

Eurytrema coelomaticum (GIARD ET BILLET, 1892) LOOSS, 1907:

ALGUNS ASPECTOS DO SEU RELACIONAMENTO COM OS HOSPEDEIROS
INTERMEDIÁRIOS E DEFINITIVO SOB CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

DALTON GARCIA DE MATTOS JUNIOR

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Eurytrema coelomaticum (GIARD ET BILLET, 1892) LOOSS, 1907:
ALGUNS ASPECTOS DO SEU RELACIONAMENTO COM OS HOSPEDEIROS
INTERMEDIÁRIOS E DEFINITIVO SOB CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

DALTON GARCIA DE MATTOS JUNIOR

SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA:

Dra. SUZANA BENCKE AMATO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária - Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Itaguaí, Rio de Janeiro

Maio, 1987

TÍTULO DA TESE

Eurytrema coelomaticum (GIARD ET BILLET, 1892) LOOSS, 1907:
ALGUNS ASPECTOS DO SEU RELACIONAMENTO COM OS HOSPEDEIROS
INTERMEDIÁRIOS E DEFINITIVO SOB CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

AUTOR

DALTON GARCIA DE MATTOS JUNIOR

APROVADO EM: 28/05/1987

Dra. SUZANA BENCKE AMATO

Suzana B. Amato

Dr. DEOCLÉCIO BEZERRA BRITO

Deoclécio Bezerra Brito

Dr. HUGO E. BARBOZA DE REZENDE

Hugo E. Barboza de Rezende

AOS MEUS PAIS, DALTON
E LILIAN, PELO AMOR,
APOIO E ORIENTAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Dra. SUZANA BENCKE AMATO, Professor Adjunto do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela orientação deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelas informações e ensinamentos adquiridos no decorrer do Curso.

Aos professores do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, em especial aos Professores JAYADE MACHADO DE MENDONÇA, Professor Titular da Disciplina de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, e os Professores Adjuntos MAURÍCIO FRANCIS e DEOCLÉCIO BEZERRA BRITO, pelo apoio prestado.

Ao Conselho Nacional para a Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro durante a realização do Curso.

Ao Dr. SÉRGIO SEBASTIÃO DA SILVA VIANNA, Médico-Veterinário responsável pelo Laboratório Regional de Pindamonhangaba, Instituto Biológico de São Paulo, pela amizade, apoio e colaboração prestado no decorrer deste trabalho.

Ao Médico Veterinário JAIRO DIAS BARREIRA, e aos professores, Médicos Veterinários, RAMIRO BATISTA NETO (Universidade Federal da Bahia), SÉRGIO CARMONA DE SÃO CLEMENTE e PAULO CÉSAR DE FIGUEIREDO (Universidade Federal Fluminense); amigos de todas as horas, meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. D.A. NICKLE do Systematic Entomology Laboratory do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América, (USDA), pela identificação dos Tettigoniídeos.

Aos Drs. JOSÉ FELIPE RIBEIRO AMATO e CLAUDETE MASSARD da UFRRJ pelo auxílio nas fotografias, meus agradecimentos.

Aos Funcionários da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, da UFRRJ, e do Laboratório Regional de Pindamonhangaba do Instituto Biológico de São Paulo, pelo auxílio prestado nos trabalhos de campo.

Ao Biólogo ALMIR ANTONIO e ao aluno MÁRIO ALVES (Licenciatura em Ciências Agrárias, UFRRJ), pela colaboração e incansável dedicação.

BIOGRAFIA

DALTON GARCIA DE MATTOS JUNIOR, filho de Dalton Garcia de Mattos e de Lillian Duarte Pinto de Mattos, nascido na cidade do Rio de Janeiro em 16 de fevereiro de 1957. Realizou o curso primário em Niterói, Estado do Rio de Janeiro. Frequentou o curso secundário no Instituto ABEL que foi concluído em 1975.

Ingressou na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense em 1976, formando-se em julho de 1981. Durante este período desenvolveu atividades de monitoria nas Disciplinas de Genética e Melhoramento Animal e Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos.

No ano de 1982, estagiou durante cinco meses na Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), seção Patologia Animal no Setor de Parasitologia em Itaguaí, RJ e durante seis meses, no Setor de Helmintoses da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Em 1983 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária, a nível de Mestrado, na Universidade

Federal Rural do Rio de Janeiro. Atualmente exerce o cargo de Professor Auxiliar de Ensino da Disciplina de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense tendo prestado concurso público para a referida disciplina em 1984.

CONTEÚDO

	Págs.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. <i>Eurytrema pancreaticum</i> e <i>E. coelomaticum</i> - espécies distintas	4
2.2. Aspectos do ciclo biológico	6
2.3. Alterações histopatológicas causadas por Trematódeos em moluscos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Coleta e manutenção dos hospedeiros	15
a) <i>Bradybaena similaris</i>	15
b) <i>Conocephalus saltator</i>	16
c) Hospedeiros vertebrados	17
3.2. Coleta e obtenção de ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	18
3.3. Infecções experimentais	19
a) Primeiro hospedeiro intermediário	19
b) Segundo hospedeiro intermediário	19
c) Hospedeiros vertebrados	20

	Págs.
3.4. Obtenção e preparação dos esporocistos e metacercárias	21
3.5. Coleta e identificação dos hospedeiros intermediários do <i>E. coelomaticum</i>	22
3.6. Histologia dos hospedeiros intermediários e definitivos	23
4. RESULTADOS	25
4.1. Infecção experimental	25
a) Primeiro hospedeiro intermediário	25
b) Segundo hospedeiro intermediário	30
c) Hospedeiros vertebrados	33
4.2. Hospedeiros intermediários naturais	36
a) Primeiro hospedeiro	36
b) Segundo hospedeiro	38
4.3. Alterações Histopatológicas observadas no primeiro hospedeiro intermediário	42
5. DISCUSSÃO	45
5.1. Infecção Experimental	45
a) Primeiro hospedeiro intermediário	45
b) Segundo hospedeiro intermediário	49
c) Hospedeiros vertebrados	51
5.2. Hospedeiros intermediários naturais	54
a) Primeiro hospedeiro intermediário	54
b) Segundo hospedeiro intermediário	55

5.3. Alterações histopatológicas observadas no primeiro hospedeiro intermediário	57
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DAS TABELAS

	Págs.
TABELA 1. Infecção experimental de <i>Bradybaena similaris</i> com 100 ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	26
TABELA 2. Resultados dos testes histoquímicos sobre a parede dos cistos das metacercárias de <i>Eurytrema coelomaticum</i> em <i>Conocephalus saltator</i> infectados experimentalmente	32
TABELA 3. Infecção experimental de hospedeiros vertebrados com metacercárias de <i>Eurytrema coelomaticum</i> obtidas de <i>Conocephalus saltator</i>	34
TABELA 4. Biometria comparada dos principais caracteres de três amostras de <i>Eurytrema coelomaticum</i> coletados de um bovino, naturalmente infectado e de dois caprinos, experimentalmente infectados. Cada amostra é composta por 10 espécimens e as medidas são dadas em milímetros	35

TABELA 5. Análise da prevalência de metacercárias de <i>Eury-</i> <i>trema coelomaticum</i> em amostras de espécies de <i>Conocephalus</i> naturalmente infectados	41
--	----

LISTA DAS FIGURAS

	Págs.
FIGURA 1. Esporocistos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> eliminados de <i>Bradybaena similaris</i> infectadas experimentalmente. Notar as cercárias no interior do endocisto (C) (25 X)	71
FIGURA 2. Fotomicrografia de cercárias de <i>Eurytrema coelomaticum</i> demonstrando a ventosa oral (VO), o estilete (E), a ventosa ventral (VV) e a cauda (C) (200 X)	71
FIGURA 3. Ritmo de eliminação de esporocistos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> expelidos por um espécime de <i>Bradybaena similaris</i> (Molusco 1)	72
FIGURA 4. Ritmo de eliminação de esporocistos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> expelidos por um espécime de <i>Bradybaena similaris</i> (Molusco 2)	73

- FIGURA 5. Ritmo de eliminação de esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* expelidos por um espécime de *Bradybaena similaris* (Molusco 3) 74
- FIGURA 6. Fotomicrografia de uma metacercária de *Eurytrema coelomaticum* obtida de um inseto experimentalmente infectado (1280 X) 75
- FIGURA 7. Fotomicrografia de um corte histológico do abdômen, de um exemplar de *Conocephalus saltator*, demonstrando as metacercárias de *Eurytrema coelomaticum*. Parede do cisto (PC) e o parasito (P) (1600 X, Coloração HE) 76
- FIGURA 8. Fotomicrografia de um corte histológico do abdômen, de um exemplar de *Conocephalus saltator*, demonstrando as metacercárias de *Eurytrema coelomaticum*. Parede do cisto (PC), parasito (P) e a ventosa ventral (VV). A coloração azul da parede do cisto indica a presença de fibras colágenas (1600 X, coloração tricromo de Gomori) 76
- FIGURA 9. Fotomicrografia de um corte histológico do abdômen, de um exemplar de *Conocephalus saltator*, demonstrando a metacercária de *Eurytrema coelomaticum*. Parede do cisto (PC), parasito (P) e a ventosa oral (VO). A transparência da parede do cisto indica a presença de colágeno (1600 X, coloração orceína) 77

- FIGURA 10. *Eurytrema coelomaticum* recuperado de um caprino experimentalmente infectado com 10 *Conocephalus salicor*. Notar a ventosa oral (VV), a modificação da estrutura dos testículos (T) e das glândulas vitelogênicas (GV) (315 X) 78
- FIGURA 11. Infecção natural de *Bradybaena similaris* com esporocistos de *Eurytrema coelomaticum*, coletados nos municípios de Lorena e Pindamonhangaba, SP. O número no topo das barras indica o número de moluscos infectados 79
- FIGURA 12. Infecção natural de *Conocephalus sp.* (Orthoptera, Tettigoniidae) com metacercárias de *Eurytrema coelomaticum*, coletados nos municípios de Lorena e Pindamonhangaba, SP. O número do topo das barras indica o número de esperanças infectadas 80
- FIGURA 13. Exemplar macho da esperança do gênero *Conocephalus*, segundo hospedeiro intermediário de *Eurytrema coelomaticum* 81
- FIGURA 14. Região anterior (RA) do cercus de *Conocephalus saltator* (189 X) 82
- FIGURA 15. Região posterior (RP) do cercus de *Conocephalus sp.* (189 X) 82

- FIGURA 16. Infecção natural de *Conocephalus saltator* e *Conocephalus sp.* (Orthoptera, Tettigoniidae) com metacercárias de *Eurytrema coelomaticum* coletados em uma propriedade localizada no município de Pindamonhangaba, SP, nos meses de agosto à outubro de 1986. O número acima das barras indica o número de esperanças infectadas **83**
- FIGURA 17. Corte histológico de *Bradybaena similaris* infectado, demonstrando o aspecto anormal do tecido glandular. Notar o esporocisto (E) repleto de cercárias (C), a desorganização dos túbulos glandulares (TG) (400 X, coloração HE) **84**
- FIGURA 18. Corte histológico de *Bradybaena similaris* infectado, demonstrando os esporocistos (E) provocando a compressão dos túbulos (TG) da glândula digestiva (400 X, coloração tricromo de Gomori) **84**
- FIGURA 19. Corte histológico da glândula digestiva parasitada, demonstrando a diminuição dos túbulos (T) e os núcleos picnóticos (N) (1150 X, coloração HE) **85**
- FIGURA 20. Corte histológico da glândula digestiva parasitada, demonstrando os grânulos amarelados (A), os corpúsculos de coloração marrom (M) e a vacuolização do citoplasma (V) (1000 X, coloração HE) **85**

- FIGURA 21. Corte histológico de um molusco parasitado demonstrando a desorganização epitelial (D) no local de fixação do esporocisto (E) (1150 X, coloração tricromo de Gomori) **86**
- FIGURA 22. Corte histológico do ovotestis de um molusco infectado. Notar a degeneração e desorganização do órgão. Ovócito sem contorno definido (O) (400 X, coloração HE) **86**
- FIGURA 23. Corte histológico da glândula digestiva (GD) de um molusco não parasitado (315 X, coloração HE) **87**

RESUMO

O ciclo biológico do *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) foi estudado com os seguintes objetivos: a) analisar o desenvolvimento do trematódeo nos hospedeiros intermediários; b) identificar o segundo hospedeiro intermediário na natureza e no laboratório; c) avaliar a prevalência do parasito nos hospedeiros intermediários; d) estudar as alterações causadas pelo trematódeo no molusco hospedeiro. Exemplares de *Bradybaena similaris* foram infectados, experimentalmente, com ovos de *E. coelomaticum*, e as larvas desenvolvidas neste hospedeiro, foram estudadas morfológicamente, notando-se que a morfologia dos esporocistos expelidos pode caracterizar a espécie *E. coelomaticum*. O número de esporocistos expelidos por caramujo variou muito. Ortópteros das famílias Gryllidae, Acridiidae e Tettigoniidae foram capturados nos municípios de Lorena e Pindamonhangaba, SP, e examinados à procura de metacercárias de *E. coelomaticum*. Apenas duas espécies de esperanças, os tettigoniídeos *Conocephalus saltator* e *Conocephalus sp.* albergavam metacercárias de *E. coelomaticum*. Infecção experimental destes

insetos, com esporocistos expelidos de *B. similaris* infectados experimentalmente, comprovaram serem estes tetrigoniídeos o segundo hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum*, o qual foi identificado pela primeira vez, no Brasil. Infecções experimentais feitas em camundongos albinos linhagem Balb/c normal, em ratos linhagem Whistar e em cabras, utilizando-se esperanças infectadas experimental e naturalmente, bem como com metacercárias dissecadas destes insetos, apresentaram resultados positivos apenas nas cabras. Os exemplares de *E. coelomaticum* coletados das cabras experimentalmente infectadas eram bem menores do que os normalmente coletados em bovinos. A prevalência média de *E. coelomaticum* em *B. similaris*, nos municípios estudados variou entre 9,75% e 20,15%, enquanto que em *Conocephalus* variou entre 0,62% e 70%. As alterações histopatológicas encontradas no molusco hospedeiro intermediário foram causadas pela compressão das larvas que atingiam principalmente a glândula digestiva e a ovotestis.

SUMMARY

The life cycle of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) was studied with the following objectives: a) to analyze the development of the trematode within its intermediate hosts; b) to identify its second intermediate host, in nature and in laboratory; c) to evaluate the worm prevalence in its intermediate hosts; d) to describe the effect of the intramolluscan stages upon the digestive and the reproductive systems of the first intermediate host. Land snails, *Bradybaena similaris*, were experimentally infected with eggs of *E. coelomaticum* and the intramolluscan stages were described. The morphology of expelled sporocysts appeared to be constant and could allowed the characterization of the species. The number of expelled sporocysts produced in each snail showed a large variation. Orthopterans of the families Gryllidae, Acridiidae and Tettigoniidae were captured in Lorena and Pindamonhangaba, in the Paraíba River Valley, São Paulo, and examined for metacercarie of *E. coelomaticum*. Only two species of tettigoniids of the genus *Conocephalus* were found

harboring metacercariae of *E. coelomaticum* in the hemocoel. Experimental infective of these tettigoniids further supported their identification as *E. coelomaticum* second intermediate host. Therefore *Conocephalus saltador* and *Conocephalus sp.* were identified as the second intermediate host of *E. coelomaticum* for the first time in Brazil. Heterozygous nude mice Balb/c, Whistar stain rats and goats were experimentally infected by using infected *C. saltador*, or the metacercariae dissected from these insects. Only the goats acquired the infection. The specimens collected from the goats were much smaller than those found in the bovine host. The prevalence of *E. coelomaticum* in *B. similaris* in the properties surveyed ranged between 9.75% and 20.15%, while in *Conocephalus* it ranged between 0.62% and 70%. The histopathology found in the molluscan host showed that the alterations observed in the digestive gland and in the ovotestis were caused by mechanical pressure from the multiplying larvae.

1. INTRODUÇÃO

Os trematódeos do gênero *Eurytrema* (Looss, 1907) pertencem à família Dicrocoeliidae, sendo que duas espécies - *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) e *E. pancreaticum* (Janson, 1889) são parasitos comuns de ductos pancreáticos de ruminantes. O *E. pancreaticum* tem sido registrado em bovinos, caprinos, ovinos, camelos, búfalos, suínos, cervídeos, lagomorfos e no homem, enquanto que o *E. coelomaticum* ocorre em bovinos, caprinos, ovinos e camelos. De acordo com TRAVASSOS (1944) o *E. pancreaticum* está distribuído na Ásia, Europa e Rússia Oriental e o *E. coelomaticum* além de ocorrer nestas regiões, ocorre na América do Sul.

Devido às grandes semelhanças morfológicas entre as espécies *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*, confirmadas por vários registros, problemas quanto à diferenciação tem sido levantados por diversos investigadores. Alguns as registram como sinônimas, enquanto outros, baseados em diferentes particularidades do ciclo biológico nos hospedeiros intermediários e em caracteres morfológicos, as consideram como espécies distintas.

Tomando como base o trabalho de TRAVASSOS (1944), as espécies naturais do Brasil foram classificadas como *E. coelomaticum*. Entretanto, TRAVASSOS em 1918 (op. cit.) também confundiu *E. coelomaticum* com *E. pancreaticum* devido às variações morfológicas que estas espécies estão sujeitas, principalmente quanto ao tamanho e a forma do corpo, posição relativa dos órgãos internos, forma das gônadas e extensão das glândulas vitelogenéticas.

No Brasil, o *E. coelomaticum* atingiu uma grande importância ao constatar-se sua alta frequência em pâncreas de bovinos abatidos em diversos estados da União, mas alguns investigadores, sem terem estudado com mais detalhes a morfologia do parasito, citam que *E. pancreaticum* também ocorre em nosso país (CAMPOS et al., 1974; Buseti et al., 1983).

O ciclo biológico do *Eurytrema* é complexo, havendo a necessidade da participação de dois hospedeiros intermediários. O primeiro hospedeiro é um molusco gastrópode, *Bradybaena similis* (Férussac, 1821), onde o parasito desenvolve duas gerações de esporocistos, durante um período médio de cinco meses, dependendo das condições ambientais, quando ocorre a eliminação dos esporocistos nas pastagens. O segundo hospedeiro registrado é um inseto, vulgarmente conhecido como "esperança", da Ordem Orthoptera, família Tettigoniidae, gênero *Conocephalus* Thunberg. Estes ingerem os esporocistos os quais, no hemoceloma do inseto, se transformam em metacercárias. Os hospedeiros definitivos adquirem a infecção por ingestão aciden-

tal destes insetos com as pastagens.

O desconhecimento sobre alguns aspectos biológicos do *E. coelomaticum* em nosso país motivou-nos a desenvolver uma pesquisa onde estão inseridos os seguintes objetivos: o desenvolvimento do parasito nos hospedeiros intermediários e definitivos sob condições experimentais, a identificação do segundo hospedeiro na natureza e no laboratório, a detecção da infecção dos hospedeiros intermediários na natureza por forma larvares do parasito, e o estudo das alterações histopatológicas causadas pelo trematódeo no molusco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Eurytrema pancreaticum* e *E. coelomaticum* - espécies distintas

LOOSS & CUFFEY (1907) criaram o gênero *Eurytrema*, com *E. pancreaticum* considerado como espécie tipo. Estes investigadores asseguraram que *E. coelomaticum* diferia de *E. pancreaticum* no tamanho das ventosas, na distância entre elas e na morfologia das glândulas vitelogênicas. Entretanto, TRAVASSOS (1918), DOLLFUS (1922), WARE (1923) in TANG & TANG (1977) e PURVIS (1931) não reconheciam *E. coelomaticum* como espécie distinta de *E. pancreaticum*.

