brasil) *ad libitum*.

O micélio foi processado em liquidificador industrial por 8 segundos em água destilada e administrado aos hamsters por meio de agulha de gavagem. No grupo controle, os animais receberam apenas água. Os animais do grupo 1 receberam 0,04g ; grupo 2 receberam 0,08g; grupo 3 receberam 0,16g e o grupo 4 receberam 0,32g de micélio fresco do isolado fúngico *D. flagrans* (AC001) **a cada 25g** de peso vivo, por um período de 14 dias de acordo com Braga et al (2010b). A cada dois dias, durante um período de 14 dias, amostras de 2g de fezes de cada grupo foram coletadas das gaiolas dos hamsters e feita a contagem dos ovos por gramas de fezes (OPG).

2.2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância. As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey em nível de 1 e 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi observada diferença ($p < 0,05$) na redução do OPG dos animais dos grupos tratados com as diferentes concentrações de micélio fúngico (0,04; 0,08; 0,16 e 0,32g) em relação aos do grupo controle (Fig.1). Contudo, não foi observada diferença ($p > 0,05$) na redução do OPG entre os animais dos grupos tratados nas diferentes concentrações, apenas de larvas um decréscimo de OPG a medida que a concentração do micélio fúngico aumentava .

Fungos nematófagos possuem capacidade predatória sobre L₃ de nematoides parasitos gastrintestinais de animais domésticos potencialmente zoonóticos, com destaque para o gênero *Duddingtonia* (Maciel et al., 2009; Carvalho et al. 2009). Esse gênero é reconhecido apenas como predador, e tem na espécie *D. flagrans* (AC001) sua capacidade predatória já bastante discutida e comprovada no controle de L₃ de geohelmintos (Braga et al., 2010a, b).

D. flagrans (AC001) tem sido utilizado em condições laboratoriais e naturais. Vários trabalhos têm demonstrado sua atividade sobre L₃ de nematoides de eqüinos, ruminantes, cães e seres humanos (Braga et al, 2009a; Dias et al., 2007; Carvalho et al., 2009; Braga et al., 2010). Contudo, nenhum destes trabalhos demonstrou sua atividade em hamsters e em diferentes concentrações. Por outro lado, em relação ao controle biológico de L₃ de *A. ceylanicum*, até o presente momento a literatura só tem registro de apenas um trabalho realizado em condições laboratoriais (Braga et al., 2010). Naquele trabalho, os autores registraram que o isolado AC001 foi mais eficiente na predação e destruição de L₃ de *A. ceylanicum* em relação aos demais fungos testados. Contudo, o presente trabalho é o primeiro relato da viabilidade e ação do fungo *D. flagrans* após a passagem pelo aparelho gastrintestinal de hamster sobre larvas de *A. ceylanicum*.

Trabalhos realizados com a administração oral de fungos nematófagos tem sido realizados com sucesso. No entanto, a literatura não tem registros da utilização de diferentes doses desses fungos em ensaios experimentais (Araujo et al., 2010; Campos et al., 2008).

Em recente trabalho, Carvalho et al. (2010) observaram que a administração de 0,5g/10 kg de massa micelial contendo o fungo *D. flagrans* (AC001) foi eficiente na diminuição do OPG e na recuperação de larvas de *A.*

caninum nos animais tratados em relação aos do grupo controle. Esses resultados estão de acordo com o presente trabalho, uma vez que AC001 foi eficiente na diminuição do OPG dos animais dos grupos tratados em relação aos do grupo controle. Contudo, ainda em relação ao trabalho de Carvalho et al. (2010) não foi estabelecido nenhum ensaio experimental com diferentes concentrações de micélio fúngico. Por outro lado, no trabalho de Braga et al. (2009), os autores administraram massa micelial contendo o isolado AC001 duas vezes por semana, na dose de 1g/10kg. Naquele trabalho foi observado que houve diferença no OPG dos animais dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Todavia, os autores do presente trabalho chamam a atenção para o estudo de dosificação deste e de outros isolados de fungos nematófagos, com a finalidade de se ajustar uma dose correta de administração.

Mendoza-De-Gives et al. (1999) menciona que a composição da cutícula dos nematóides pode ser um fator determinante na habilidade do fungo em predar os nematóides e que variações antigênicas podem estar presentes em diferentes espécies de nematóides ou diferentes isolados de mesma espécie dos fungos, o que poderia resultar em variações na atividade predatória do fungo. Dessa forma, existe a necessidade de mais estudos sobre a relação fungo e nematóide, bem como na dosificação a ser empregada. Por outro lado, Rocha et al. (2007) trabalhando com *D. flagrans*, não registraram diferenças ($p > 0,05$) nas contagens de ovos por grama de fezes nos animais do grupo tratado em relação aos do grupo controle. Naquele trabalho, os autores mencionaram que possíveis falhas na dosificação do fungo para os animais podem ter contribuído para este fato.

