

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE

**Morfologia dos Ovos e Estágios Larvais de
Eurytrema coelomaticum (Giard & Billet, 1892) (Digenea,
Dicrocoeliidae) e Análise Bioquímica da Interface
Parasito-Primeiro Hospedeiro Intermediário, *Bradybaena
similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda, Xanthonychidae)**

Daniele de Oliveira Franco Acuña

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MORFOLOGIA DOS OVOS E ESTÁGIOS LARVAIS DE *Eurytrema
coelomaticum* (GIARD & BILLET, 1892) (DIGENEA,
DICROCOELIIDAE) E ANÁLISE BIOQUÍMICA DA INTERFACE
PARASITO-PRIMEIRO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO, *Bradybaena
similaris* (FÉRUSSAC, 1821) (GASTROPODA, XANTHONYCHIDAE)**

DANIELE DE OLIVEIRA FRANCO ACUÑA

Sob a Orientação do Professor Doutor
Jairo Pinheiro da Silva

e Co-orientação das Professoras Doutoradas
Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini
e
Aleksandra Menezes de Oliveira

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Julho de 2011

578.65

A189m

T

Acuña, Daniele de Oliveira Franco, 1979-.
Morfologia dos ovos e estágios larvais de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) e análise bioquímica da interface parasito-primeiro hospedeiro intermediário, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda, Xanthonychidae) / Daniele de Oliveira Franco Acuña - 2011.

132 f.: il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Bibliografia: f. 96-111.


1. Parasitas - Teses. 2. *Eurytrema coelomaticum* - Morfologia - Teses. 3. Larva - Teses. I. Silva, Jairo Pinheiro da, 1969-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DANIELE DE OLIVEIRA FRANCO ACUÑA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

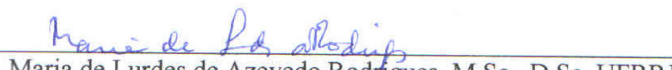
TESE APROVADA EM 05/07/2011



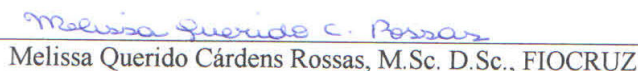
Jairo Pinheiro da Silva, M.Sc., D.Sc., UFRRJ




Rosa Maria Marcos Mendes, M. Sc., D.Sc., UFRRJ



Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues, M.Sc., D.Sc, UFRRJ



Melissa Querido Cárdenas Rossas, M.Sc. D.Sc., FIOCRUZ



Luciano Antunes Barros, M.Sc., D.Sc., UFF

A minha pequena Sophia,
sentido da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra, toda a glória e todo louvor.

Aos meus pais, Antônio José e Maria da Penha, por plantar boa semente que fez de mim o que sou hoje.

Ao meu marido, Freddy, por tudo. Mas especialmente pelo apoio incondicional, por se alegrar comigo e por contribuir em mais uma conquista.

A minha pequena e querida, Sophia. Por me acompanhar nesta jornada desde o ventre; pela paciência, entre uma mamada e outra, e por me dividir com a “Sr.^a Pesquisa”, mesmo que a contra gosto. Gostaria que soubesse que é o que tenho de mais precioso.

Aos meus Mestres, Jairo e Solange, orientadores, colaboradores, parceiros, queridos, amados, amigos.

À UFRRJ, instituição esta que me recebeu com carinho, através de seus professores, demais funcionários, colegas de turma, que me proporcionaram vivências fundamentais para que este sonho se concretizasse.

À Prof.^a Dr.^a Aleksandra Menezes de Oliveira, UFRJ, IBCCF, RJ, pela realização das análises através de microscopia eletrônica.

À Beatriz Ferreira Ribeiro, Giovana Alves de Moraes e Márcia Adriana da Silva pelo suporte técnico, especialmente para realização da microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Frigorífico Irapuru Indústria e Comércio de Carnes Ltda, Barra Mansa, RJ, Brasil, pela concessão de material, especialmente à Dr. Alexandre, D. Geraldina e Juca.