BHALERAO (1936) revisou a literatura sobre o gênero *Eurytrema* e reconheceu 17 espécies, as quais foram agrupadas em cinco subgêneros, considerando como sinônimas *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*. TRAVASSOS (1944) reduziu o número de espécies deste gênero para nove e os subgêneros para quatro. Este autor que anteriormente, havia registrado como sinônimas as espécies *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* em 1918,

retificou suas observações considerando-as como espécies distintas e assinalando que os espécimens brasileiros correspondem a *E. coelomaticum*. TRAVASSOS (op. cit.) mostra que existe um grande número de variações morfológicas em *E. coelomaticum*, as quais incluem tamanho e forma do corpo, posição relativa e forma das gônadas, além de distribuição e quantidade das glândulas vitelogênicas. De acordo com TRAVASSOS (op. cit.) a distribuição geográfica de *E. pancreaticum* restringe-se à Ásia, enquanto que *E. coelomaticum* ocorre na Ásia, América do Sul e Filipinas.

YAMAGUTI (1958) também considerou *E. coelomaticum* como espécie distinta de *E. pancreaticum* ao citar SKRJABIN & EVRANOVA (1953), que distinguiram-nas. SKRJABIN (1964) considerou que as principais diferenças se baseavam no tamanho do corpo e na morfologia do útero. YAMAGUTI (1971) considerou *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* como espécies distintas, citando as observações de SPREHN (1932), TRAVASSOS (1944) e KIMURA (1966).

KIMURA (1966) in CHINONE & ITAGAKI (1976) ao examinar os parasitos coletados de pâncreas de bovinos da Tailândia concluiu que estes eram *E. coelomaticum* devido ao pequeno tamanho do corpo e dos ovos, assim como a relação do tamanho das ventosas que era quase igual à 1.

NOSAKA et al. (1970) in ISHII et al. (1983) distinguem *E. pancreaticum* de *E. coelomaticum* através do tamanho do corpo, tamanho dos ovos e relação entre os diâmetros das ven-

tosas. Em *E. coelomaticum* mede 8,0 x 5,0 mm ou menos, os ovos 45-47 x 28-30 μm ou menos, e o diâmetro da ventosa oral é igual ou menor do que o diâmetro do acetábulo.

EDUARDO et al. (1976) assinalaram que *E. coelomaticum* é uma espécie facilmente distinguida das outras pelo tamanho menor do corpo, ventosas quase semelhantes e por caracteres, como: glândulas vitelogênicas, ovário e testículos. Estes autores propuseram uma chave para a identificação das espécies citando que as diferenças mais marcantes entre *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* são: o útero em *E. coelomaticum* não forma curvas anteriores à ventosa ventral, as glândulas vitelogênicas consistem de pequenos folículos arredondados, enquanto que *E. pancreaticum* possui o corpo amplo e ovalado, com os folículos vitelinos alongados e clavados.

TANG & TANG (1977) chamam a atenção para diferenças encontradas nas formas larvares, principalmente na morfologia dos esporocistos expelidos, que se apresentam mais longos e finos em *E. coelomaticum*.

SAKAMOTO (1981) coletou espécies de *Eurytrema* dos ductos pancreáticos de duas lebres selvagens capturadas nas pastagens, identificando-as como *E. coelomaticum* seguindo as descrições de LOOSS & CUFFEY (1907), TRAVASSOS (1944) e EDUARDO et al. (1976).

2.2. Aspectos do ciclo biológico

A descoberta do primeiro hospedeiro intermediário de

E. pancreaticum foi feita por SVORTSOV & VOLF (1940) in YAMAGUTI (1975) quando encontraram o caramujo *Eulota lantzi* L. naturalmente infectado por larvas deste trematódeo. A morfologia das larvas foi estudada com mais detalhe por MIYATA (1944) in YAMAGUTI (op. cit.) e TANG (1950).

TANG (1950) estudou o desenvolvimento de *E. pancreaticum* no primeiro hospedeiro intermediário desde ovo até cercária, demonstrando através de infecções experimentais, que duas espécies de moluscos da família Fruticicolidae, *Bradybaena similis* e *Cathaica ravida sieboldiana*, Pfeiffer são os primeiros hospedeiros naturais deste parasito na China. Posteriormente, MIYATA (1965) estudou o desenvolvimento de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* nos moluscos *Fruticicola sieboldiana*, Pfeiffer e *Bradybaena similis stimpsoni*, Pfeiffer assinalando algumas diferenças daquelas registradas por TANG (1950), principalmente com relação às células germinativas e à vesícula excretora do miracídio, no desenvolvimento dos esporocistos, e com relação às células glandulares das cercárias.

A prevalência destes parasitos no molusco foi verificada inicialmente por TANG (1950), que encontrou 3,1% de *B. similis* albergando formas larvares de *E. pancreaticum*, em 644 moluscos estudados. BASCH (1965 e 1966) encontrou 4% e 6%; em 1614 e 2144 moluscos, respectivamente, observados para *E. coelomaticum*, TANG & TANG (1977) e SAKAMOTO et al. (1980) encontraram 3,52% e 8,6% respectivamente.

O segundo hospedeiro intermediário de *E. pancreaticum*

foi descoberto através de estudos feitos por BASCH (1965 e 1966). Uma espécie de esperança da família Tettigoniidae, *Conocephalus maculatus*, Le Guillou, foi incriminada após ter sido encontrados 3,8%, dos 1036 indivíduos coletados no campo, albergando as metacercárias do parasito. Estes estudos foram confirmados através de infecções experimentais em insetos da mesma espécie, sendo administrados a cabras, como hospedeiros definitivos. Exemplares de *C. maculatus* foram testados por TANG & TANG (1977) com esporocistos de *E. coelomaticum*, onde estes parasitos se desenvolveram com sucesso. A prevalência também foi investigada por estes autores que encontraram 6,68%, dos 314 insetos capturados nas pastagens, infectados com metacercárias de *E. coelomaticum*. Além de *C. maculatus* outra espécie de esperança, *Phaneroptera falcata* (Scopoli) também albergava metacercárias de *E. coelomaticum*.

Estudos realizados no Japão por SAKAMOTO et al. (1980) revelaram a prevalência de 18,3% e 42% nos meses de julho e dezembro, respectivamente, para as esperanças da espécie *C. maculatus* infectadas com metacercárias de *E. coelomaticum*.

Outros estudos sobre o desenvolvimento de *E. pancreaticum* foram realizados no Japão com um outro enfoque, abrangendo o ritmo de eliminação de esporocistos eliminados de *B. similis* criados sob condições de temperatura controlada. CHINONE et al. (1976) observaram que o tempo médio de duração da eliminação era de 27-53 dias e que o período parasitário do molusco foi reduzido para 81 dias sob temperatura de

26°C.

Um trabalho mais detalhado sobre a biologia do *E. coelomaticum* foi realizado por TANG & TANG (1977) na China. Estes investigadores afirmaram que *B. similis* é o hospedeiro de *E. coelomaticum* naquele país, da mesma forma que os achados de campo e infecções experimentais dos moluscos *B. similis* vieram confirmar que estes gastrópodes também são os hospedeiros deste trematódeo no Japão (SAKAMOTO et al., 1980).

O período parasitário do *E. pancreaticum* no molusco, até a sua eliminação como esporocisto, foi registrado por diversos investigadores. HASEGAWA & TSUCHITA (1955) registram um período de 200 a 300 dias em laboratório, e 350 dias no ambiente; LEE et al. (1968) e JANG (1969) in CHINONE & ITAGAKI (1976) observaram que, quando os moluscos se infectavam no outono, os esporocistos eram eliminados em junho e julho; DVORJADKIN (1969) in YAMAGUTI (1975) estabeleceu que a eliminação dos esporocistos ocorre no intervalo de 365 à 690 dias. Mas, estudos realizados com *B. similis* criados sob temperatura controlada de 26°C, reduziram o período parasitário de *E. pancreaticum* para 81 dias (CHINONE & ITAGAKI, 1976). Já os estudos com *E. coelomaticum* indicam que o período de desenvolvimento do esporocisto até a sua eliminação pode durar de 180 à 365 dias (TANG & TANG, 1977) e 150 dias (SAKAMOTO, et al., 1980).

Os experimentos utilizando esporocistos de *E. pancreaticum* para infecções em hospedeiros definitivos tiveram início com o trabalho de TANG (1950), o qual não obteve sucesso

ao infectar caprinos com esporocistos expelidos. BASCH (1965) ao encontrar esperanças naturalmente infectadas, infectou caprinos com um número variável de metacercárias e após 50 dias recuperou os parasitos do pâncreas. Já CHINONE & ITAGAKI (1976) infectaram coelhos, caprinos e um bovino, somente recuperando parasitos dos coelhos e caprinos.

Outros animais foram utilizados para infecções experimentais com metacercárias de *E. coelomaticum*, como cobaias, coelhos e caprinos (TANG & TANG, 1977), coelhos e caprinos (CHINONE & ITAGAKI, 1976), cobaias, camundongos ICR, DBa, Balb/C nu, coelhos e caprinos (SAKAMOTO et al., 1980; SAKAMOTO et al., 1981) e gatos (CHINONE et al., 1984); mas o desenvolvimento dos parasitos somente ocorreram em coelhos, caprinos, camundongos Balb/C nu heterozigoto e gatos.

O desenvolvimento dos parasitos nos diferentes hospedeiros definitivos foi estudado por diversos autores que enfocaram as características dos trematódeos em função do tempo de desenvolvimento neste hospedeiro. BASCH (1965) encontrou aos 50 dias *E. pancreaticum* jovens em cabras. Estes trematódeos mediam 3,4 mm de comprimento por 1,2 mm de largura contendo ovos no útero. CHINONE & ITAGAKI (1976) encontraram em caprinos necropsiados aos 60 dias pós-infecção, trematódeos medindo 4,15 mm de comprimento por 1,80 mm de largura e a proporção das ventosas ventral/oral era de 0,95 mm, observando que aos 90 dias ocorreu uma proporção de igualdade entre as ventosas.

SAKAMOTO et al. (1980) coletaram *E. coelomaticum* em caprinos aos 18 dias pós-infecção. Os diâmetros da ventosa oral e ventosa ventral e a relação do diâmetro entre as ventosas se aproximavam dos valores encontrados por KIMURA (1966) in SAKAMOTO et al. (op. cit.).

2.3. Alterações histopatológicas causadas por trematódeos em moluscos

Um dos primeiros e mais detalhados trabalhos sobre os efeitos de larvas de trematódeos nos moluscos hospedeiros foi de AGERSBORG (1924), que trabalhou com *Physa gyrina* (Say) e *Planorbis trivolvis* (Say) revelando que a ação do parasitismo sobre os tecidos dos hospedeiros causava uma degeneração destes tecidos, quando a infecção era prolongada e pesada.

REES (1936), que estudou a ação de larvas de diferentes trematódeos que parasitavam um molusco pulmonado *Littorina littorea* (Linn.), registrou alterações na glândula digestiva e nas gônadas, atribuindo isto a sucessões de gerações assexuais dos trematódeos, incluindo esporocistos e rédias, ao tamanho da larva e a formação de uma camada de bloqueio provocada pelos esporocistos que não migraram, permanecendo a nível de glândula digestiva. Dentre as alterações observadas nesta glândula, a degeneração precoce dos túbulos causada por esporocistos de *Cercaria littorinae* (Lebour, 1912) também foi observada.

PRATT & BARTON (1941) registraram que o número de túbulos da glândula digestiva de *Stagnicola emarginata angulata* (Sowerby) estava reduzido pela presença de diversas larvas de trematódeos. Os túbulos se encontravam limitados à periferia de órgão, com os parasitos ocupando a área central. Estes investigadores registraram também que apenas em uma ocasião foi observada a destruição do tecido glandular do hospedeiro. No caso do ovotestis, em dois moluscos infectados com *Cercaria laurei* (Cort & Brooks, 1928) e *Diplostomum flexicaudum* (Cort & Brackett, 1937), não havia ovos desenvolvidos, o ovotestis chegou a faltar em um caramujo infectado por *Plagiorchis muris* (Mc Mullen, 1937).

CHENG & SNYDER (1962) fizeram a primeira revisão detalhada dos efeitos das larvas de trematódeos sobre a glândula digestiva de moluscos, assinalando que o grau de patologia depende do número e tamanho das larvas do parasito neste órgão. Dentre as alterações observadas, as mais importantes são: acúmulo de corpos de gordura nas células, vacuolização do citoplasma, cariólise, desarranjo mas não destruição dos túbulos, mitoses anormais, dano por pressão indireta e perda de nutrientes, metaplasia e atrofia tubular. Já JAMES (1965) observou em *Littorina saxatilis* (Olivi) que a extensão dos danos causados por larvas de trematódeos na glândula digestiva são determinados, primeiramente pelo grau de desenvolvimento dos sacos germinativos, em relação ao ciclo de vida do hospedeiro e ao período da infecção inicial; em segundo, pela mobi-

lidade dos sacos germinativos, e finalmente pela resistência do hospedeiro ou a especificidade do parasito.

PORTER et al. (1967) estudando a ação de *Nanophyetus salmincola* (Chapin, 1927) na glândula digestiva de *Oxytrema siliqua* (Gould) observaram que além da pressão causada pelas larvas do trematódeo neste órgão, ocorria uma ativa ingestão de túbulos hepáticos e o acúmulo de produtos de excreção provenientes dos parasitos. Foi observado um aumento da eosinofilia do epitélio hepático, vacuolização e histólise. MALEK & CHENG (1974) enumeraram os vários efeitos causados por larvas de trematódeos sobre o sistema reprodutivo dos moluscos como: redução da fecundidade, invasão das gônadas por rédias, ingestão do tecido das gônadas e castração. Outros órgãos podem ser afetados tais como a glândula de albumina, próstata e ducto espermático, incidindo assim indiretamente na capacidade reprodutiva destes moluscos parasitados.

YOSHINO (1976) fez menção à região gonadal de *Cerithidea californica* (Haldeman) como locus primário de infecção por *Euhaplorchis californiensis* (Martin, 1950) cujas rédias ao migrarem para a glândula digestiva provocaram alterações degenerativas nas células glandulares com modificações metaplásicas das células colunares que se tornavam cubóides. Estas células cubóides ocorriam comumente na periferia do órgão. A vacuolização do citoplasma e o aumento do número das células excretoras também foi observado.

WILSON & DENISON (1980) estudaram a castração parasitá-

ria e o gigantismo de *Lymnaea truncatula* (Müller) infectados por *Fasciola hepatica* (L.). Estes investigadores registraram que a castração era o resultado do consumo direto do ovotestis pelas rédias, que em algumas ocasiões foram observadas fixadas neste órgão.

RONDELAUD & BARTHE (1982) estudaram as alterações estruturais do epitélio renal de *L. truncatula* infectadas por *F. hepatica*. Registraram que a destruição das células do epitélio renal estava seguida por uma hiperplasia epitelial.

No Brasil, GOMES (1985) ao estudar os aspectos patogênicos das formas larvais de *F. hepatica* sobre *L. columella* (Say) encontrou uma degeneração vacuolar, aspecto hialino do tecido conjuntivo, irregularidade do tamanho dos ovócitos e o desarranjo dos lóbulos da glândula digestiva, provocados pelas rédias e cercárias, também grande perda na fertilidade de *L. columella* quando infectado por *F. hepatica*.

Recentemente SCHWANBEK et al. (1986) trabalharam com *Biomphalaria glabrata* (Say) parasitadas por *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) concluindo que devido ao crescimento dos parasitos, o volume da massa visceral dos moluscos infectados era muitas vezes maior quando comparados com os moluscos não infectados de mesmas dimensões.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e manutenção dos hospedeiros

a) *Bradybaena similaris*

Os moluscos utilizados para o estabelecimento da colônia em cativeiro foram coletados em jardins e hortas localizados no Município de Itaguaí, RJ. Estas coletas foram feitas no início da manhã e no final da tarde, horário em que estes animais são mais facilmente encontrados.

As posturas também foram coletadas do solo, entre as folhas dos vegetais e acondicionadas em terrários ou placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada. Os caramujos jovens eram deixados nos terrários ou transportados para outras placas de Petri em grupos de 20 à 50 indivíduos.

A técnica utilizada para criação foi a de KRULL in GALTSOFF et al. (1937) com algumas modificações, utilizando-se terrários do tipo caixa plástica com tampa de formato

retangular ou circular, comumente utilizados para o acondicionamento de alimentos. Os terrários foram cobertos por uma camada de terra autoclavada, de 1 cm de espessura, que era periodicamente umedecida com água destilada. Pedacos de gravetos e madeira deteriorada, húmus e cacos de telha, previamente observados, foram colocados no interior dos terrários com intuito de transformar o ambiente em um habitat semelhante a-quele em que os animais vivem na natureza. No caso das placas de Petri, suprimiu-se a terra autoclavada para utilizar o papel de filtro umedecido a fim de facilitar o processo histológico, evitando que os caramujos mantivessem grãos de areia no interior do tubo digestivo.

Grupos de 20 e de 5 moluscos foram separados nas caixas e nas placas, respectivamente, onde permaneceram à temperatura ambiente por todo o experimento. Estes foram mantidos nas dependências da Estação para as Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz (E.P.P.W.O.N.), da UFRRJ. A alimentação básica incluiu verduras como o repolho, alface, xuxú e cenoura, previamente lavadas, e pasta de amendoim associada com os vegetais, sendo administrados pelo menos duas vezes por semana, de acordo com as necessidades. Os alimentos deteriorados eram substituídos por frescos.

b) *Conocephalus saltator*, Saussure

Após a captura dos insetos nas imediações da E.P.P.W.O.N.

com um puçá, selecionaram-se somente os representantes do gênero *Conocephalus* (Orthoptera - Tettigoniidae), identificados segundo REHN & HEBARD (1915) e PITKIN (1980), os quais foram utilizados para a infecção experimental com esporocistos de *E. coelomaticum*.

O método de criação das esperanças foi o de PETERSON (1964), com algumas modificações quanto ao tipo de alimentação. Quatro gaiolas foram utilizadas para as criações, sendo que três eram de madeira, medindo 30 por 30 cm de altura, teladas nas laterais com tela de material plástico e uma outra gaiola que era de tela metálica, medindo 50 cm de comprimento por 20 cm de altura.

A alimentação básica dada aos ortópteros foi: pão umedecido com água, verduras, sementes de gramíneas e pasta de amendoim. O alimento era administrado duas vezes por semana. Nas gaiolas de criação, recipientes com água e terra umedecida permaneceram durante todo o experimento.

c) Hospedeiros vertebrados

Os animais de laboratório foram mantidos em gaiolas apropriadas, sendo alimentados com ração. Os caprinos infectados foram mantidos presos em bretes por 60 dias recebendo ração até o dia da necropsia. Estes animais foram mantidos, tendo nas dependências da E.P.P.W.O.N. da UFRRJ, quando nas dependências do Laboratório Regional de Pindamonhangaba (Instituto Biológico de São

Paulo) no Município de Pindamonhangaba, SP.