Os autores do presente trabalho chamam a atenção para novos estudos que tenham a finalidade de conhecer a melhor dose de material fúngico a ser empregada no controle biológico de nematóides parasitas gastrintestinais.

Dessa forma, pode-se concluir que existe a necessidade de novos estudos que tenham a finalidade de conhecer a melhor dose de material fúngico a ser empregada no controle biológico de nematóides parasitas gastrintestinais. Os resultados do presente trabalho sugerem que o fungo *D. flagrans* poderia ser utilizado como uma ferramenta no controle biológico de *A. ceylanicum* em condições naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador de nematóide *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 76-79, 2006.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 65-71, 2004.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae, **Journal of Helminthology**, v. 67, p.136-138, 1993.

ARAÚJO, J. M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O. *In vitro* Predatory Activity Of Nematophagous Fungi and After Passing Through Gastrointestinal Tract Of Equine On Infective of *Strongyloides* Westeri. **Parasitology Research**, v.107, p.103-107, 2010.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J.M. ; FERREIRA, S.R.; CARVALHO, G.R. Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 264-268, 2010.

BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, P.H.G.; FUJIWARA, R.T. *In vitro* predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third stage larvae. **Veterinary Microbiology**, 2010b.

BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; LIMA, W.S.; TAVELA, A.O.; FERREIRA, S.R. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae, **Journal of Helminthology**, v.83, p. 303-308, 2009.

BRAGA, F. R. ; ARAÚJO, J. V. ; SILVA, A. R. ; ARAÚJO, J. M. ; CARVALHO, R. O.; CAMPOS, A. K. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 335-340, 2009.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; SIVA, A.R.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R.O.; CORREA, D.N.; PEREIRA, C.A.J. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 24, p.2713-2716, 2008.

BROWN, A.C.; HARRISON, L.M.; KAPULKIN, W.; JONES, B.F.; SINHA, A.; SAVAGE, A.; VILLALON, N.; CAPPELLO, M. Molecular cloning and characterization of a C. type lectin from *Ancylostoma ceylanicum*: Evidence for a role in hookworm reproductive physiology. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.151, p.141-147, 2007.

CARROL, S.M. AND GROVE, D.I. Experimental infection of humans with *Ancylostoma ceylanicum*: clinical, parasitological, haematological and immunological findings, **Tropical Geogr. Med.**, v. 38, p.38-45,1986.

CARVALHO,R.O., ARAÚJO J.V., BRAGA, F. R., FERREIRA, S.R., ARAÚJO, J.M., SILVA, A.R., FRASSY, L.N., ALVES, C.D.F. Biological control of Ancylostomosis in dogs using the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium* in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p.179-183, 2009.

CARVALHO, R.O. ; BRAGA, F.R ; ARAÚJO, J.V. Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma spp.* infective larvae in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p.236-239, 2010.

CAMPOS, A. K. ; ARAÚJO, J. V. ; GUIMARÃES, M. P. Interaction between the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* and infective larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea). **Journal of Helminthology**, v. 82, p. 337-341, 2008.

DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; BRAGA, F.R.; FONSECA, T.A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1245-1252, 2007.

DIMANTER, S. O.; HOGLUND, J.; UGGLA, A.; SPORNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v.111, p. 192-209, 2003.

FAIRFAX, K.C.; VERMEIRE. J.J.; HARRISON, L.M.; BUNGIRO, R.D.; GRANT, W.; HUSAIN, S.Z.; CAPPELLO, M. Characterisation of a fatty acid and retinol binding protein orthologue from the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. **International Journal of Parasitology**, v. 39, p.1561-1571, 2009.

GENNARI, S. M.; GENNARI, S. ; BLASQUES, L. S.; RODRIGUES, A. A. R. ; CILENTO, M. C. ; SOUZA, S. L. P. ; FERREIRA, F . Determinação da contagem de ovos de nematóides no período peri-parto em vacas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 32-37, 2002.

KLEMENT, P.; AUGUSTINE, J.M.; DELANEY, K.H.; KLEMENT, G.; WEITZ, J.I. An oral ivermectine regimen that eradicates pinworms (*Syphacia spp.*) in laboratory rats and mice. **Lab. Animal Science**, v.46, 286-90, 1996.