À FAPERJ e ao CPGCV/UFRRJ pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram nas diferentes etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Somente uma palavra pode expressar o que sinto:

Obrigada!

BIOGRAFIA

Daniele de Oliveira Franco Acuña, filha de Antônio José Franco e Maria da Penha de Oliveira Franco, nascida em 1979, no município do Rio de Janeiro, RJ.

Realizou o Ensino Fundamental nas Escolas Municipais Evaristo de Moraes e Abrahão Jabour e o Ensino Médio no Instituto de Educação Sarah Kubitschek, RJ. Em agosto de 2001 ingressou na Universidade Castelo Branco, trabalhando no estudo dos impactos ambientais causados pela introdução de *Achatina fulica*, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini. Graduiu-se em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, pela UCB, em julho de 2005.

Em março de 2006, ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, a nível de Mestrado, onde realizou estudo sobre a morfologia e ultraestrutura de larvas de nematóides encontradas em *Achatina fulica*, sob a orientação do Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva. Graduiu-se em Mestre em Ciências Veterinárias – Parasitologia Veterinária, pela UFRRJ, em fevereiro de 2008.

Dando continuidade à carreira acadêmica, em março de 2008, ingressou no mesmo curso e instituição, porém a nível de Doutorado.

RESUMO

FRANCO-ACUÑA, Daniele de Oliveira. **Morfologia dos ovos e estágios larvais de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) e análise bioquímica da interface parasito-primeiro hospedeiro intermediário, *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Gastropoda, Xanthonychidae).** 2011. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Eurytrema coelomaticum parasita ductos pancreáticos de ruminantes na América do Sul, Europa e Ásia. Este estudo objetivou analisar a morfologia dos ovos e estágios larvais intramolusco de *E. coelomaticum* e as alterações bioquímicas em *Bradybaena similis* ocasionadas pela infecção. Os ovos, esporocistos e cercárias foram coletados, processados e analisados através de microscopia de luz (ML), eletrônica de varredura e transmissão, sendo os miracídios observados apenas por ML. Análises bioquímicas foram realizadas, determinando os conteúdos de proteínas totais, amônio e atividade da AST, ALT e γ GT na hemolinfa de moluscos infectados e não infectados. Ovos são operculados, alongados, de coloração marrom escura quando maduros, com $44,97 \pm 3,83 \mu\text{m}$ de comprimento e $30,71 \pm 2,54 \mu\text{m}$ de largura. Miracídio com corpo alongado no sentido antero-posterior coberto por cílios, presença de terebratorium na região anterior e células germinativas na metade posterior do corpo. Os esporocistos de primeira geração tinham corpo arredondado ou alongado ($0,1078\text{mm}$), com numerosas bolas germinativas em seu interior e tegumento sem especializações evidentes, apresentando dobras e grânulos, sendo composto por uma camada sincicial externa, lâmina basal e duas camadas musculares, circular e longitudinal, seguida pelo corpo celular (cítion) com o núcleo. Esporocistos de segunda geração, obtidos de dissecações dos moluscos, apresentaram formato variado, uma região cônica com estriações transversais e longitudinais, chamada de extremidade anterior e outra com um prolongamento, semelhante à probóscide, a extremidade posterior. A parede do corpo com as mesmas camadas do esporocisto de primeira geração, mas a camada sincicial externa invagina e uma camada amorfa está presente entre as camadas sincicial e de músculos circulares, intensa atividade secretória com grânulos e vesículas secretoras na camada externa; sistema excretor protonefridial. Esporocistos expelidos exibem uma estrutura degenerada nas regiões anterior e posterior do corpo; região mediana inchada. O endocisto de parede fibrilar inclui as cercárias, material amorfo, membranoso e secretório. Cercárias apresentam ventosa oral com um número de papilas maior do que a ventosa ventral, ausência de espinhos no tegumento e na cauda, com glândulas de penetração laterais e pré-acetabulares com ductos que se abrem em uma cavidade na extremidade anterior. As células-flama laterais se comunicam com finas ramificações que convergem para dois ductos excretores, os quais se abrem na vesícula excretora posterior. Tegumento com uma camada externa sincicial e amorfa com mitocôndrias e intensa atividade secretora. Camada muscular circular seguida pela longitudinal e, em sequência, conectada à região interna do tegumento, onde está o corpo celular com o núcleo. Presença de célula-flama típica. Células somáticas com retículo endoplasmático bem desenvolvido, grânulos secretores e núcleo evidente. O conteúdo de proteínas totais aumentou em 543% aos 82 dias na hemolinfa dos moluscos infectados, porém aos 100 dias de infecção houve uma queda brusca nesses valores, com diferença significativa entre os grupos, infectado e controle. A concentração de amônio na hemolinfa dos moluscos variou significativamente ao longo da infecção, exceto aos 60 dias, quando comparados os dois grupos estudados. A análise da atividade das aminotransferases (AST, ALT e γ GT) sugere que os parâmetros não são bons indicadores de lesão nos tecidos do hospedeiro.