3.2. Coleta e obtenção de ovos de *Eurytrema coelomaticum*

Os trematódeos foram coletados de pâncreas parasitados de 7 bovinos abatidos no Matadouro Municipal de Nilópolis, Nilópolis, RJ. Este material foi acondicionado, separadamente, em sacos plásticos numerados. A coleta dos parasitos do órgão foi realizada através de incisões ao longo dos ductos pancreáticos com tesoura de ponta fina, sendo em seguida separados ao acaso em placa de Petri contendo solução fisiológica, onde permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente.

Para a obtenção de ovos de *E. coelomaticum*, o conteúdo líquido das placas de Petri foi transferido para os cálices de sedimentação de 250 ml, permanecendo algumas horas em repouso, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento transferido para um vidro de relógio de 12 cm de diâmetro. Seguiram-se as lavagens destes ovos em solução fisiológica 0,85%, sendo estocados em recipientes de vidro na geladeira.

Os espécimens representativos de cada amostra de parasitos coletados, cerca de 10 parasitos, foram comprimidos e fixados em AFA (AMATO, 1985), corados pelo carmim acético de Langeron, montados em bálsamo do Canadá. O restante deste material foi acondicionado em vidros com etanol à 70%, sendo mais tarde identificados segundo TRAVASSOS (1944).

3.3. Infecções experimentais

a) Primeiro hospedeiro intermediário

Cento e cinquenta moluscos *B. similaris*, divididos em grupos de 15 indivíduos de tamanho superior à 5 mm foram utilizados para as infecções. Uma amostra de ovos foi observada ao microscópio com a finalidade de assegurar a possível viabilidade dos mesmos. Foram escolhidos os ovos que se apresentavam escuros, com o miracídio bem visível e íntegro, conforme realizou TANG (1950). Estes ovos foram depositados sobre pequenos pedaços de alface ou sobre uma quantidade de pasta de amendoim. Cerca de 100 ovos por cada grupo de 15 indivíduos foram depositados juntamente com o alimento.

Uma vez confirmada a ingestão, os moluscos foram transferidos para os respectivos recipientes de criação, registrando-se a data e o número do material correspondente aos parasitos, dos quais os ovos se originaram. Os moluscos permaneceram à temperatura ambiente durante todo o experimento.

b) Segundo hospedeiro intermediário

Trinta e cinco esperanças de *C. saltator*, identificadas de acordo com REHN & HEBARD (1915) e PITKIN (1980), foram utilizadas para as infecções. Cada inseto foi capturado com um tubo de ensaio e acondicionado em placa de Pe-

tri contendo cada uma um esporocisto sobre uma pequena quantidade de pasta de amendoim. A observação prévia dos esporocistos era feita no estereomicroscópio para avaliar se as cercárias se encontravam em movimento. Assim, marcava-se a data de infecção e os insetos infectados eram recolocados no interior das gaiolas de criação.

As esperanças infectadas com um esporocisto foram fixadas em líquido de Bouin (BEHMER et al., 1976) ou AFA após a observação da presença de metacercárias no seu interior. Um inseto aos 9, 15 e 23 dias pós-infecção foi fixado em líquido de Bouin, respectivamente, para a realização dos cortes histológicos.

c) Hospedeiros vertebrados

Os roedores utilizados para as infecções com metacercárias foram obtidos com idade variada de 30 à 60 dias. Constavam de 10 camundongos albinos *Mus musculus* (Waterhouse, 1837) linhagem Balb C normal e quatro ratos linhagem Whistar *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) e no caso dos ruminantes, foram infectados seis exemplares de *Capra hircus* (Linnaeus, 1758) de idade também variada, por via oral.

As infecções foram realizadas a partir de metacercárias dissecadas de insetos, ou insetos inteiros da espécie *C. saltator*, capturados na natureza, sendo que somente um caprino foi infectado com *C. saltator* infectado experimentalmente no laboratório. As metacercárias e os insetos

foram administrados por via oral.

3.4. Obtenção e preparação dos esporocistos e metacercárias

Os esporocistos de primeira geração foram obtidos de moluscos experimentalmente infectados, assim como uma parte das metacercárias foram obtidas de esperanças também experimentalmente infectadas. Os esporocistos de primeira geração foram obtidos através da dissecação cuidadosa do molusco, onde parte deles foi fixada em líquido do Bouin e parte em Carnoy (BEHMER et al., 1976), juntamente com os tecidos dos moluscos para os estudos histológicos. Já os esporocistos eliminados, parte foi fixada em AFA, e outros administrados às esperanças. As metacercárias que se encontravam na hemocele do inseto foram obtidas através de dissecação do abdômem das esperanças em placa de Petri contendo solução fisiológica 0,85%. Algumas juntamente com os insetos que as albergavam, foram utilizadas para as infecções dos hospedeiros definitivos, algumas foram fixadas em AFA, e outras juntamente com os insetos experimentalmente infectados, foram fixados em líquido de Bouin para a pesquisa histológica. As células em flama das cercárias foram contadas após o exame dos parasitos a fresco, entre lâmina e lamínula, no microscópio.

Os esporocistos, cercárias e metacercárias foram corados pelo carmim acético de Langeron, diferenciados em etanol 70% com ácido clorídrico 0,5% e desidratados através da

série crescente de alcoóis, clarificados em creosoto de Faia e montados entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá.

3.5. Coleta e identificação dos hospedeiros intermediários do *E. coelomaticum*

Foram pesquisadas propriedades rurais distribuídas pelos Municípios de Lorena e Pindamonhangaba, localizadas no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. Estas propriedades exploram tanto a bovinocultura de leite quanto a horticultura de subsistência. Em Lorena, somente uma propriedade foi estudada nos meses de agosto à novembro de 1984; já Pindamonhangaba, três propriedades foram estudadas de janeiro à julho de 1985.

No laboratório, os moluscos eram imediatamente acondicionados em caixas plásticas, onde se registravam as datas de coleta. Os caramujos eram dissecados submersos em solução fisiológica 0,85%, sob estereomicroscópio, à procura das formas larvares de *E. coelomaticum*.

Nas proximidades de onde foram coletados os moluscos, foram capturadas as esperanças com o auxílio de um puçá. As coletas eram feitas na parte da manhã. Os insetos foram dissecados sob estereomicroscópio, submersos em solução fisiológica 0,85%, da seguinte maneira: uma incisão mediana era feita no abdômen exteriorizando assim o aparelho digestivo e reprodutor, seguindo-se a dissociação dos tecidos, feita por

estiletos. Parte das metacercárias encontradas na hemocele dos insetos foi fixada em AFA e o restante utilizado para as infecções dos hospedeiros definitivos.

3.6. Histologia dos hospedeiros intermediários e definitivos

Os moluscos e as esperanças infectadas experimentalmente, após terem sido constatadas as formas larvares do parasito em seus tecidos, foram fixados em líquido de Bouin ou Carnoy (BEHMER et al., 1976). Estes hospedeiros após a fixação, foram desidratados na série crescente de alcoóis, diafanizados e embebidos em parafina. Os cortes foram realizados na espessura de 7 μ m, sendo fixados de 4 à 5 cortes por lâmina; corados e montados em bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula.

As técnicas de coloração utilizados para os moluscos foram: a) hematoxilina-eosina; b) tricromo de Gomori (BEHMER et al., 1976). Dois moluscos isentos de infecção sofreram o mesmo processo acima descrito. No caso das esperanças, três espécimens *C. saltator* após o nono, décimo quinto e vigésimo terceiro dia pós-infecção com um esporocisto, foram corados pela hematoxilina-eosina, tricromo de Gomori e orceína (BEHMER et al., 1976), a fim de se evidenciar a natureza elástica da parede do cisto das metacercárias.

Dos caprinos infectados experimentalmente, foram retirados fragmentos de pâncreas parasitados que foram fixados em formalina 10%, após o exame e recuperação de todos os trematódeos

encontrados nestes órgãos. Posteriormente, os fragmentos dos órgãos foram desidratadas na série crescente de alcoóis, diafanizados, embebidos em parafina e cortados na espessura de 7 μm , sendo corados pela hematoxilina-eosina e montados em bálsamo do Canadá, entre lâmina e lamínula.

As fotomicrografias foram obtidas com o auxílio de um microscópio Carl-Zeiss ou DIALUX 20 EB. As medidas feitas com o auxílio de ocular micrométrica Wild, sendo dadas em milímetros (mm) ou em micrômetros (μm).

4. RESULTADOS

4.1. Infecção experimental

a) Primeiro hospedeiro intermediário

A Tabela 1 mostra o resultado da infecção experimental de 75 caramujos com 100 ovos de *E. coelomaticum*, sub-divididos em cinco grupos. A percentagem média de infecção foi de 24%. Outros 75 caramujos foram também infectados com 100 ovos de *E. coelomaticum* e sub-divididos em cinco grupos. Destes moluscos, somente restaram quatro sobreviventes, sendo que o último continuou eliminando esporocistos por um período de três meses a mais.

Aos 15 dias pós-infecção foram observados esporocistos de primeira geração disseminados e fixados na serosa do intestino, comumente no seu primeiro terço e também na face dorsal da glândula digestiva. Alguns se apresentavam entre os folículos glandulares, chegando, às vezes, a romper a túnica própria. Alguns destes esporocistos podiam ser observados na

TABELA 1.

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Bradybaena*
similaris COM 100 OVOS DE *Eurytrema coelomaticum*

Grupo	Nº de moluscos utilizados	Dias pós-infecção	Positivos	Percentagem
I	15	15	6	40%
II	15	30	3	20%
III	15	60	4	26%
IV	15	100	3	20%
V	15	150	2	13,3%
TOTAL	75		18	24%

glândula digestiva, após a dissecação, devido a sua coloração branco-leitosa brilhante, eram arredondados e destacavam-se da cor parda escura da glândula digestiva. Nestes esporocistos podiam ser vistas inúmeras células irregulares, de núcleo pequeno, as células germinativas. Estes esporocistos variavam de 0,15-0,25 mm de comprimento por 0,1-0,13 mm de largura.

Aos 30 dias, os esporocistos atingiam o comprimento de 1,50 mm por 1,0 mm de largura, em média, contendo no seu interior esporocistos de segunda geração em vários estágios iniciais de desenvolvimento.

Aos 60 dias, os esporocistos de segunda geração se tornavam alongados, ainda no interior do esporocisto de primeira geração, formando lobações. Dentro deles, ocorriam em diferentes estágios de desenvolvimento, embriões de cercárias. O esporocisto de primeira geração pode aparecer fixado à parede do intestino do molusco envolvido ainda por uma membrana. Em um exemplar observado, foram contados 18 esporocistos de segunda geração, sendo que a metade deles demonstraram claramente as células germinativas diferenciadas. A parede celular destes esporocistos possuía 15 μm de espessura, sendo que os esporocistos que não possuíam as paredes diferenciadas mediam 0,18 mm de comprimento por 0,11 mm de largura. Já os esporocistos jovens, iniciavam a sua formação, possuindo morfologia alongada, medindo 0,37 mm de comprimento por 0,19 mm de largura, ou arredondada apresentando diâmetro

de 0,168 mm. As células germinativas dos esporocistos de segunda geração chegavam à 115 μm de diâmetro.

Os lóbulos dos esporocistos se tornavam mais proeminentes aos 100 dias. A partir dos 100 dias não se detectou a presença de esporocistos de primeira geração.

Os esporocistos de segunda geração estavam localizados próximos ao intestino do molusco na sua face ventral, anteriormente à massa visceral. As cercárias já se encontravam em desenvolvimento ou quase formadas no interior de alguns esporocistos. Estes esporocistos eram alongados, medindo cerca de 0,168 à 0,220 mm de comprimento. As cercárias possuíam cauda e ventosa formadas. Nas cercárias maiores, o comprimento do corpo atingia 175 μm . Esporocistos em diversos estágios de desenvolvimento, e tamanhos variados, eram encontrados disseminados por toda a glândula digestiva e ao longo do intestino, em direção à região do pneumóstoma do molusco, e apresentavam movimentos lentos de contração e extensão.

Próximo ao período de eliminação, os esporocistos se encontravam quase que totalmente desenvolvidos. A morfologia destes esporocistos eliminados espontaneamente era particular. Apresentavam-se como um saco oval ou arredondado, transparente, onde no seu interior as cercárias se movimentavam lentamente (Fig. 1). Estas cercárias se encontravam concentradas e dispostas em espiral, envolvidas por um envelope transparente, o endocisto.

Das extremidades do saco partiam dois filamentos: um

anterior, pequeno e de formato linguiforme, e um posterior, de comprimento duas vezes maior que o anterior apresentando no seu terço final uma formação saculiforme, só que bem menor do que o saco que albergava as cercárias. As medidas dos esporocistos expelidos variavam de 4,02-6,22 mm de comprimento por 0,8-1,03 mm de largura, não apresentando poro de nascimento.

O período parasitário do *E. coelomaticum* nos três moluscos estudados, até a eliminação de esporocistos, variou de 143 à 159 dias. Os esporocistos foram eliminados em torno de 1 à 2 horas da madrugada, e somente em um caso às 7 horas da manhã. Apareciam em grupos, envolvidos por uma substância pegajosa e transparente, de preferência os esporocistos se encontravam disseminados na face superior da placa de Petri.

As cercárias obtidas pela dissecação dos esporocistos eram do tipo microcerco, apresentando um estilete na extremidade da ventosa oral (Fig. 2). O modelo das células flama observado foi de $2[(2+2+2) + (2+2+2)]$ e o comprimento do corpo variava de 241-319 μm por 92-138 μm de largura, sendo que os diâmetros das ventosas oral e ventral, variavam entre 34 e 45 μm e, 34,5 μm e 57,5 μm , respectivamente. A cauda media 16,1 a 27,6 μm de comprimento, por 23 a 29,9 μm de largura, apresentando na sua extremidade posterior pequenos pêlos. O número de cercárias por esporocisto variou entre 122 e 200.

O período de eliminação de esporocistos conforme a Figura 3, durou cerca de 33 dias, sendo que o número máximo de esporocistos eliminados foi de 22, e o número mínimo de qua-

tro. A eliminação dos esporocistos aconteceu, predominantemente, em intervalos de dois em dois dias. Na Figura 4, o período de eliminação durou 15 dias, sendo que o número máximo de esporocistos foi de 11 e o número mínimo de cinco, em intervalos de eliminação com o predomínio de um dia. Na Figura 5, o período de eliminação durou 21 dias, sendo que o número máximo de esporocistos eliminados foi de 13 e o mínimo, um. A frequência de eliminação deu-se com o predomínio de um dia. Três moluscos morreram sem motivo aparente, após esta eliminação, mas um outro molusco permaneceu eliminando esporocistos durante mais três meses.

b) Segundo hospedeiro intermediário

As infecções do *C. saltator* ocorreram de forma satisfatória assim como a manutenção dos insetos em cativeiro.

Espécimens de *C. saltator* ingeriram rapidamente os esporocistos de *E. coelomaticum* colocados nas placas de Petri. Após as infecções, os insetos não mostraram alteração de comportamento, quando colocados nas gaiolas para manutenção.

Das 35 esperanças infectadas com um esporocisto, 20 apresentaram metacercárias no seu interior. Estas metacercárias se localizavam tanto no abdômen, quanto no tórax do inseto, mas ocorreram com maior frequência no abdômen. O nú-

mero de metacercárias por inseto variou de 64 à 80, em cinco insetos observados (72 em média), e as medidas dos cistos aos 23 dias pós-infecção variou entre 322 e 368 μm de comprimento, por 184 μm de largura.

Os cistos possuíam um aspecto brilhante de coloração marrom pálido, eram arredondados ou ovais (Fig. 6) e demonstravam uma parede bem delimitada e lisa, sendo difícil rompê-los sem danificar os parasitos.

De acordo com a Figura 7, os cortes histológicos dos insetos corados pela hematoxilina-eosina demonstraram que as metacercárias estavam disseminadas nesta cavidade, sendo envolvidas por um tecido frouxo acidofílico. Os cistos eram compostos de uma parede que podia aparecer enrugada ou lisa, sendo que em alguns cortes possuía um contorno pouco visível. Esta parede era acelular e de coloração basofílica. O parasito demonstrou uma coloração eosinofílica na região muscular das ventosas e o restante do corpo apresentou granulações basofílicas. A coloração pelo tricromo de Gomori evidenciou que a parede que forma o cisto, assumiu uma coloração verde. Os parasitos se coraram também de verde na sua região muscular e no restante do corpo observaram-se granulações vermelhas bem escuras (Fig. 8).

Através da coloração pela orceína, a parede dos cistos apresentaram-se descoradas, enquanto o corpo dos parasitos apresentavam uma coloração vermelho pálido (Figura 9).

A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes histo-

TABELA 2.

RESULTADOS DOS TESTES HISTOQUÍMICOS SOBRE
 A PARTE DOS CISTOS DAS METACERCÁRIAS DE *Eurytrema*
coelomalicum EM *Conocephalus saltator* INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Técnica	Parede do cisto	Camada muscular do parasito	Pigmentação do corpo	Resultado
Hematoxilina - eosina	Azul claro	Vermelho	Granulações basofílicas	Azul - cálcio Rosa - citoplasma Vermelho - granulações eosinófilas Azul claro - mucoproteína
Tricomo de Gomori	Verde	Verde	Granulações vermelhas escuras	Vermelho - fibras musculares Azul ou verde claro - fibras colágenas Prêto - núcleo
Orceína	Transparente	Vermelho claro	Sem granulações	Transparente - colágeno Violeta - fibra elástica Vermelho - elastina

químicos realizados com as metacercárias de *E. coelomaticum* em esperanças infectadas experimentalmente.

O resultado obtido com as técnicas empregadas indica que fibras colágenas podem ser um dos constituintes que formam esta parede.

c) Hospedeiros vertebrados

A Tabela 3 mostra os resultados das infecções experimentais realizadas nos hospedeiros vertebrados. Todos os 10 camundongos Balb C e os quatro ratos Whistar apresentaram resultados negativos durante as necrópsias. Dos seis caprinos, apenas dois adquiriram a infecção, ambos haviam sido infectados com 10 *C. saltator*, calculando-se que cada inseto albergava 200 metacercárias. Destes caprinos, foram recuperados 310 *E. coelomaticum* de um e 88 de outro. Um caprino foi infectado com um *C. saltator* que havia sido infectado experimentalmente e não adquiriu a infecção.

Os espécimens de *E. coelomaticum* coletados dos caprinos experimentalmente infectados eram de tamanho muito menor do que os coletados dos bovinos naturalmente infectados (Tabela 4). Os trematódeos coletados do caprino nº5 apresentaram alterações significativas nos órgãos reprodutivos. Testículos e ovários estavam com o contorno pouco definido, os testículos apresentavam um formato estrelar. Alguns exemplares apesar de possuírem ovos, não apresentavam as glândulas vitelo-

TABELA 3.