MACIEL, A. S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; BENJAMIN, L.A.; FREITAS, L.G. Scanning electron microscopy of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae captured and destroyed by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Micron**, v. 40, p. 463-470, 2009.

MENDOZA DE-GIVES, P.; DAVIES, K.G.; CLARCK, S.J.; BEHNKE, J.M. Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 95-104, 1999.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

LARSEN, M. Biological control of helminthes. **International Journal Parasitology**, v.29, p.139-146, 1999.

TRAUB RJ, Inpankaew T, Sutthikornchai C, Sukthanay, Thompson RCA. PCR-based coprodiagnostic tools reveal dogs as reservoirs of zoonotic ancylostomiasis caused by *Ancylostoma ceylanicum* in temple communities in Bangkok (2008). **Veterinary Parasitology**, v.155: 67,73, 2008.

ROCHA, R.A.; ARAÚJO, J.V.; AMARANTE, A.F.T. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against infections by *Haemonchus* and *Trichostrongylus* species in lambs at pasture. **Journal of Helminthology**, v. 81, p.387-392, 2007.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 373, 1998.

SILVA, B. F. ; MAUAD, J. R. C. ; Braga, Fabio Ribeiro ; AMARANTE, A. F. T. ; Araújo, J. V. ; CAMPOS, A. K. . Efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* in controlling sheep parasitic gastroenteritis. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1346-1350, 2010.

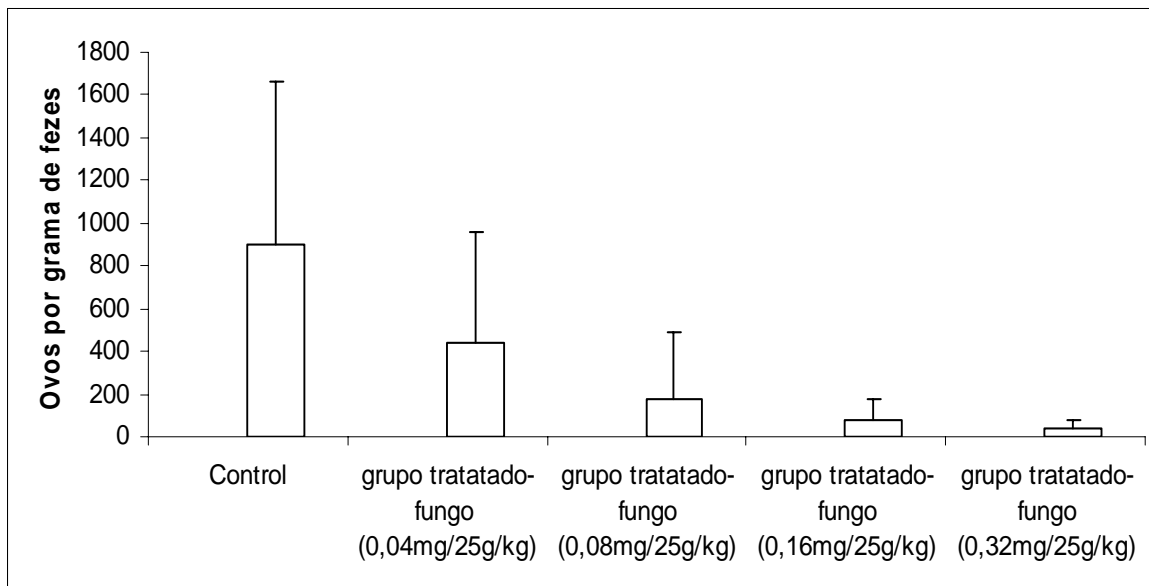


Figura 1 - Valores médios da contagem de ovos por gramas de fezes nas diferentes concentrações de micélio fúngico administrados aos animais do grupo tratado com o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) e no grupo controle sem fungo.

CONCLUSÕES GERAIS

1 - Conídios do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) demonstraram ação nas fezes contaminadas por L₃ de *Ancylostoma ceylanicum*, causando destruição, demonstrando sua eficácia no controle das larvas;

2 - O fungo *D. flagrans* (AC001) passou pelo trato gastrointestinal de hamsters, uma vez que estruturas reprodutivas do mesmo foram encontradas nas fezes dos animais 5 dias após a administração do micélio fúngico;

3 – O isolado foi promissor na recidiva da infecção, uma vez que houve diferença ($p < 0,05$) na redução do OPG dos grupos tratados em relação ao grupo controle; e

4- A maior diferença foi para a dose 0,032g de micélio fúngico (0,032g), sugerindo que esta é a melhor dose a ser empregada para futuros trabalhos.