Palavras-chave: *Eurytrema coelomaticum*, morfologia, estágios larvais intramolusco.

ABSTRACT

FRANCO-ACUÑA, Daniele de Oliveira. Morphology of eggs and larval stages of *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) and biochemical analyse of interface first intermediate host-parasite, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda, Xanthonychidae). 2011. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Eurytrema coelomaticum parasitizes pancreatic ducts of ruminants in South America, Europa and Asia. The present study aimed analyze the morphology of eggs and larval intramolluscan stages of *E. coelomaticum* and biochemical alterations in the hemolymph of infected *Bradybaena similaris*. Eggs, sporocysts and cercariae were collected, processed and analyzed by light (LM), scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy, being the miracidia observed only by LM. Biochemical analyzes of total protein, ammonium and AST, ALT and γ GT activities in the hemolymph of infected and uninfected snails were made. Eggs were operculated, elongated, dark brownish when mature, with $44.97 \pm 3.83 \mu\text{m}$ length and $30.71 \pm 2.54 \mu\text{m}$ width. Miracidium had an anteroposterior elongated and ciliated body, the terebratorium was anteriorly located and germinal cells were observed in the middle body. The mother sporocysts had rounded or elongated body (0.1078mm), with numerous germinal balls inside them and tegument without evident specializations, presenting many foldings and granules. The tegument was composed by a syncytial external layer, basal lamina and two muscular layers, circular and longitudinal, followed by the cyton with the nucleus. Daughter sporocysts, came from dissections of infected snails, presented varied shape, a hollow tapered region with many transversal and longitudinal striations, named anterior end, and other region with a filament proboscis-like shape, the posterior end. The body wall is composed by the same layers observed in the mother sporocysts, but the external syncytial layer invaginates and an amorphous layer is also present between syncytial and circular muscular layers; intense secretory activity with granules and secretory vesicles were observed in the external layer; excretory system is protonephridial. Expelled sporocysts exhibit a degenerated structure at anterior and posterior regions of the body; the middle region was swollen. The endocyst had a fibrillar wall and includes the cercariae, amorphous, membranous and secretory materials. Cercariae presented oral sucker with many papillae than in the ventral sucker or acetabulum, spines at the tegument or tail were absent; the penetration glands were lateral and preacetabular and open themselves in a anterior cavity. The lateral flame-cells communicate with fine branches that converge on two excretory ducts, which open in the posterior excretory vesicle. Tegument had an external syncytial layer followed by an amorphous layer with many mitochondria and an intense secretory activity. Circular muscular layer and, right after, the cyton, with the nucleus, is located. Typical flame-cell was observed. Somatic cells with a well developed smooth endoplasmic reticulum, secretory granules and evident nucleus. The total protein content in the hemolymph increased 543% at 82 days of infection, but at 100 days of infection there was a sharp reduction in these values, whose were significantly different from the values observed to control (uninfected) snails. Ammonium content varied significantly throughout period of infection, except at 60 days of infection, when the both groups were compared. The activity of aminotransferases (AST, ALT e γ GT) suggested that these parameters are not good indicators of injuries in the tissues host.