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE HOSPEDEIROS VERTEBRADOS COM
METACERCÁRIAS DE *Eurytrema coelomaticum* OBTIDAS DE *Conocephalus saltator*

Hospedeiros	Nº	Necrópsia dias pós- infecção	Nº de insetos ou de metacercárias	Nº de parasitos recuperados	Percentagem de parasitos recuperados
Camundongos Balb/c normal	1	30	100 metacerc.	0	0
	2	60	1 inseto ¹	0	0
	3	60	1 inseto	0	0
	4	60	1 inseto	0	0
	5	60	1 inseto	0	0
	6	60	1 inseto	0	0
	7	60	1 inseto	0	0
	8	60	1 inseto	0	0
	9	60	1 inseto	0	0
	10	80	300 metacerc.	0	0
Ratos Whistar	1	30	100 metacerc.	0	0
	2	30	5 insetos	0	0
	3	60	1 inseto	0	0
	4	60	1000 metacerc.	0	0
Caprinos	1 ²	30	1 inseto	0	0
	2	30	2000 metacerc.	0	0
	3	30	10 insetos	0	0
	4	40	10 insetos	0	0
	5 ³	40	10 insetos	310	15,5%
	6	60	10 insetos	88	1,76%

¹ 1 inseto = 200 metacercárias (estimativa do autor).

² Animal infectado com *Conocephalus saltator* obtido de infecção no laboratório.

³ Animal infectado parceladamente com 10 insetos, com intervalos de 10 dias.

TABELA 4.
 BIOMETRIA COMPARADA DOS
 PRINCIPAIS CARACTERES DE TRÊS AMOSTRAS DE
Eurytrema coelomaticum COLETADOS DE UM BOVINO, NATURALMENTE
 INFECTADO E DE DOIS CAPRINOS, EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS. CADA
 AMOSTRA É COMPOSTA POR 10 ESPÉCIMENS E AS MEDIDAS SÃO DADAS EM MILÍMETROS

Estrutura	Bovino	Caprino nº 5	Caprino nº 6
Comprimento do corpo	8,01-10,49	2,83-4,11	3,42-4,52
Largura do corpo	3,39-4,52	1,76-3,53	1,22-1,77
Ventosa oral (comprimento)	0,76-0,97	0,36-0,47	0,31-0,50
Ventosa oral (largura)	0,76-0,97	0,31-0,40	0,31-0,44
Acetábulo (comprimento)	0,76-0,97	0,38-0,48	0,36-0,42
Acetábulo (largura)	0,64-0,97	0,38-0,47	0,34-0,45
Relação largura das ventosas	~ 1	~ 1	~ 1

gênicas, em outros, quando estas ocorriam, eram pouco desenvolvidas e muito reduzidas. Os ovos podiam ser observados no interior do útero, mas a maior parte destes ovos não estavam embrionados (Fig. 10).

O caprino nº 5 revelou um quadro de emagrecimento progressivo até o dia da necropsia. O pâncreas parasitado demonstrou, macroscopicamente, uma coloração muito pálida e um aspecto gelatinoso. Este animal além de *E. coelomaticum* apresentou um número muito elevado de nematóides dos gêneros *Haemonchus* e *Oesophagostomum*. Microscopicamente foi observada a distensão dos ductos pancreáticos notando-se nesta região marcante processo inflamatório crônico, caracterizado em especial, pela presença de monócitos em áreas da submucosa. A reação inflamatória estava mais localizada na região peri-canalicular. Fibrose foi observada em torno dos ductos associada a edema, na região intersticial do órgão. A par destas alterações, observou-se ainda um processo degenerativo do tecido glandular, onde existiam pequenas áreas glandulares e tentativa de proliferação dos ductos sem contudo chegar ao estado inicial da glândula.

4.2. Hospedeiros Intermediários Naturais

a) Primeiro hospedeiros

O molusco *B. similis* foi encontrado abrigan-do formas larvares do *E. coelomaticum*, nas propriedades estu-

dadas, em Lorena e Pindamonhangaba, SP. Os esporocistos estavam disseminados, tanto na glândula digestiva, quanto na serosa do intestino, em número que variava de um a muitos, em um mesmo hospedeiro. Muitas vezes foram observados esporocistos sob diversas formas e em diversos estágios de desenvolvimento.

Os esporocistos de primeira geração eram arredondados, ovais ou achatados, com parede brilhante, esbranquiçada ou amarelada. Estes esporocistos encontravam-se embebidos na região dorsal ou ventral da glândula digestiva, chegando a vizinhança do ovotestis e da glândula de albumina. Também foram encontrados fixados à serosa do intestino, formando massas de aspecto granular de diversos tamanhos.

Os esporocistos filhos jovens não possuíam forma definida e ocorriam também em grande número. Atingiam um comprimento de 4,18 mm à 5,31 mm, e numerosas células germinativas ou cercárias jovens apareciam no seu interior. Alguns destes esporocistos eram encontrados espalhados na cavidade visceral do molusco, atingindo órgãos situados mais anteriormente e tomando algum espaço devido ao seu tamanho aumentado. Muitas vezes foi possível identificar moluscos infectados com esporocistos de segunda geração, pela simples transparência através da concha, principalmente em sua face ventral logo na periferia da cavidade pericárdica, mas nunca no seu interior. Foi possível observar que estas massas opacas de esporocistos atingiam de preferência, as últimas espiras da concha.

A prevalência média de *E. coelomaticum* em *B. similaris*

observada em Lorena, SP, no período entre agosto e novembro, 1984, foi 9,75%; dos 123 caramujos examinados, 12 estavam parasitados. A Figura 11 mostra o número de caramujos examinados e o número de positivos em cada amostra neste período. A maior prevalência foi observada em agosto (17,85%) seguida de outubro (15,78%), novembro (14,28%) e setembro (4,34%).

No município de Pindamonhangaba, SP, a prevalência do *E. coelomaticum* em *B. similaris* foi estudada em três propriedades, durante o período de janeiro à junho, 1985 (Fig. 11). Para esta região, a prevalência média foi 20,15% em 540 moluscos examinados, ou seja, 109 caramujos estavam infectados com *E. coelomaticum*. A maior prevalência observada foi a do mês de junho (75%), seguida pelos meses de maio (65,97%), julho (11,84%), março (7,69%), fevereiro (5,5%) e janeiro (3,33%). No mês de abril, nenhum molusco examinado apresentou parasito. No mês de março foi verificado o maior número de moluscos (130), seguido do mês de fevereiro (127), maio (97), julho (76), abril (48), junho (32) e finalmente janeiro (30). Os meses de abril e de janeiro apresentaram os menores números de moluscos parasitados, 0 e 1 respectivamente, enquanto que nos meses de maio e junho os maiores, 58 e 24.

b) Segundo hospedeiro

Várias espécies de invertebrados foram pesquisados. Além de outras famílias de Orthoptera, como Gryllidae e Acrid-

diidae, alguns himenópteros também foram dissecados sem apresentar as formas larvares do parasito.

As esperanças do gênero *Conocephalus*, coletadas na natureza albergavam formas encistadas do *E. coelomaticum*, as metacercárias. Os insetos foram capturados de preferência próximos aos locais onde predominavam gramíneas bastante verdes que margeavam charcos, valetas e depressões do terreno.

Na dissecação dos insetos, inúmeros cistos encontravam-se disseminados no hemoceloma, tanto no tórax, quanto no abdômen, havendo uma predominância pela região mais posterior do corpo, na altura do aparelho reprodutor. As metacercárias ocorriam em grupos, aglutinadas ou em cordões entre os órgãos internos do inseto, envolvendo o tubo digestivo posterior ou entre os túbulos de Malpighi. Algumas metacercárias desencistaram-se espontaneamente durante a dissecação, em solução fisiológica, mas estas metacercárias permaneceram vivas por pouco tempo. O número médio de metacercárias encontradas por inseto foi de 200. As paredes de alguns cistos se apresentavam opacas, espessas e de coloração rósea ou amarelada mascarando a visualização do parasito no seu interior. Os cistos eram arredondados ou um pouco ovalados medindo cerca de 200 a 400 μm de comprimento por 207 a 437 μm de largura, sendo que os parasitos desencistados apresentaram medidas que variavam de 570 a 640 μm de comprimento por 330 a 380 μm de largura.

Larvas de dípteros, provavelmente da família Tachinidae foram encontradas no interior do abdômen das esperanças

assim como nematóides foram encontrados parasitando estas esperanças. Entretanto, os insetos que apresentavam larvas de tachinídeos ou nematóides, não apresentaram metacercárias de *Eurytrema*.

Durante o período entre agosto e novembro de 1984, 150 esperanças do gênero *Conocephalus* foram coletadas em Lorena, SP e examinadas. A Figura 12 mostra a distribuição das freqüências destas amostras. Nenhum inseto apresentou metacercárias de *E. coelomaticum*. A prevalência média de *E. coelomaticum* em *Conocephalus* nas três propriedades estudadas no município de Pindamonhangaba, SP, no período entre janeiro e julho de 1985, foi de 10,96%. Das 301 esperanças examinadas, 33 apresentaram metacercárias. A maior prevalência nos meses estudados, foi a de março (70%), seguida de abril (28,84%), maio (1,28%) e junho (0,62%). A Figura 12 mostra o número de insetos examinados e o número de positivos em cada amostra neste período. Nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e julho não foram realizadas capturas de insetos na natureza.

A Tabela 5 mostra a análise das amostras de *Conocephalus* encontrados naturalmente infectados com metacercárias de *E. coelomaticum* que foram coletadas para a infecção experimental dos caprinos. Duas espécies de *Conocephalus* são hospedeiras naturais de *E. coelomaticum* na região estudada, (Fig. 13) o *C. saltator* e uma segunda espécie que até a presente data não foi identificada, o *Conocephalus* sp. As esperanças *C. saltator* (Fig. 14) foram as que apresentaram maior percen-

TABELA 5.

ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DE METACERCÁRIAS DE *Eurytrema*
coelomaticum EM AMOSTRAS DE ESPÉCIES DE *Conocephalus* NATURALMENTE INFECTADOS

Amostras	Nº de insetos examinados				Nº de insetos infectados				Prevalência	
	<i>C. saltator</i>		<i>Conocephalus sp.</i>		<i>C. saltator</i>		<i>Conocephalus sp.</i>		<i>C. saltator</i>	<i>Conocephalus sp.</i>
	F	M	F	M	F	M	F	M		
Agosto	27	4	0	18	1	1	0	0	6,45%	0%
Setembro	20	12	5	11	1	2	0	0	9,37%	0%
Setembro	15	5	35	8	2	0	1	1	10%	4,6%
Setembro	23	2	12	12	2	1	0	3	12%	12,5%
Setembro	7	5	14	10	1	0	0	0	8,3%	0%
Setembro	28	8	10	34	2	2	2	3	11,1%	11,36%
Setembro	25	30	16	18	1	0	0	0	1,8%	0%
Outubro	17	9	6	11	5	2	0	3	43%	17,6%
Outubro	29	23	0	16	1	2	0	1	5,7%	6,25%
Total Examinado	191	98	98	138	16	10	3	11	8,9%	5,9%
Σ	289		236		26		14			

tagem de infecção na natureza. Dos 289 *C. saltator* examinados, 26 albergavam metacercárias, correspondendo a uma prevalência de 8,9%. Das 26 esperanças infectadas, 16 eram machos e 10 eram fêmeas. Com relação ao *Conocephalus sp.* (Fig. 15), 230 exemplares foram examinados e 14 apresentaram-se infectados, sendo que destes, três exemplares eram machos e 11 fêmeas. A prevalência de *E. coelomaticum* em *Conocephalus sp.* foi de 5,9%. A Figura 16 mostra o número de insetos examinados e o número de positivos em cada amostra no período de agosto a outubro, 1986.

4.3. Alterações histopatológicas observadas no primeiro hospedeiro intermediário

Os moluscos infectados com esporocistos de *E. coelomaticum* apresentavam estas formas distribuídas pela massa visceral, revelando algumas alterações estruturais e celulares locais, que foram agravadas possivelmente em função do número e tamanho de esporocistos que lá se desenvolviam.

A análise comparativa entre cortes histológicos de caramujos não infectados (Fig. 23) e cortes histológicos de caramujos infectados, revelou alterações. Na glândula digestiva, quando havia desenvolvimento de um grande número de esporocistos de primeira geração, ocorria compressão dos ácinos, com modificações da estrutura dos túbulos. Configuração anormal, podia ser observada em alguns cortes onde os túbulos se apresentavam com luz muito diminuída (Fig. 17). O contorno das célu-

las que compunham os túbulos eram irregulares, e em algumas áreas não podia ser observado. Esta desorganização era constante quando os esporocistos estavam presentes neste órgão (Figs. 18 e 19). Os esporocistos que se desenvolviam entre os ácinos da glândula digestiva, provocavam a diminuição do tecido conectivo intertubular por compressão. Esta compressão chegava muitas vezes à total destruição dos túbulos (Fig. 18). Em dois moluscos infectados, em períodos distintos pós-infecção, foi observado grande acúmulo de grânulos amarelados, distribuídos por todo o tecido glandular (Fig. 20). Foi observado um aumento da vacuolização no citoplasma dos ácinos glandulares, assim como o núcleo destas células apresentavam-se muitas vezes pequenos, atípicos e picnóticos (Fig. 19). Grandes corpúsculos de coloração marrom escuro apareciam no interior dos vacúolos localizados nas células excretoras (Fig. 20). Quando os esporocistos estavam fixados à serosa do intestino, notavam-se áreas de desorganização epitelial (Fig. 21). A técnica de coloração pelo método de tricromo de Gomori revelou coloração azul na região de contato da serosa com a parede do esporocisto, demonstrando um provável acúmulo de muco nesta região.

No início da infecção, as alterações foram observadas nos locais próximos aos esporocistos em desenvolvimento. A partir dos 60 dias pós-infecção, dependendo da localização dos esporocistos, a compressão dos ácinos da glândula digestiva era muito evidente. Com a multiplicação e desenvolvimen-

to, as larvas iam tomando espaços na massa visceral (Fig. 17) e atingindo indiretamente outros órgãos, como por exemplo o ovotestis.

Os cortes histológicos da região do ovotestis revelaram que a disposição dos folículos se apresentava desorganizada e degenerada devido à pressão dos esporocistos que comprimiam os tecidos vizinhos. A destruição do tecido do ovotestis foi evidenciada ao comparar-se, cortes de caramujos não infectados com os cortes realizados em caramujos infectados. Nos caramujos infectados, os ovócitos apresentavam-se em número reduzido, muitas vezes sem contorno definido e com núcleos picnóticos (Fig. 22).

5. DISCUSSÃO

5.1. Infecção experimental

a) Primeiro hospedeiro intermediário

A mortalidade de moluscos infectados com ovos de *E. pancreaticum* foi também registrada por TANG (1950) quando infectou 53 moluscos com uma quantidade desconhecida de ovos. Cerca de 30 moluscos morreram nos primeiros dias e alguns continuaram a morrer após a infecção, restando quatro meses depois, apenas 13, dos quais 12 estavam positivos. Dos moluscos infectados experimentalmente, 24% apresentaram infecção, índice que pode ser considerado baixo. Entre as razões que podem ser levantadas com relação a este resultado, uma refere-se à infectividade do miracídio. Apesar dos ovos utilizados para as infecções experimentais terem sido selecionados sob estereomicroscópio, eles podiam conter miracídios, fisiologicamente, imaturos e que foram eliminados pelo verme apenas devido ao estímulo da mudança de ambiente. Outra razão pode ter sido a metodologia u-

utilizada para infecção, onde grupos de 15 caramujos foram infectados com 100 ovos; talvez nem todos os caramujos do grupo tenham ingerido ovos. WRIGHT (1966) cita que além do número de ovos ingeridos e da infectividade do miracídio, a idade dos moluscos, a temperatura ambiental e a dieta alimentar podem ser fatores importantes para assegurar a infecção.

Aos 15 dias, os esporocistos de primeira geração observados eram menores do que aqueles observados por MIYATA (1965) e maiores do que aqueles observados por TANG (1950) aos 30 dias, apresentando uma morfologia semelhante. Confirmamos as observações destes autores com relação a presença de células irregulares de núcleo pequeno (células germinativas) localizadas no interior do esporocisto de primeira geração.

Aos 30 dias, observamos que os esporocistos de primeira geração atingiam um tamanho bem superior aqueles encontrados por TANG (1950) e MIYATA (1965). Encontramos algumas diferenças quanto à localização do esporocistos de primeira geração no interior do molusco. TANG (1950) observou, apenas em uma ocasião, estes esporocistos fixados à serosa do intestino do molusco, concordando com as observações de MIYATA (1965) e não com as nossas, onde por diversas vezes, esporocistos de primeira geração, foram observados disseminados entre os ácinos da glândula digestiva.

A localização dos esporocistos no interior do molusco apresenta algumas diferenças, mas basicamente o órgão de eleição para o desenvolvimento dos esporocistos é a glândula digestiva, podendo atingir também outros órgãos. De acordo com

WRIGHT (1966) e CORT et al. (1954) os esporocistos podem desenvolver-se na glândula digestiva, fazendo a migração, ou não, para as outras regiões do molusco até a eliminação através do pneumóstoma do molusco.

Acreditamos que o desenvolvimento do esporocisto de primeira geração de *E. coelomaticum* pode ocorrer tanto na glândula digestiva quanto na serosa do intestino do molusco, mas quando se aproxima o período de eliminação, com esporocistos de segunda geração maduros, a migração ocorre para as partes mais anteriores do molusco até atingirem o meio ambiente. DENTON (1944) e CORT et al. (1954) assinalam que este fenômeno é comum entre os Dicrocoeliídeos.

No Brasil, RAGUSA & CAMPOS (1976) identificaram *B. similaris* como sendo o primeiro hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum*. Estes investigadores afirmam, e ilustram, que uma grande concentração de formas larvares de *E. coelomaticum* foi encontrada na cavidade pericárdica de *B. similaris*, bem como organismos saculiformes foram encontrados na "câmara respiratória" e na glândula digestiva. Entretanto, as fotografias que ilustram o trabalho de RAGUSA & CAMPOS (op. cit.), mostram que estes autores confundiram as metacercárias do trematódeo brachylaemídeo *Postharmostomum gallinum* Witenberg, cujo ciclo já foi descrito por DUARTE (1980) e que são freqüentemente encontradas livres na cavidade pericárdica de *B. similaris*, como formas larvais de *E. coelomaticum*.

A morfologia dos esporocistos expelidos está de acor-

do com os achados de TANG & TANG (1977) para *E. coelomaticum*. As medidas por nós registradas revelaram-se um pouco menores do que aquelas encontradas por estes investigadores.

O estudo mais detalhado sobre o período parasitário e ritmo de eliminação dos esporocistos de *Eurytrema* foi realizado por CHINONE et al. (1976) ao estudarem *E. pancreaticum* em moluscos criados sob condições de temperatura controlada. Apesar do presente trabalho ter sido realizado sob condições distintas de manutenção dos caramujos, parte dos resultados obtidos se assemelham aos de CHINONE et al. (op. cit.).

Segundo MALEK & CHENG (1974), fatores ambientais e nutricionais atuantes no hospedeiro molusco podem interferir direta ou indiretamente no desenvolvimento de formas larvares de trematódeos. CHINONE et al. (1976) advertem que a luminosidade pode ter interferido no desenvolvimento de *E. pancreaticum* no molusco, mesmo sob temperatura controlada. De acordo com a revisão apresentada por YAMAGUTI (1975) pode se notar que existe muita variação com relação ao tempo de desenvolvimento tanto para *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum*, e esta variação provavelmente é devida aos fatores ambientais aos quais estão sujeitos os hospedeiros intermediários. No caso de *E. coelomaticum*, o período parasitário observado neste trabalho variou de 143 à 159 dias em três moluscos estudados. Estes resultados se aproximam daqueles encontrados por TANG & TANG (1977), SAKAMOTO et al. (1980) que encontraram 150 à 180 dias e 150 dias respectivamente.

A morfologia, dimensões e características das cercárias foram estudadas por TANG (1950) e MIYATA (1965) para *E. pancreaticum* e TANG & TANG (1977), SAKAMOTO et al. (1980) para *E. coelomaticum*. Ocorre uma variação muito grande no número de cercárias observadas por esporocisto. TANG (1950) e MIYATA (1965) assinalam 144 a 218 e 40 a 140, respectivamente, para *E. pancreaticum*. Nossos achados estão próximos destes investigadores, ao contarmos 122 a 200 cercárias por esporocisto de *E. coelomaticum*. ITAGAKI & CHINONE (1982) assinalam que o número de cercárias por esporocisto de *E. coelomaticum* está em torno de 200, fazendo com que nossos achados se aproximem bastante destes dados.

Algumas características das cercárias, tais como comprimento do corpo, morfologia geral, diâmetro das ventosas, modelo das células flama, são semelhantes aqueles observados por TANG & TANG (1977) e SAKAMOTO et al. (1980) para *E. coelomaticum*. Notamos que o diâmetro da ventosa ventral é ligeiramente superior à ventosa oral e que o modelo das células flama é igual aqueles observados por estes investigadores.

b) Segundo hospedeiro intermediário

O índice de positividade nas esperanças infectadas, experimentalmente, com esporocistos de *E. coelomaticum* foi muito alto, indicando que *C. saltator* pode ser o hospedeiro adequado no laboratório. As esperanças desta espécie ob-

servadas aos 9, 15 e 23 dias pós-infecção apresentaram metacercárias de *E. coelomaticum*, confirmadas através de corte histológicos dos insetos. TANG & TANG (1977) realizaram infecções experimentais em diversas espécies de Ortópteros e observaram que quando o inseto não era o hospedeiro adequado, como foi observado em *Gryllus*, as metacercárias morriam pela ação celular proveniente do hospedeiro.

O estudo mais detalhado sobre o desenvolvimento de *E. coelomaticum* no inseto hospedeiro foi realizado por TANG & TANG (op. cit.) no qual discorreram sobre a quantidade de esporocistos administrados experimentalmente aos insetos, evidenciando que estes podiam albergar de uma a 461 metacercárias. Em uma esperança naturalmente infectada, estes autores observaram que o número de metacercárias variava entre 23 e 1444. Encontramos um número médio de metacercárias por inseto, experimentalmente infectado, muito baixo com relação aos trabalhos de TANG & TANG (op. cit.). Entretanto, BASCH (1966) chama atenção que é difícil assegurar a maturidade do esporocisto e que, algumas cercárias podem ser mortas pelas peças bucais da esperança, regurgitadas, ou não penetrarem no intestino do inseto devido a causas desconhecidas.

Quanto às medidas das metacercárias, nossos achados aproximavam-se aos registros de ITAGAKI & CHINONE (1982) para *E. coelomaticum*. Estes investigadores observaram que as metacercárias deste parasito atingem 350 μm , enquanto que as metacercárias por nós medidas, variaram de 322 a 368 μm de compri-

mento.

c) Hospedeiros vertebrados

BASCH (1966) foi quem primeiro realizou a infecção experimental em caprinos com *E. pancreaticum*, enquanto que CHINONE & ITAGAKI (1976), trabalharam com coelhos, caprinos e um bovino, sendo que este bovino não adquiriu a infecção.

Outros investigadores infectaram animais com *E. coelomaticum*: TANG & TANG (1977) infectaram coelhos, cobaios e caprinos, SAKAMOTO et al. (1980) infectaram coelhos, caprinos e camundongos de várias linhagens e CHINONE et al. (1984) infectaram gatos. Destes animais utilizados, somente os caprinos, camundongos Balb/c nus heterozigotos (Bal/c - nude/+) e gatos adquiriram as infecções, sendo que um parasito foi recuperado de um camundongo Balb/c normal, conforme registra SAKAMOTO et al. (op. cit.).

SAKAMOTO et al. (1980 e 1981) não obtiveram muito sucesso quando infectaram camundongos Balb/c normais. Nossos achados confirmam as observações destes investigadores, uma vez que os roedores por nós infectados não adquiriram a parasitose, demonstrando assim que os camundongos Balb/c normais e os ratos Whistar parecem possuir baixa susceptibilidade para *E. coelomaticum*, mesmo quando administrado um número grande de metacercárias a estes animais.

No presente trabalho foram recuperados 88 e 310 para-

sitos de dois caprinos infectados experimentalmente, isto provavelmente deve-se a fatores relacionados à infectividade das metacercárias como também foi observado por TANG & TANG (1977). Acreditamos que houve uma interferência relacionada com a maturidade das metacercárias que provavelmente não era a mesma para cada inseto, ou até para um mesmo inseto, uma vez que não temos condições de avaliar a quantidade de esporocistos que cada inseto pode ingerir na natureza, em diferentes períodos de exposição ao esporocisto.

LOOSS & CUFFEY (1907) registram que o tamanho do corpo de *E. coelomaticum* imaturos coletados de bovinos é de 7,5 x 3,5 - 4,74 mm. EDUARDO et al. (1976) estabelece que os parasitos obtidos de bovinos nas Filipinas medem 5,92 - 10,34 x 1,85 - 4,27 mm. TRAVASSOS et al. (1969) registram que o tamanho do corpo dos trematódeos em bovinos no Brasil é 10 - 13 x 6 - 8 mm TANG & TANG (1977) descrevem que os trematódeos recuperados de um caprino medem 3,913 - 6,171 x 2,077 - 3,206 mm. No presente trabalho, o tamanho dos helmintos coletados de um bovino, naturalmente infectado, e de dois caprinos, experimentalmente infectados, se aproxima aos registros dos investigadores citados acima, mas no caso dos caprinos ocorre uma diferença marcante de tamanho dos parasitos recuperados, quando comparamos aos achados de SAKAMOTO et al. (1980). Estes investigadores obtiveram, de caprinos infectados experimentalmente, parasitos medindo 5,50 - 10,00 x 1,77 - 2,85 mm aos 180 dias pós-infecção. Esta diferença de tamanho dos helmintos pode estar relacionada com o curso

do desenvolvimento dos trematódeos no hospedeiro, pela carga de parasitos encontrados no órgão ou pelo estado nutricional do hospedeiro interferindo negativamente no desenvolvimento dos parasitos. SAKAMOTO et al. (op. cit.) concluíram que não ocorreu uma diferença significativa entre o tamanho dos trematódeos obtidos de caprinos e de camundongos Balb/c nus heterozigotos infectados experimentalmente. Estes investigadores concluíram que os helmintos recuperados destes animais são maiores do que aqueles coletados de bovinos infectados naturalmente, quando os bovinos se mostravam altamente parasitados. Portanto, acreditamos que o estado nutricional do caprino nº 5, do qual foram recuperados 310 parasitos, tenha interferido no desenvolvimento de *E. coelomaticum*, com reflexo nas estruturas internas dos helmintos, como a glândula vitelogênica.

A relação do tamanho das ventosas de *E. coelomaticum* foi registrada por TRAVASSOS (1944), KIMURA (1966) in CHINONE & ITAGAKI (1976) e NOSAKA et al. (1970) in ISHII et al. (1983). Estes investigadores registram que esta relação é quase, ou igual a 1. Contudo, é possível que estas medidas possam variar durante o desenvolvimento dos helmintos, conforme assinalam CHINONE & ITAGAKI (op. cit.). De acordo com os nossos resultados, esta relação também é semelhante a 1, mesmo que a amostra de *E. coelomaticum* estudada tenha sido pequena.

5.2. Hospedeiros intermediários naturais

a) Primeiro hospedeiro intermediário

Nossas observações quanto ao habitat de *B. similaris* estão de acordo com as de BASCH (1965 e 1966) e TANG & TANG (1977). Encontramos diversos moluscos próximos às construções e disseminados nas hortas próximas aos estábulos, mas nunca nas pastagens, contrariando assim as observações de SAKAMOTO et al. (1980) para a mesma espécie de molusco encontrada no Japão. BASCH (1965) observou que estes moluscos se concentravam nos bolos fecais de bovinos. Por diversas vezes os encontramos em grandes concentrações próximos as esterqueiras ou nos canteiros de hortas onde fezes de bovinos são utilizados como adubo. As coletas dos moluscos *B. similaris* realizadas na natureza evidenciaram que esta espécie é o primeiro hospedeiro intermediário do *E. coelomaticum*, uma vez que as formas larvares do parasito foram encontradas disseminadas em diversos estágios de desenvolvimento no interior do molusco, formas estas que se assemelham aquelas descritas por TANG (1950) e MIYATA (1965).

Não existem registros sobre a percentagem de infecção de larvas de *E. coelomaticum* no primeiro e segundo hospedeiro intermediário no Brasil. Somente os registros de RAGUSA & CAMPOS (1976) na região do Vale do Paraíba, São Paulo que também foi pesquisado por nós. Estes investigadores evidenciaram a percentagem de infecção de 91,4% com 1.281 *B. similaris* dissecadas.

dos. Este valor é muito superior quando comparado aos resultados obtidos por diversos autores como TANG (1950) e BASCH (1965). Provavelmente isto deve-se ao engano que os pesquisadores brasileiros cometeram, ao confundirem as formas larvares com as de outro trematódeo.

A determinação da prevalência de *E. coelomaticum* em *B. similis* foi registrada por TANG & TANG (1977) na China. Estes pesquisadores encontraram o valor médio de 3,52% após vários anos de estudos, valor este considerado baixo, quando comparado aos 8,6% encontrados por SAKAMOTO et al. (1980) no Japão. Nossos achados demonstram que nas regiões estudadas, a percentagem de infecção dos moluscos em uma única propriedade, ou em três propriedades, são semelhantes, cerca de 9,75% e 10,96% respectivamente. Mas a percentagem de infecção nos 11 meses estudados foi de 5,47% valor este que se aproxima ao de BASCH (1966) para *E. pancreaticum* na Malásia, sem levar em conta a estação do ano estudada.

b) Segundo hospedeiro intermediário

BASCH (1965 e 1966) descobriu que o segundo hospedeiro intermediário de *E. pancreaticum* na Malásia era o *C. maculatus*, uma esperançã da família Tettigoniidae, assinando que 3,8% e 4% dos insetos estavam parasitados. TANG & TANG (1977) na China, registraram a prevalência média de 6,68% de *C. maculatus* infectados com *E. coelomaticum*

ao estudarem por vários anos a epidemiologia deste parasito. No Japão, SAKAMOTO et al. (1980) encontraram 18,3% e 42% de *C. maculatus* nos meses de julho e dezembro respectivamente. De acordo com os nossos resultados, as maiores percentagens de infecção das esperanças do gênero *Conocephalus* infectadas nos meses estudados foi de 70% e de 28,84% para os meses de março e abril respectivamente.

TANG & TANG (1977) registraram uma alta percentagem de infecção no verão, atingindo o pique no outono e caindo no inverno, mas não fizeram observações sobre o que acontecia com a velocidade de desenvolvimento do parasito nos moluscos durante o inverno. Os resultados de SAKAMOTO et al. (1980) contradizem aos de TANG & TANG (1977) e aos nossos. SAKAMOTO (op. cit.) encontraram no Japão, uma prevalência mais alta no inverno e não no verão. Os nossos resultados estão de acordo com os de TANG & TANG (op. cit.). A prevalência mais alta do presente trabalho foi a de março, final do verão, e a medida que o outono foi passando, as prevalências foram baixando. Entretanto, deve se ressaltar que a região do Vale do Paraíba, onde este estudo foi realizado, o inverno não é tão rigoroso, como acontece nas regiões que foram estudadas na China e no Japão. ITAGAKI & CHINONE (1982) chamaram atenção sobre a ação da temperatura ambiente, interferindo no desenvolvimento de *E. coelomaticum* no molusco, bem como na densidade populacional de moluscos e insetos.

Várias espécies de Tettigoniídeos tem sido incrimi-

nados como hospedeiros intermediários de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* conforme assinalou YAMAGUTI (1975). Não existem registros na literatura incriminando *C. saltator* como o segundo hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum*. Representantes desta espécie, assim como de outra espécie do gênero *Conocephalus*, identificada pelo entomologista do "Biosystematic and Beneficial Insects Institute", do "United State Department of Agriculture" (USDA) apenas como *Conocephalus sp.*, por não se comparar a nenhum outro espécime da U.S. National Collection, e que provavelmente seja uma espécie nova, foram encontrados com metacercárias deste parasito no campo. Acreditamos que possam existir outras espécies de esperanças responsáveis pela disseminação deste parasito no Brasil, uma vez que REHN & HEBARD (1915) identificaram várias espécies de esperanças do gênero *Conocephalus*, tanto no Brasil quanto na América do Sul.

5.3. Alterações histopatológicas observadas no primeiro hospedeiro intermediário

Não existe, na literatura analisada, nada sobre as alterações histopatológicas em *B. similaris* infectados com *E. coelomaticum*. CHENG & SNYDER (1962), WRIGHT (1966) e MALEK & CHENG (1974) apresentavam revisões sobre a ação das larvas de trematódeos digenéticos nos moluscos hospedeiros intermediários. CHENG & SNYDER (op. cit.) citam que os efeitos do parasitismo no molusco hospedeiro dependem do número e tamanho das larvas do parasito presentes no órgão. MALEK (1977) revela que este efeito se inicia após a penetração do miracídio, seguido da migração e maturação dos esporocistos filhos e que a glândula digestiva do molusco sofre uma destruição signifi-

cativa pela pressão exercida pelos parasitos. GOMES (1985) observou áreas de desorganização a nível tecidual ou celular em *L. columella* quando parasitadas por *F. hepatica*, chamando a atenção que estas áreas de desorganização só foram observadas quando a carga parasitária no caramujo era elevada. Diante destas observações, nossos achados confirmam que, uma vez presentes em grande quantidade, os esporocistos provocam alterações histopatológicas na glândula digestiva de *B. similaris*, podendo também atingir o ovotestis deste hospedeiro.

MALEK & CHENG (1974) registram que a maioria dos trematódeos digenéticos utilizam a glândula digestiva do molusco hospedeiro como sítio primário de infecção. Observamos que, quando o desenvolvimento inicial dos esporocistos se dá entre os folículos glandulares, ocorre a compressão destes folículos, com a degeneração dos túbulos, conforme foi citado por AGERSBORG (1924), REES (1936), JAMES (1965) e MALEK (1977). A redução dos túbulos da glândula digestiva e a destruição dos ácidos, com diminuição do tecido conectivo intertubular, parece ser provocada pela pressão crescente dos sacos germinativos dos esporocistos e não pela ingestão dos túbulos hepáticos, uma vez que esta ingestão só ocorre quando as rédias de certos trematódeos ingerem, avidamente, este órgão, como foi observado por PORTER et al. (1967), WILSON & DENISON (1980) e KABAT (1986). Os esporocistos de *E. coelomaticum* são estruturas saculiformes desprovidas de abertura oral, absorvendo nutrientes, como glicogênio por contato de seu tegumento com os tecidos do hospedeiro.

deiro. Assim, acreditamos que os danos promovidos por eles sejam, unicamente, devido a compressão exercida pelos sacos germinativos sobre este órgão, e pelo bloqueio da circulação de hemolinfa.

Os tipos de granulações encontradas no interior das células que compõem os folículos glandulares dos moluscos parasitados foram assinalado por CHENG & SNYDER (1962) e PORTER et al. (1967), que registraram a presença de produtos de excreção aumentados, assim como a vacuolização do citoplasma dos ácinos glandulares, quando os moluscos se encontravam altamente parasitados. Esta vacuolização do citoplasma das células, também foi constatada por GOMES (1985) em *L. columella* parasitados por *F. hepatica*. Acreditamos que os grânulos de coloração marrom escuro localizados no interior dos vacúolos dos ácinos, sejam produtos de excreção, embora não tenham sido feitos testes histoquímicos para constatar a sua natureza. Já os pigmentos amarelados que estão distribuídos pelo tecido glandular dos moluscos parasitados, nos leva a acreditar que seja alguma reação individual proveniente de uma causa ainda desconhecida.

HYMAN (1967) descreve o intestino dos Gastrópodes como sendo, geralmente, forrado por um epitélio de células ciliadas altas, comprimidas por mucócitos, ou recebendo glândulas subepiteliais produtores de muco. Acreditamos que, provavelmente, a desorganização epitelial por nós observada, tenha sido provocada pela presença das formas larvares de *E. coelomaticum* na serosa do intestino de *B. similaris*, chegando a provocar um

aumento de muco. Esta observação carece de estudos, uma vez que na literatura consultada inexistem registros a este respeito.

REES (1936), PAN (1965), MALEK & CHENG (1974), WILSON & DENISON (1980), GOMES (1985) e KABAT (1986) registraram a redução da fecundidade dos moluscos parasitados por larvas de trematódeos. As rédias de alguns trematódeos podem provocar uma diminuição do tecido glandular, como é o caso de *Eurytrema*, onde os esporocistos causam a compressão destes órgãos, através de um processo mecânico, que leva juntamente com o bloqueio hemolinfático como conseqüência à alterações fisiológicas do ovotestis. Isto sugere que, embora não tenham sido observadas alterações no comportamento reprodutivo de *B. similaris*, as modificações da estrutura do ovotestis, devido ao parasitismo, nos faz supor que os esporocistos de *E. coelomaticum* podem alterar o funcionamento normal do sistema reprodutivo de *B. similaris*, culminando com a inibição da gametogênese e a perda da fecundidade do hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

1 - *Bradybaena similaris* e duas espécies de esperanças do gênero *Conocephalus*, *C. saltator* e *Conocephalus sp.* foram coletados, naturalmente infectados com formas larvares de *E. coelomaticum* nos municípios de Lorena e Pindamonhangaba, SP.

2 - O segundo hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum* é identificado, naturalmente e experimentalmente, pela primeira vez no Brasil.

3- A observação de *B. similaris*, experimentalmente infectados, revelou que o número de esporocistos eliminados por hospedeiro variava muito, mas sua morfologia pode caracterizar a espécie *E. coelomaticum*.

4 - Em infecções experimentais, o número de metacercárias recuperadas por inseto variou de 64 e 80, enquanto que em *Conocephalus* naturalmente infectados o número médio de metacercárias coletadas foi de 200.

5 - Os camundongos Balb/c heterozigoto normal e os ratos Whistar não adquiriram *E. coelomaticum*, quanto infectados experimentalmente, tanto com insetos, quanto com apenas metacercárias.

6 - Os caprinos mostraram-se suscetíveis à infecção, quando foram infectados com insetos que albergavam metacercárias de *E. coelomaticum*, apesar dos trematódeos adultos apresentarem diferenças marcantes em tamanho, quando comparados a espécimens coletados de bovinos.

7 - A prevalência de *E. coelomaticum* em *B. similaris* e *Conocephalus* revelou variações durante os meses do ano estudados, mas os meses de agosto e março, demonstraram as maiores prevalências para moluscos e insetos respectivamente na região estudada do Vale do Paraíba; demonstrando assim que este parasito pode ocorrer durante todo o ano, nesta região.