Keywords: *Eurytrema coelomaticum*, morphology, larval intramolluscan stages.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

Ae	extremidade anterior
Al	camada amorfa
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
bm	cavidade de fundo cego
bcv	cavidade do corpo
bl	lâmina basal
c	cítion
cb	ponte citoplasmática
cd	dutos centrais
ce	cercárias
ch	canal
ci	cílios
cm	camadas de músculos circulares
cr	região central do corpo/meio do corpo
ct	constricções
DIC	contraste diferencial interferencial de fase
e	ovo
eb	vesícula excretora
ec	canal excretor lateral
ed	duto excretor
en	endocisto
ep	placa epidérmica ciliada posterior
er	projeções citoplasmáticas externas
ere	retículo endoplasmático
es	casca
et	tubo coletor lateral
ev	vesícula excretora
f	dobras tegumentares/dobramentos
fc	célula-flama
fr	região fibrilar
g	grânulos
ga	aspecto granular
gb	bolas germinativas
gc	células germinativas
gp	glândula de penetração
hd	hemidesmossomo
ht	região oca e alongada
i	intestino
ier	faixa inter-epidérmica
if	interface
in	invaginação
int	parede do intestino
ir	projeções citoplasmáticas internas
l	leptotríquios
ld	dutos laterais
lm	camada de músculos longitudinais

lms	lamelas membranas
m	perfis mitocondriais
mb	membrana celular
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mf	fibras musculares
mi	miracídio
mif	figura de mielina
ML	microscopia luz
ms	saco membranoso
mos	esporocisto de primeira geração
n	núcleo
ol	camada externa
op	opérculo
ORESTES	open reading frames est sequences
p	parênquima
pe	extremidade posterior
pg	glândula pré-acetabulares
pm	faringe muscular
s	estriações
sl	camada sincicial
sv	vesícula secretora
t	tegumento
ta	cauda
te	terebratorium
v	vesícula
vc	vacúolos
vo	ventosa oral
vv	ventosa ventral
γGT	gama glutamiltransferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Subdivisão do Phylum Platyhelminthes de acordo com Roberts & Janovy Jr. (1996).	6
Figura 2:	Ciclo biológico de <i>Eurytrema</i> sp. Looss, 1907.	9
Figura 3:	Comparação entre fases de desenvolvimento de <i>Eurytrema coelomaticum</i> (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 e <i>Eurytrema pancreaticum</i> (Janson, 1889) Looss, 1907 dentro do primeiro hospedeiro intermediário molusco. <i>Eurytrema coelomaticum</i> : a. Ovo; b. Miracídio; c-e. Esporocisto-mãe de primeira fase (5-16 dias); i-k. Esporocisto de primeira fase e fase intermediária (70 dias e 11 meses); l. Cercária; n. Esporocisto maduro. <i>Eurytrema pancreaticum</i> : f-h. Esporocisto-mãe de primeira fase (10-20 dias); m. Cercária; o. Esporocisto maduro. Fonte: Tang & Tang (1977).	17
Figura 4:	Conchas de <i>Bradybaena similaris</i> (Férussac, 1821). Fonte: Sea Shell Hub (2006).	24
Figura 5:	Terrário para manutenção de espécimes de <i>Bradybaena similaris</i> no Laboratório de Biologia e Ecologia de Helminthos, da UFRRJ.	31
Figura 6:	Esquema demonstrativo da obtenção dos ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> .	34
Figura 7:	Esquema demonstrativo da infecção experimental de <i>Bradybaena similaris</i> com ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> e período de dissecação.	35
Figura 8:	Microscopia de luz dos ovos e estágios larvais de <i>Eurytrema coelomaticum</i> .	38
Figura 9:	Protocolo de processamento dos ovos e larvas de <i>Eurytrema coelomaticum</i> para microscopia eletrônica de varredura, segundo Pinheiro et al. (2004a).	39
Figura 10:	Protocolo de processamento de ovos e larvas de <i>Eurytrema coelomaticum</i> até a observação ao microscópio eletrônico de transmissão, segundo Pinheiro et al. (2004b).	40
Figura 11:	Microscopia de luz de ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> . a e b. Ovos mostrando a. extremidade anterior (ae) e posterior (pe) com o miracídio (mi) dentro. c. Ovo com a extremidade anterior (ae) mostrando a região do opérculo (op). O ponto de inserção do opérculo no ovo é mostrado pelas setas. d. A extremidade anterior (ae) do ovo com o opérculo (op) evidente. e e f. Ovo com opérculo (op) destacado.	46
Figura 12:	Microscopia de luz dos ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> . a. Ovo maduro. b. Birrefringência do ovo maduro. c. Ovo imaturo. d. Birrefringência do ovo imaturo.	47

- Figura 13:** Ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Vista geral de um conjunto de ovos (MEV). **b.** Vista lateral de um ovo com a região do opérculo (op) evidenciada (MEV). **c.** Vista superior da região do opérculo (op) (MEV). **d.** Secção ultrafina transversal de um ovo, evidenciando sua casca (es) e o miracídio (mi) degenerado em seu interior. Barra de escala=2µm (MET). **e.** Corte ultrafino mostrando um detalhe da extremidade posterior de um ovo, com as camadas externa e interna mais eletrondensas e a região intermediária menos eletrondensa e muito mais espessa. Barra de escala= 1µm (MET). 48
- Figura 14:** Microscopia de luz de miracídio de *Eurytrema coelomaticum* miracidium. **a.** Ovo (e) mecanicamente fraturado com liberação de um miracídio (mi). **b.** Miracídio (mi) mostrando a extremidade anterior (ae) com o “terebratorium” (te) extrovertido e extremidade posterior (pe). **c** e **d.** Miracídio (mi) mostrando os cílios (ci) da placas epidérmicas ciliadas na região anterior (ae). 51
- Figura 15:** Microscopia de luz de miracídio de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** DIC do detalhe de um miracídio (mi) no momento da eclosão, onde é possível evidenciar o opérculo (op) destacado do ovo (e) e as células germinativas posteriores (gc). **b.** DIC da região anterior evidenciando a faixa inter-epidérmica (ier) entre as placas epidérmicas ciliadas anteriores, células germinativas (gc), vesícula excretora (ev) e os cílios (ci). ae=extremidade anterior; pe=extremidade posterior. **c.** Detalhe de miracídio impregnado com nitrato de prata (AgNO₃) evidenciando o contorno de uma placa epidérmica ciliada posterior (ep). 52
- Figura 16:** Esporocisto de primeira geração de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** ML de um esporocisto de primeira geração (mos) aderido a face celomática da parede do intestino (i). **b** e **c.** Corte histológico de *Bradybaena similis* experimentalmente infectada com *E. coelomaticum* mostrando diferentes posições do esporocisto de primeira geração (mos) em desenvolvimento na parede do intestino (i). Destaque para o tegumento (t) e as bolas germinativas (gb). **d.** MET de um espécime fraturado de esporocisto de primeira geração de *E. coelomaticum* mostrando o tegumento (t), bolas germinativas (gb) e fibras musculares (mf). 55
- Figura 17:** Esporocisto de primeira geração de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** ML de um corte semifino de um esporocisto de primeira geração aderido à parede intestinal do molusco hospedeiro intermediário *Bradybaena similis*. Tegumento e bolas germinativas são observados. Barra de escala =40µm. **b.** Camada externa do tegumento com muitas dobras, camada sincicial, camadas musculares circular e longitudinal. Barra de escala = 2µm. **c.** Detalhe do tegumento e seus componentes. Barra de escala = 1µm. **d.** Interface entre o esporocisto de primeira geração em desenvolvimento e os tecidos do molusco hospedeiro. Barra de escala = 2µm. **e.** Detalhe do tegumento. Uma lâmina basal bem definida, perfis mitocondriais e muitos grânulos eletrondensos podem ser vistos. Barra de escala = 1µm. **f.** Interface do esporocisto de primeira geração e o molusco mostrando a ponte citoplasmática ligando a camada sincicial à região do cíton com o núcleo evidente. 56