8 - As larvas de *E. coelomaticum* causaram danos por compressão sobre a glândula digestiva e ovotestis de *B. similaris*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERSBORG, H.P.K. Studies on the effect of parasitism upon the tissues. I. With special reference to certain gasteropod molluscs. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 68: 361-401, 1924.
- AMATO, J.F.R. Manual de Técnicas para preparação de Coleções Zoológicas. 8. Platelminotos (Temnocefálidos, Trematódeos, Cestóides, Cestodários e Acantocéfalos. *Soc. Bras. Zool.*, 11 p., 1985.
- BASCH, P.F. Completion of the life cycle of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae). *J. Parasitol.*, 51(3): 350-355, 1965.
- BASCH, P.F. Patterns of transmission of the trematode *Eurytrema pancreaticum* in Malaysia. *Am. J. Vet. Res.*, 27(116): 234-240, 1966.
- BEHMER, O.A.; CASTRO DE TOLOSA, E.M. & FREITAS NETO, A.G. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. Edart. Ed. da Univ. de São Paulo. São Paulo, 241 pp., 1976.

- BHALERAO, G.D. Studies on the helminths of India. Trematoda I. *J. Helminthol.*, 14: 163-180, 1936.
- BUSETTI, E.T.; PASKE, A.; RUIS, M.C.E. & THOMAZ, V. Helmintos parasitos de *Bubalus bubalis* no Estado do Paraná - Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 35(3): 399-404, 1983.
- CAMPOS, M.S.; RAGUSA, A.L.; MIGUEL, O. & ISHIZUKA, M.M. Correlação entre o número de parasitas e o peso do pâncreas em bovinos naturalmente infestados por *Eurytrema pancreaticum*, Janson, 1889 (Trematoda-Dicrocoeliidae). *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*, 11: 295-299, 1974.
- CHINONE, S.; MARUYAMA, K. & ITAGAKI, H. Development of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda). I. Development in the first intermediate snail host. *Bull. of Azabu Vet. College*, 1(1): 15-22, 1976.
- CHINONE, S. & ITAGAKI, H. Development of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda). II. Development in definitive hosts. *Bull. of Azabu Vet. College*, 1(2): 73-81, 1976.
- CHINONE, S.; FUKASE, T. & ITAGAKI, H. Experimental infection of domestic cats with *Eurytrema pancreaticum* and *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Jap. J. Parasitol.*, 33(1): 29-39, 1984.
- CHENG, T.C. & SNYDER, R.W. Jr. Studies on host-parasite between larval trematodes and their hosts. I. A review. *Trans. Am.*

- Micros. Soc.*, 81(3): 209-228, 1962.
- CORT, W.W.; AMEEL, D.J. & VAN DER WOUDE, A. Germinal development in the sporocystis and rediae of the digenetic trematodes. *Exp. Parasitol.*, 3: 185-225, 1954.
- DENTON, J.F. Studies of the life history of *Eurytrema procyonis* Denton, 1942. *J. Parasitol.*, 30(5): 277-286, 1944.
- DUARTE, M.J.F. O ciclo evolutivo de *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Trematoda: Brachylaemidae). *Rev. Bras. de Biol.*, 40(4): 793-809, 1980.
- EDUARDO, S.L.; MANUEL, M.F. & TONGSON, M.S. *Eurytrema escuderoi*, a new species and two other previously known species of the genus *Eurytrema* Loss, 1907 (Digenea: Dicrocoeliidae) in Philippine cattle and Carabao. *Phil. J. Sci.*, 15: 104-116, 1976.
- GALTSOFF, P.S.; LUTZ, F.E.; WELCH, P.S. & NEEDHAM, J.G. *Culture methods for invertebrate animals*. Reimpression Dover Public New York. USA, 590 pp., 1937.
- GOMES, D.C. Interrelação entre *Fasciola hepatica* L., 1758 e *Lymnaea columella* Say, 1817: Susceptibilidade e patogenia. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 74 pp., 1985.
- HYMAN, L.H. *The Invertebrates. Mollusca*. Vol. VI. Mc Graw-Hill, New York, USA. 792 pp., 1967.

- ISHII, Y.; KOGA, M.; FUGINO, T.; HIGO, H.; ISHIBASHI, J.; OKA, K. & SAITO, S. Human infection with the pancreas fluke, *Eurytrema pancreaticum*. *Am. J. Trop. Med. Hig.*, 32(5): 1019-1022, 1983.
- ITAGAKI, H. & CHINONE, S. *Life histories of rumen flukes and pancreas of ruminants*. Proc. of Symposium, 3rd Japan - Brazil. Symposium on Science and Technology. October 25-27. Garushi-Kaikan Kanda, Tokyo, Japan, 1982.
- JAMES, B.L. The effects of parasitism by larval Digenea on the digestive gland of the intertidal Prosobranch *Litorrina saxatilis* (Olivi) subsp. *Tenebrosa* (Montagu). *Parasitology*, 55: 93-115, 1965.
- KABAT, A.R. Effects of trematode parasitism on reproductive output of the bivalve *Transennella tantilla*. *Can. J. Zool.*, 64: 267-270, 1986.
- LOOSS, A. & CUFFEY, E. On some parasites in the Museum of the School of Tropical Medicine, Liverpool. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1:123-154, 1907.
- MALEK, E.A. & CHENG, T.C. *Medical and Economic Malacology*. 1st ed., Academic Press, New York, 398 pp., 1974.
- MALEK, E.A. Studies on the parasitism of mollusks as models for comparative pathology. *J. Invert. Pathology*, 29: 1-6, 1977.

- MIYATA, I. The development of *Eurytrema pancreaticum* and *Eurytrema coelomaticum* in the intermediate hosts snails. In Morishita K., Y. Komiya and H. Matsubayashi (editors). *Progress of Medical Parasitology in Japan*, 2: 349-354, 1965.
- PAN, C.T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 14: 931-976, 1965.
- PETERSON, A. *Entomological Techniques: How to work with insects*. Ed. Edwards Brothers Inc. Michigan. 106-113, 1964.
- PITKIN, L.M. A revision of the Pacific species of *Conocephalus* Thunberg (Orthoptera: Tettigoniidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.)*, 41(5): 315-355, 1980.
- PORTER, C.; PRATT, I. & OWCZARZAK, A. Histopathological and Histochemical effects of the trematode *Nanophyetus salmincola* (Chapin) on the hepatopancreas of its snail host, *Oxytrema siliqua* (Gould). *Trans. Amer. Soc.*, 86(3): 232-239, 1967.
- PRATT, I. & BARTON, G.D. The effects of four species of larval trematodes upon the liver of ovotestis of the snail *Stagnicola emarginata angulata* (Sowerby). *J. Parasitol.*, 27: 283-288, 1941.
- PURVIS, G.B. The species of *Eurytrema* in domestic ruminants. *Vet. Rec.*, 21(1): 283-584, 1931.

- RAGUSA, A.L. & CAMPOS, M.S. Identificação de hospedeiro intermediário de *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1882) Loss, 1907, (Trematoda: Dicrocoeliidae), em fazendas de criação de bovinos no Estado de São Paulo - Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 13(1): 269-287, 1976.
- REES, W.J. The effect of parasitism by larval trematodes on the tissues of *Littorina littorea* (Linné). *Proc. Zool. Soc. London*, 357-368, 1936.
- REHN, J.A.G. & HEBARD, M. Studies in American Tettigoniidae (Orthoptera). VI. *Trans. Am. Ent. Soc.*, 41: 225-290, 1915.
- RONDELAUD, D. & BARTHE, D. Les modifications structurales du rien chez *Lymnaea truncatula*, Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 58(2): 109-116, 1982.
- SAKAMOTO, T.; KONO, I. & YASUDA, N. Studies on *Eurytrema coelomaticum*. I. Preliminary observation on the biological characters of *Eurytrema coelomaticum*. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 16: 83-92, 1980.
- SAKAMOTO, T.; KONO, I.; YASUO, N.; MOHRI, S.; HANDA, S. & YAMAUCHI, C. Studies of on *Eurytrema coelomaticum*. III. Development of *Eurytrema coelomaticum* in mice. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 17(26): 193-199, 1981.

- SAKAMOTO, T. *Eurytrema coelomaticum* (Dicrocoeliidae: Trematoda) from *Lepus brachyurus brachyurus*. *Bull. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 31: 95-99, 1981.
- SCHWANBEK, A.; BECKER, W. & RUPPRECHT, H. Quantification of parasite development in the host-parasite system *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *Z. Parasitenkd.*, 72: 365-373, 1986.
- SKRJABIN, K.I. *Keys to trematode in animals and man*. Univ. Illinois, Urbana, 351 pp., 1964.
- TANG, C.C. Studies on the life history of *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889). *J. Parasitol.*, 36: 559-573, 1950.
- TANG, Z. & TANG, C. The biology and epidemiology of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) and *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) in cattle and sheep in China. *Acta Zool. Sinica*, 23(3): 267-282, 1977.
- TRAVASSOS, L. Revisão da família Dicrocoeliidae Odhner, 1910. *Monogr. Inst. Oswaldo Cruz*, 2: 357 pp., 1944.
- TRAVASSOS, L.; TEIXEIRA DE FREITAS, J.F. & KOHN, A. Trematódeos do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 67: 886 pp., 1969.
- WILSON, R.A. & DENISON, J. The parasitic castration and gigantism of *Lymnaea truncatula* infected with the larval stages of *Fasciola hepatica*. *Z. Parasitenkd.*, 61: 109-119, 1980.

- WRIGHT, C.A. The pathogenesis of helminths in the Mollusca. *Helminth. Abst.*, 35: part 3: 207-233, 1966.
- YAMAGUTI, S. *Systema Helminthum*. Vol. 1. *The digenetic Trematodes of Vertebrates*. Pts I and II. Interscience Publish. Inc. New York, 1575 pp., 1950.
- YAMAGUTI, S. *Synopsis of digenetic Trematodes of Vertebrates*. Vols. I and II. Keigaku Publ. Co., Tokyo, 1800 pp., 1971.
- YAMAGUTI, S. *A synopsis review of life histories of digenetic Trematodes of Vertebrates*. Keikan Publ. Co., Tokyo, 550 pp., 1975.
- YOSHINO, T.P. Histopathological effects of larval Digenea on the Digestive epithelia of marine Prosobranch *Cerithidea californica*: fine structural changes in the digestive gland. *J. Invert. Path.*, 28: 209-216, 1976.



FIGURA 1. Esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* eliminados de *Bradybaena similaris* infectadas experimentalmente. Notar as cercárias no interior do endocisto (C) (25 X).



FIGURA 2. Fotomicrografia de cercárias de *Eurytrema coelomaticum* demonstrando a ventosa oral (VO), o estilete (E), a ventosa ventral (VV) e a cauda (C) (200 X).

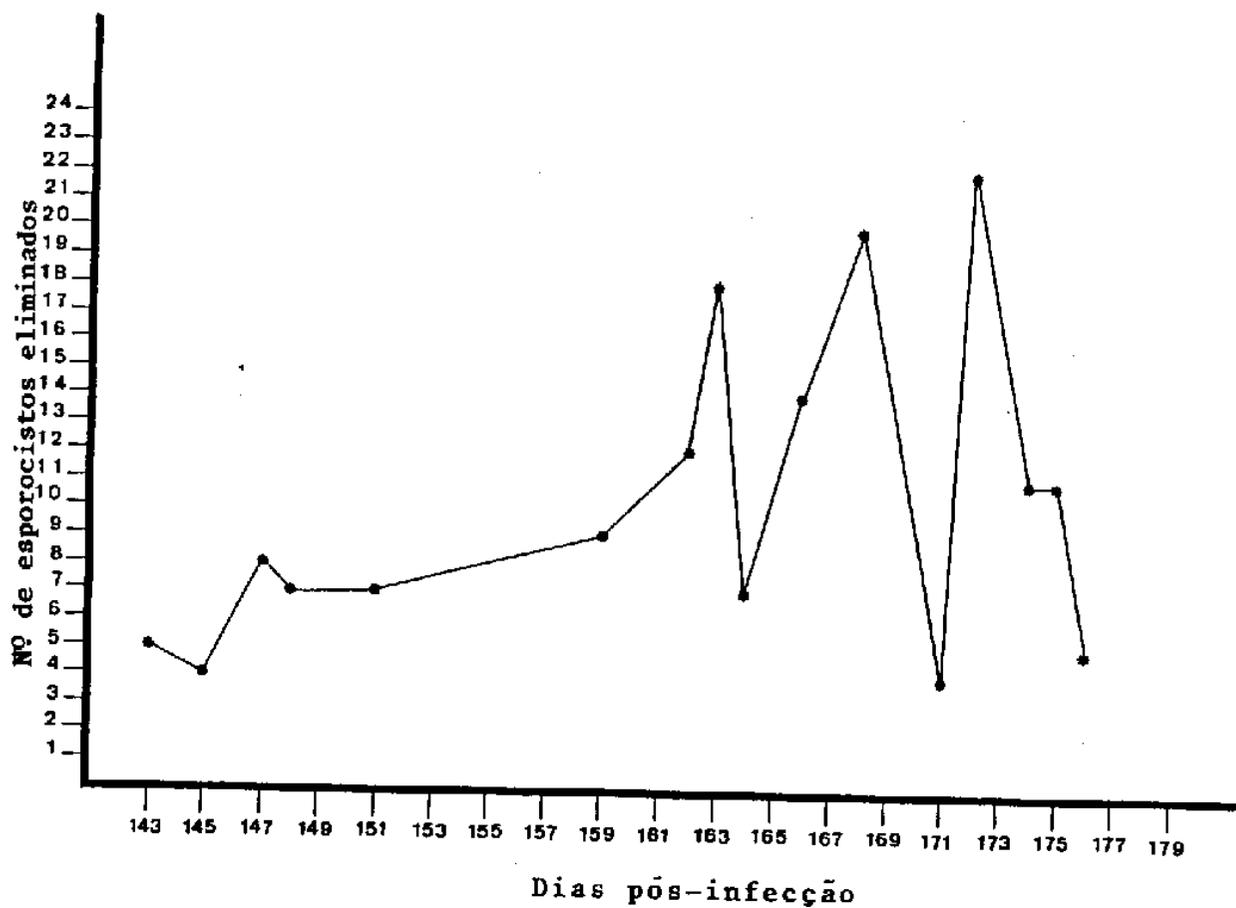


FIGURA 3. Ritmo de eliminação de esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* expelidos por um espécimen de *Bradybaena similaris* (Molusco 1).

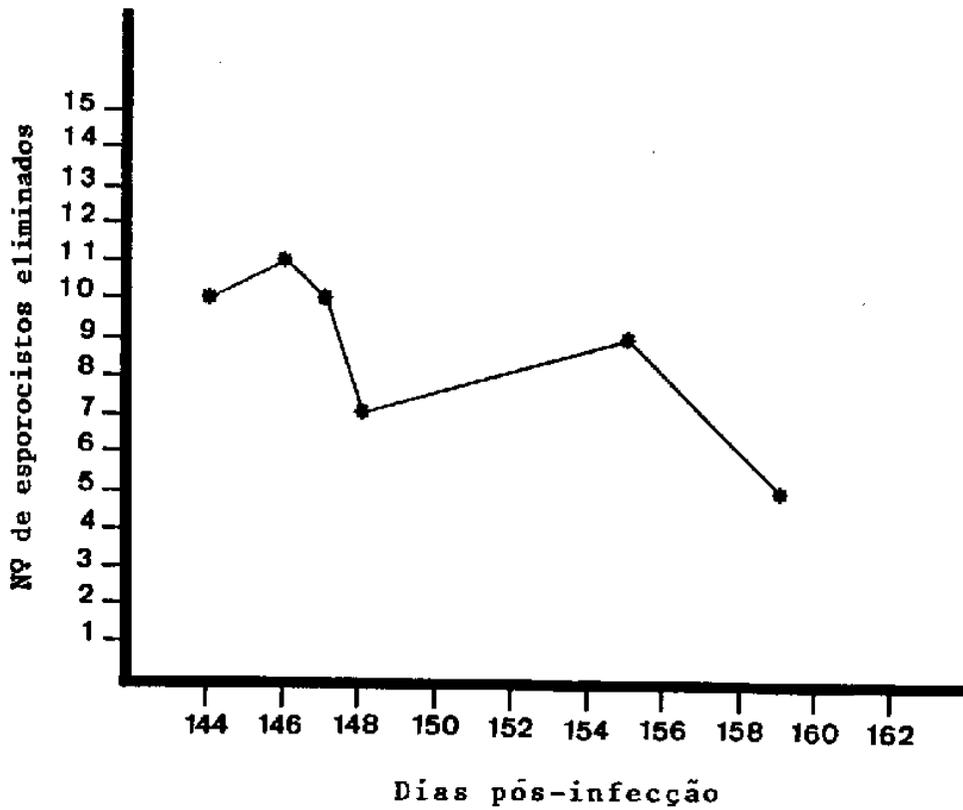


FIGURA 4. Ritmo de eliminação de esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* expelidos por um espécimen de *Bradybaena similaris* (Molusco 2).

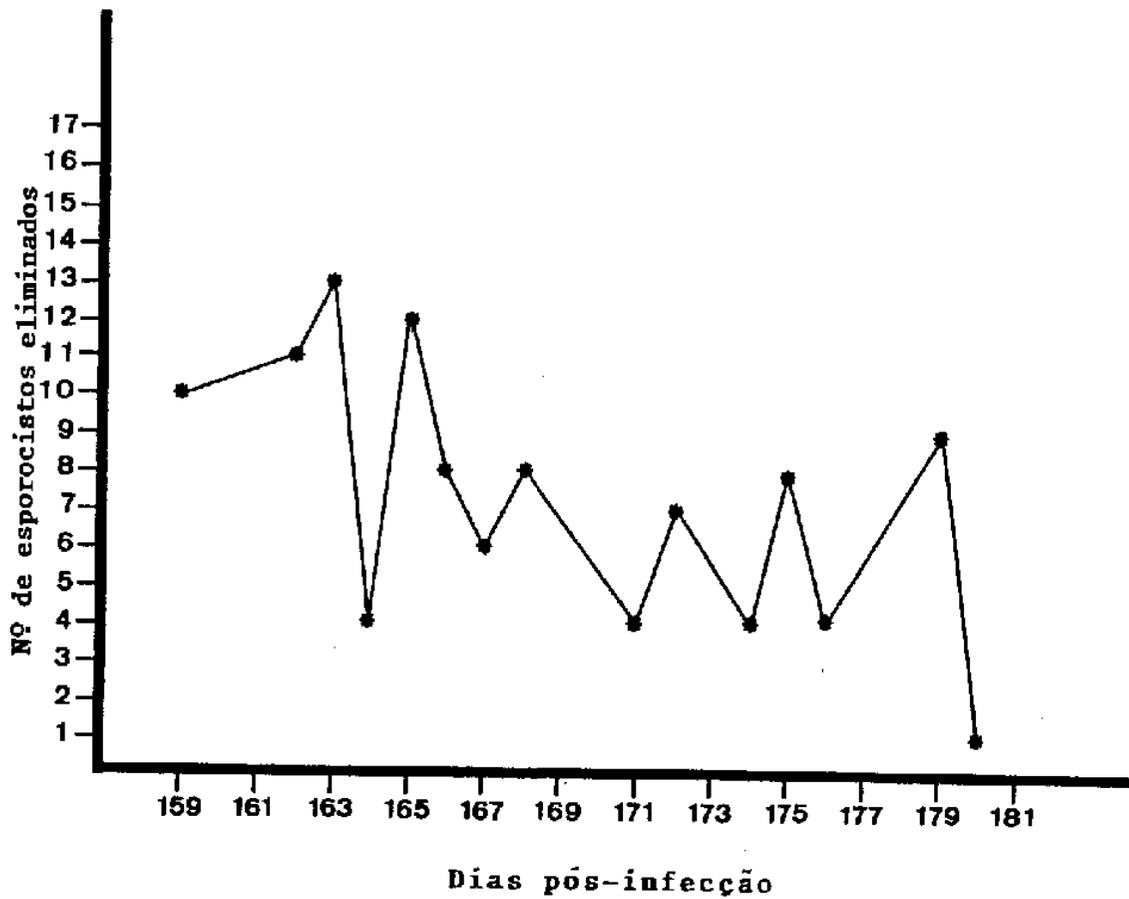


FIGURA 5. Ritmo de eliminação de esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* expelidos por um espécimen de *Bradybaena similaris* (Molusco 3).

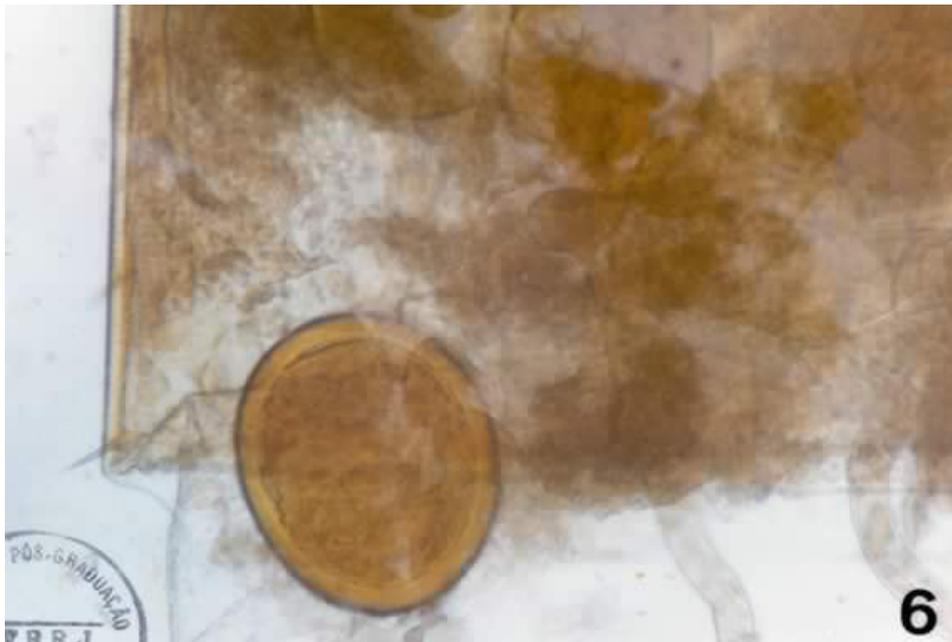


FIGURA 6. Fotomicrografia de uma metacercária de *Eurytrema coelomaticum* obtida de um inseto experimentalmente infectado (1280 X).

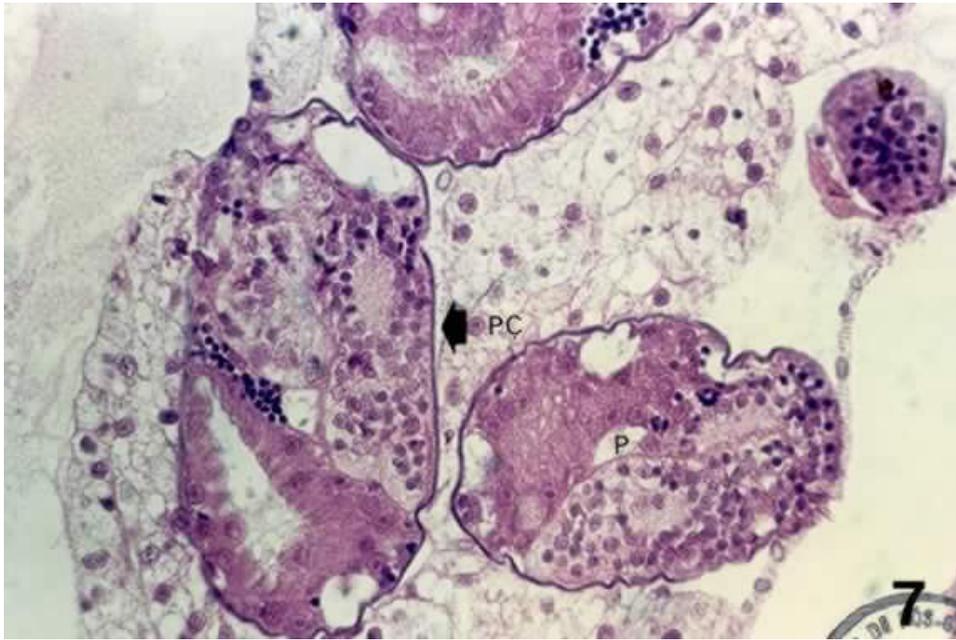


FIGURA 7. Fotomicrografia de um corte histológico do abdômen, de um exemplar de *Conocephalus saltator*, demonstrando as metacercárias de *Eurytrema coelomaticum*. Parede do cisto (PC) e o parasito (P) (1600 X, Coloração HE).

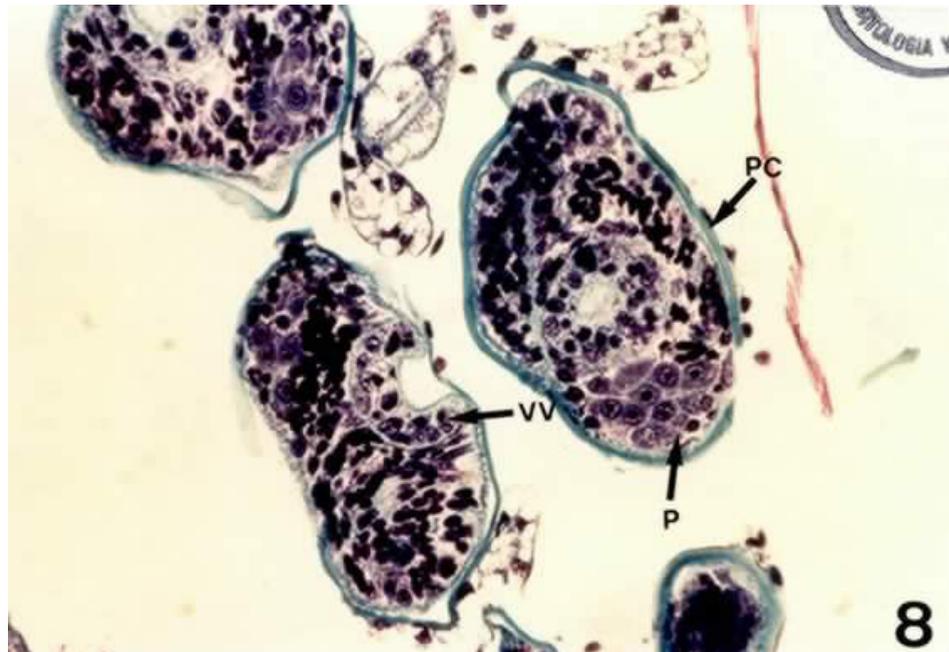


FIGURA 8. Fotomicrografia de um corte histológico do abdômen, de um exemplar de *Conocephalus saltator*, demonstrando as metacercárias de *Eurytrema coelomaticum*. Parede do cisto (PC), parasito (P) e a ventosa ventral (VV). A coloração azul da parede do cisto indica a presença de fibras colágenas (1600 X, coloração tricromo de Gomori).

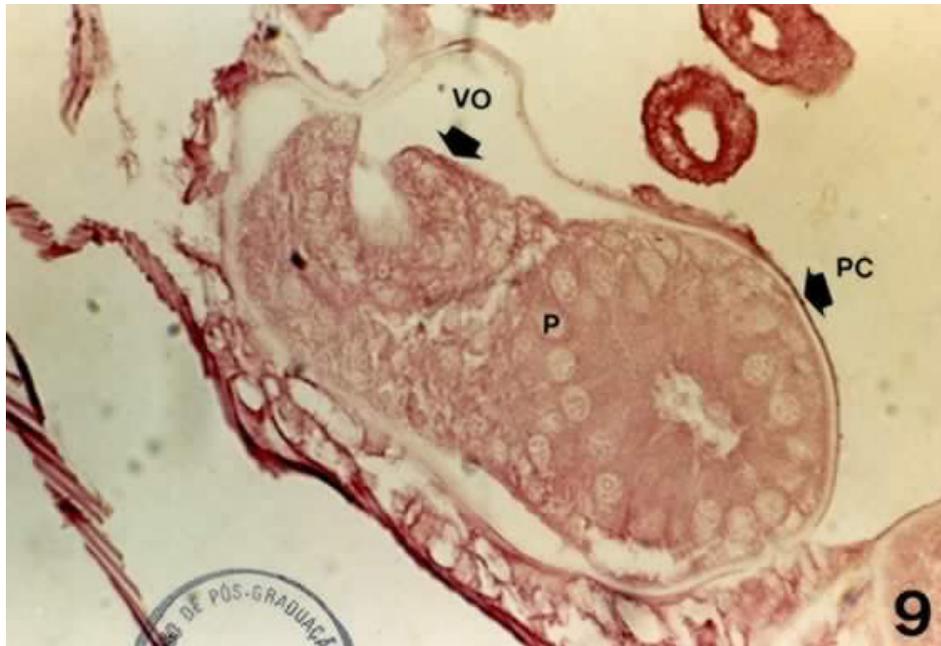


FIGURA 9. Fotomicrografia de um corte histológico do abdômen, de um exemplar de *Conocephalus saltator*, demonstrando a metacercária de *Eurytrema coelomaticum*. Parede do cisto (PC), parasito (P) e a ventosa oral (VO). A transparência da parede do cisto indica a presença de colágeno (1600 X, coloração orceína).

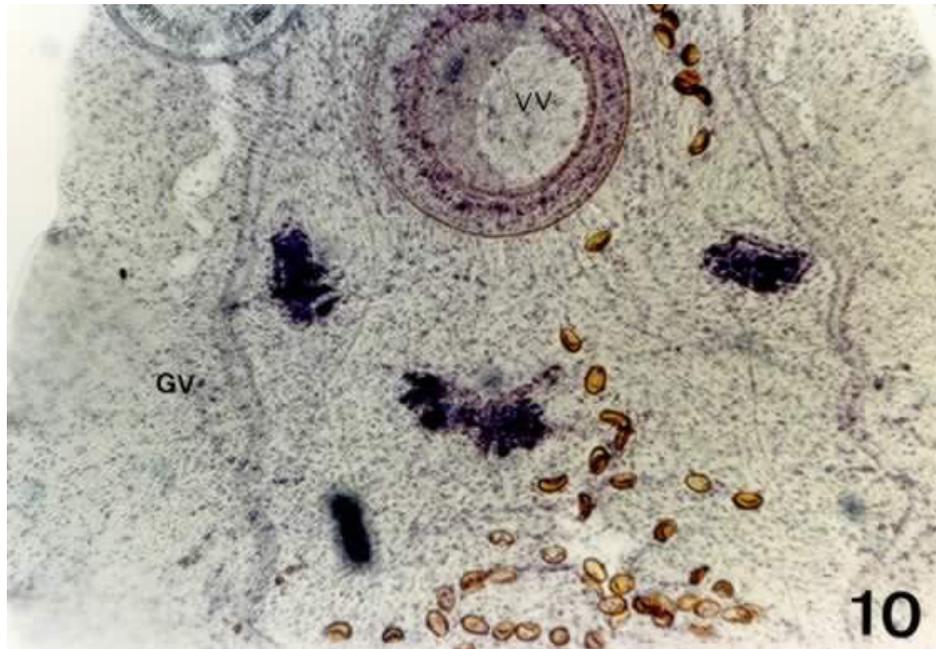


FIGURA 10. *Eurytrema coelomaticum* recuperado de um caprino experimentalmente infectado com 10 *Conocephalus saltator*. Notar a ventosa ventral (VV), a modificação da estrutura dos testículos (T) e das glândulas vitelogênicas (GV) (315 X).

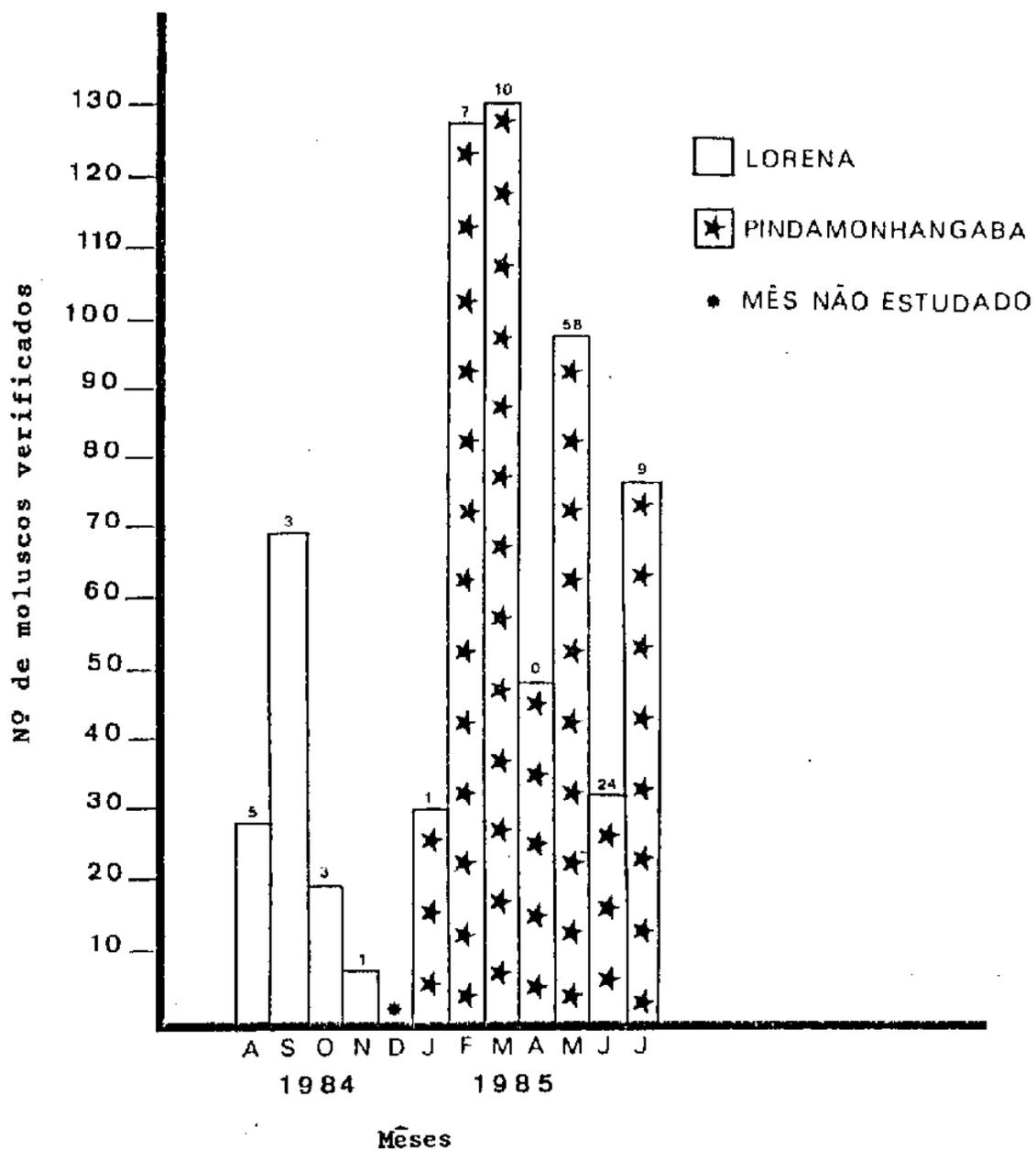


FIGURA 11. Infecção natural de *Bradybaena similaris* com esporocistos de *Eurytrema coelomaticum*, coletados nos municípios de Lorena e Pindamonhangaba, SP. O número no topo das barras indica o número de moluscos infectados.

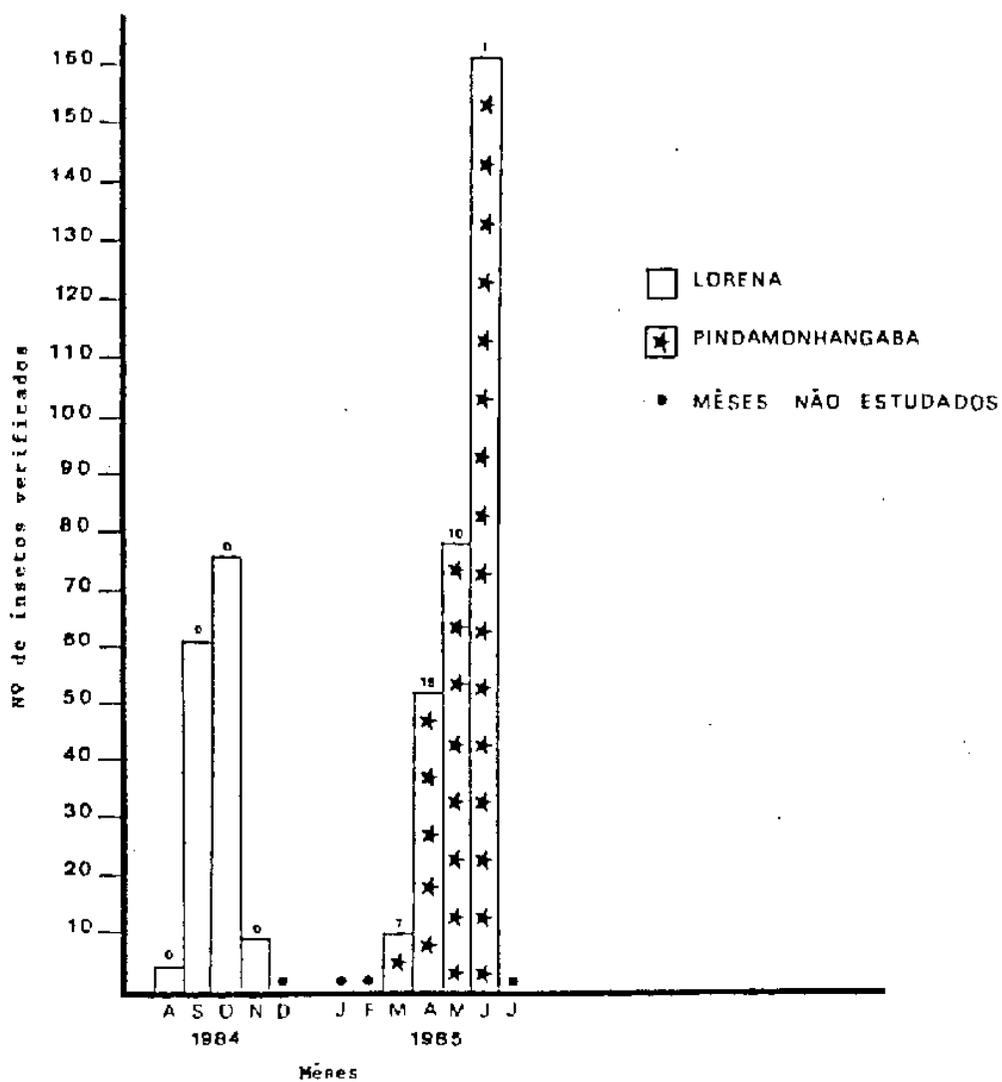


FIGURA 12. Infecção natural de *Conocephalus* sp. (Orthoptera, Tettigoniidae) com metacercárias de *Eurytrema coelomaticum*, coletados nos municípios de Lorena e Pindamonhangaba, SP. O número do topo das barras indica o número de esperanças infectadas.