Barra de escala = 5µm. (int=parede do intestino; t=tegumento; f=dobras tegumentares; gb=bolas germinativas; sl=camada sincicial; cm=camada de músculos circulares; lm=camadas de músculos longitudinais; p=parênquima; m=perfis mitocondriais; n=núcleo; g=grânulos; bl=lâmina basal; if=interface; cb=ponte citoplasmática; c=cítion).

Figura 18: Esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* obtido de dissecações de *Bradybaena similaris*, experimentalmente infectada, em diferentes períodos. **a e b.** ML de larva inteira, mostrando variação na forma. **c.** MEV de larva mostrando constrições (ct) no meio do corpo, o alongamento na extremidade posterior (pe) do corpo e a extremidade anterior oca e alongada. **d.** MEV de uma outra larva mostrando o alongamento posterior (pe) e a região anterior (ae) oca e alongada (ht). **e.** ML de esporocisto de dissecação mostrando a extremidade anterior com a região oca e alongada (ht), semelhante a probóscide, com a cavidade em fundo cego, como um ventosa, localizada anteriormente. **f.** MEV da extremidade anterior de esporocisto de segunda geração com a cavidade em fundo cego (bc) de esporocisto de segunda geração e estriações (s).

Figura 19: Esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** ML de esporocisto filho obtido de dissecação de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada mostrando a extremidade anterior oca e cônica com a cavidade em fundo cego (bc) e aspecto granular (g). As cercárias (ce) estão completamente formadas e o endocisto (en) é visível. **b.** ML da extremidade anterior de um esporocisto filho obtido de dissecações do hospedeiro molusco, com estriações transversais e concêntricas (s). **c.** MEV das estriações transversais e concêntricas transversal (s) por todo o corpo da larva. **d.** MEV de detalhe das estriações transversais mostrando as estriações longitudinais na superfície do tegumento. **e.** MEV de extremidade anterior do corpo do esporocisto com aspecto oco e cônico e muitas estriações concêntricas (s). **f.** ML de esporocisto filho expelido por *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada mostrando a região central oval, semelhante a uma saco, e transparente (cr) do corpo e ambos prolongamentos, o menor na extremidade anterior (ae) e o maior na extremidade posterior (pe). **g.** MEV de esporocisto filho inteiro expelido por *B. similaris* experimentalmente infectada mostrando a extremidade anterior (ae), o meio do corpo (cr) e a extremidade posterior (pe). **h e i.** MEV da região de formação dos filamentos anterior e posterior, respectivamente. **j.** MEV de esporocisto filho expelido mostrando um detalhe da superfície externa do tegumento.

Figura 20: Secção transversal de esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* obtidos de dissecações de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada. **a.** ML de corte semifino mostrando o tegumento com núcleos e a cavidade do corpo com as bolas germinativas. **b.** MET da vista geral das diferentes camadas na parede do corpo do esporocisto: 1: camada externa sincicial; 2: camada amorfa; 3: camadas musculares (circular e longitudinal); 4: camada