FIGURA 13. Exemplar macho da esperança do gênero *Conocephalus*, segundo hospedeiro intermediário de *Eurytrema coelomaticum*.

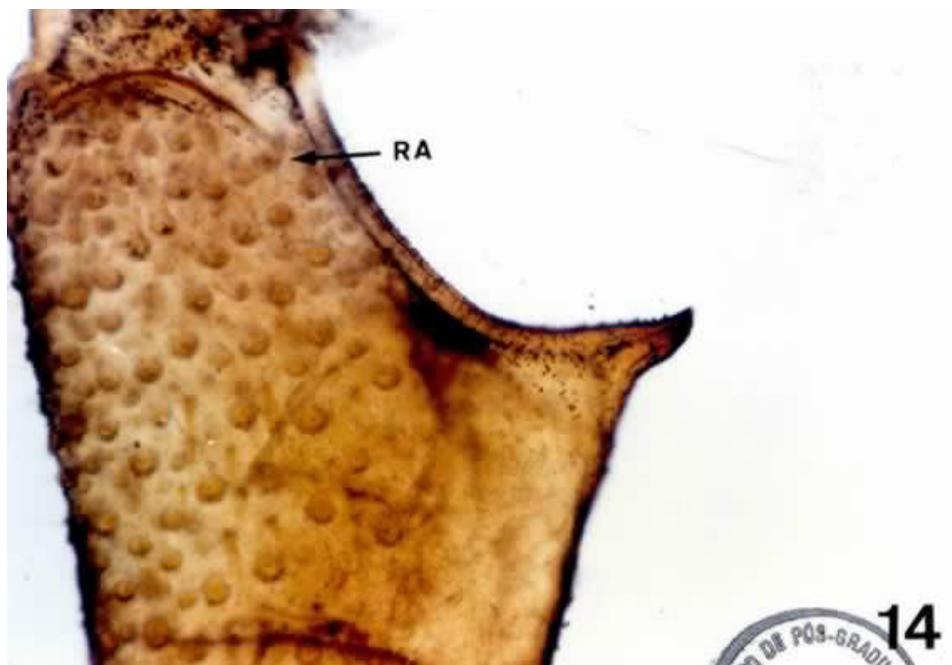


FIGURA 14. Região anterior (RA) do cercus de *Conocephalus saltator* (189 X).

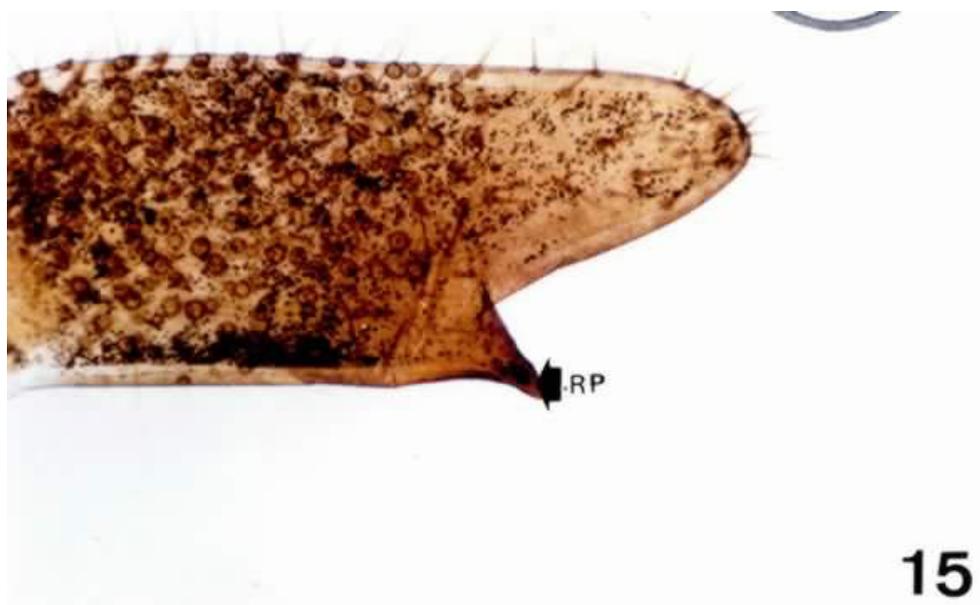


FIGURA 15. Região posterior (RP) do cercus de *Conocephalus sp.* (189 X).

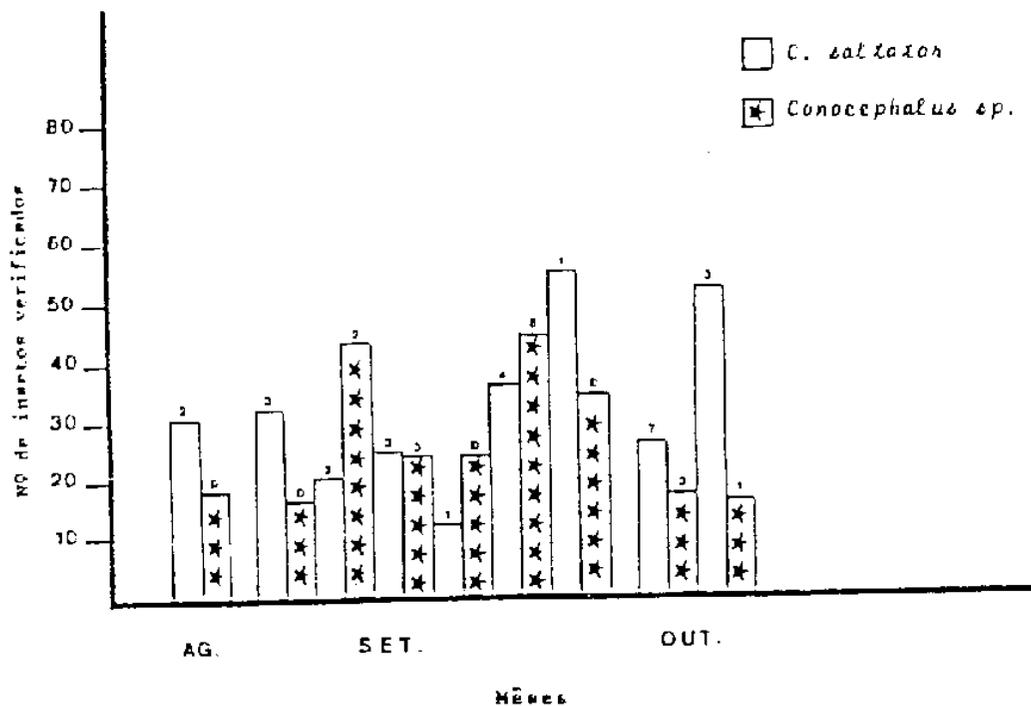


FIGURA 16. Infecção natural de *Conocephalus saltator* e *Conocephalus sp.* (Orthoptera, Tettigoniidae) com metacercárias de *Eurytrema coelomaticum* coletados em uma propriedade localizada no município de Pindamonhangaba, SP, nos meses de agosto a outubro de 1986. Os números acima das barras indicam o número de esperanças infectadas.

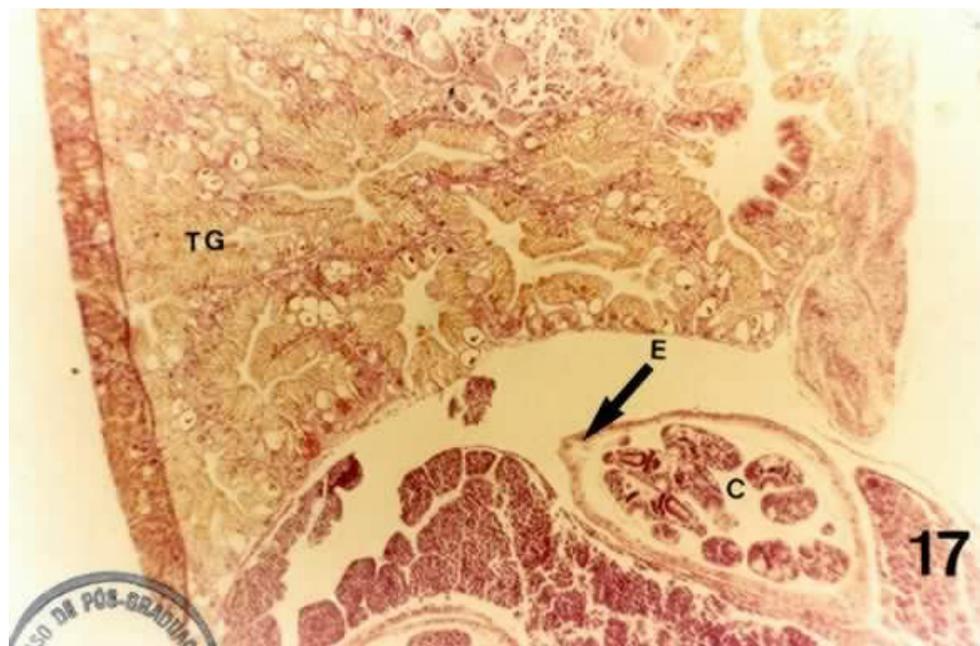


FIGURA 17. Corte histológico de *Bradybaena similaris* infectado, demonstrando o aspecto anormal do tecido glandular. Notar o esporocisto (E) repleto de cercárias (C), a desorganização dos túbulos glandulares (TG) (400 X, coloração HE).

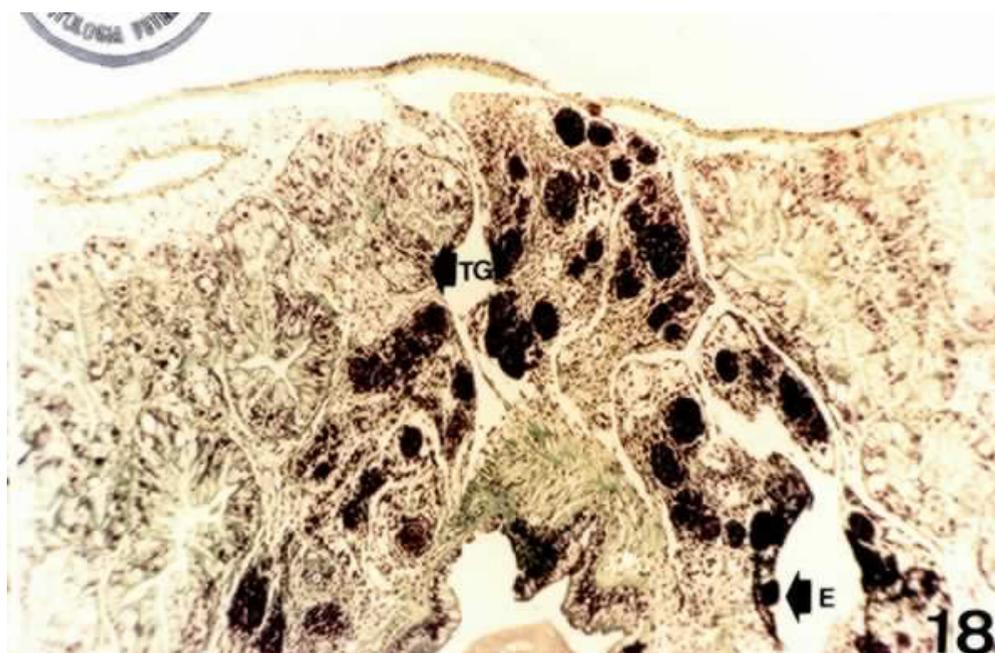


FIGURA 18. Corte histológico de *Bradybaena similaris* infectado, demonstrando os esporocistos (E) provocando a compressão dos túbulos (TG) da glândula digestiva (400 X, coloração tricromo de Gomori).

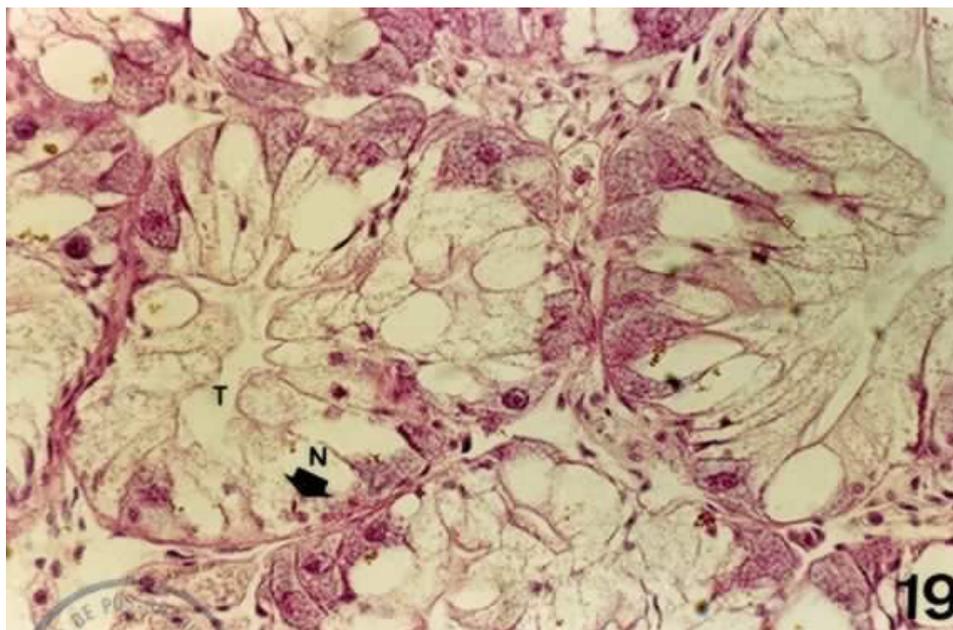


FIGURA 19. Corte histológico da glândula digestiva parasitada, demonstrando a diminuição dos Túbulos (T) e os núcleos picnóticos (N) (1150 X, coloração HE).



FIGURA 20. Corte histológico da glândula digestiva parasitada, demonstrando os grânulos amarelados (A), os corpúsculos de coloração marrom (M) e a vacuolização do citoplasma (V) (1000 X, coloração HE).

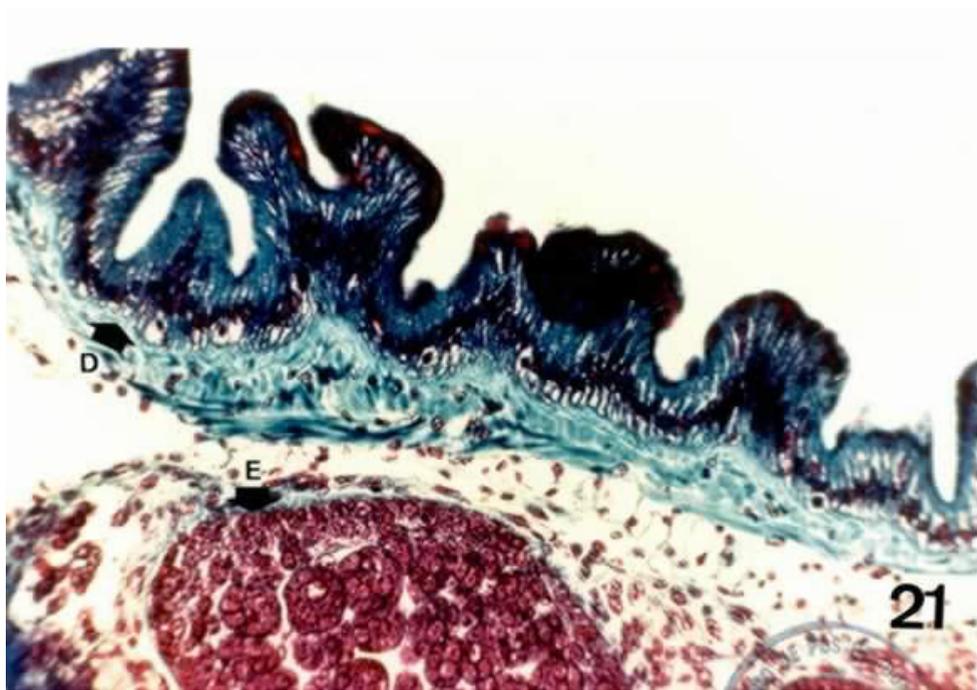


FIGURA 21. Corte histológico de um molusco parasitado demonstrando a desorganização epitelial (D) no local de fixação do esporocisto (E) (1150 X, coloração tricromo de Gomori).

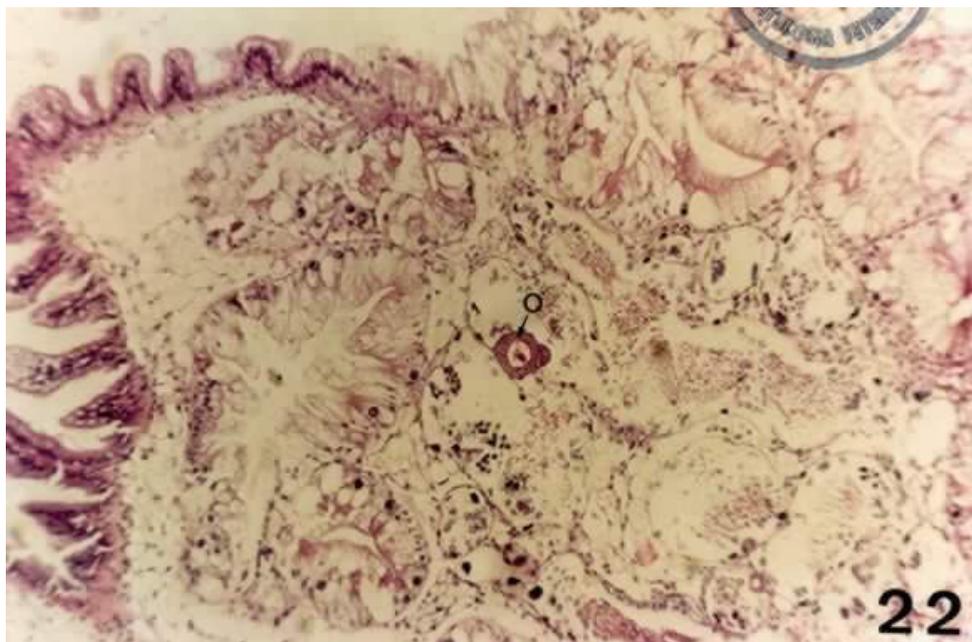


FIGURA 22. Corte histológico do ovotestis de um molusco infectado. Notar a degeneração e desorganização do órgão. Ovócito sem contorno definido (O) (400 X, coloração HE).



FIGURA 23. Corte histológico da glândula digestiva (GD) de um molusco não parasitado (315 X, coloração HE).