interna do corpo celular ou cíton; 5: região interna central do corpo com bolas germinativas. Barra de escala = 2 μ m. **c.** MET do detalhe da parede do corpo com a superfície externa com dobramentos seguida por uma camada amorfa, camadas de músculos circulares e longitudinais. A ponte citoplasmática e o cíton são evidentes. Barra de escala = 1 μ m. **d.** MET da larva contraída mostrando desorganização das camadas musculares. Barra de escala = 2 μ m. **e.** MET do detalhe da camada sincicial com dobras, grânulos, lâmina basal evidente e camada amorfa. Barra de escala = 500nm. **f.** MET da atividade secretora na camada externa do tegumento. Barra de escala = 2 μ m. **g.** MET da secção na base da célula-flama com as projeções citoplasmáticas internas e externas, leptotríquios e o núcleo. Barra de escala = 2 μ m. **h.** MET da parte superior da célula flama na região do barril co o tufo de cílios dentro do cilindro. Barra de escala = 1 μ m. (t=tegumento; gb=bolas germinativas; cb=pontes citoplasmáticas; m=perfis mitocondriais; c=cíton; n=núcleo; al=camada amorfa; cm=camada de músculos circular, lm=camada de músculos longitudinal; g=grânulos; f=dobramentos; mf=fibras musculares; bl= lâmina basal; ol=camada externa; sv=vesícula secretora; er=projeções citoplasmáticas externas; ir=projeções citoplasmáticas internas; l=leptotríquios; fc=célula-flama; ed=duto excretor).

Figura 21: MET da secção longitudinal de esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* obtido de dissecações de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada. **a.** Vista geral do tegumento com a camada externa com muitas dobras, grânulos e vesículas secretoras, seguida pela camada amorfa, as camadas de músculos circulares e longitudinais, o corpo celular (cíton) e o núcleo. Barra de escala = 2 μ m. **b.** Camada externa do tegumento, com muitos grânulos e perfis mitocondriais, ligada às camadas musculares por hemidesmossomos. Barra de escala = 2 μ m. **c.** Detalhe das camadas externa, amorfa e musculares do tegumento. Barra de escala = 500nm. **d.** Observação do corpo de uma larva contraída. Barra de escala = 2 μ m. **e.** Liberação de vesícula secretora e uma invaginação cruzando a camada de músculos circulares. Barra de escala = 1 μ m. **f.** Formação e liberação de vesículas secretoras e grânulos. Barra de escala = 2 μ m. (t=tegumento; cb=ponte citoplasmática; m=perfis mitocondriais; c=cíton; n=núcleo; al=camada amorfa; cm=camada de músculos circulares, lm= camada de músculos longitudinais; g=grânulos; f=dobramentos; mf=fibras musculares; bl=lâmina basal; ol=camada externa; sv=vesícula secretora; hd=hemidesmossomo; ch=canal; in=invaginação).

62

Figura 22: Secção transversal da região anterior do corpo de um esporocisto de segunda geração *Eurytrema coelomaticum* expelido. **a.** ML de corte semifino mostrando o tegumento e a cavidade corporal sem larvas em desenvolvimento. Barra de escala =7 μ m. **b.** MET do tegumento com dobramentos que são maiores em tamanho e preenchidos pela camada amorfa. Destaque para a desorganização das camadas musculares unidas ao corpo celular (cíton) pela ponte citoplasmática. Barra de escala = 2 μ m. **c.** MET da região dobrada do tegumento e atividade secretora. Barra de escala = 2 μ m. **d.** MET do detalhe da formação e

67

liberação das vesículas secretoras no topo das dobras tegumentares. Barra de escala = 500nm. (t=tegumento; cb=ponte citoplasmática; c=cítion; n=núcleo; al=camada amorfa; mf=fibras musculares; vs=vesícula secretora; in=invaginação).

Figura 23: Região inchada no meio do corpo de esporocisto de *Eurytrema coelomaticum* expelido. **a.** ML da secção semifina transversal mostrando a superfície do tegumento do saco membranoso preenchido por material amorfo e o endocisto com cercárias dentro. Barra de escala = 7 μ m. **b.** MET da região do saco membranoso com estruturas membranosas dentro formando lamelas e figuras de mielina, e camadas musculares degeneradas localizadas distantes da superfície do corpo. Barra de escala = 1 μ m. **c.** MET do detalhe das camadas musculares degeneradas localizadas próximas à superfície externa do corpo e vesículas secretoras na superfície. Barra de escala = 1 μ m. **d.** MET do detalhe de uma projeção na superfície externa do corpo e muitos grânulos. Barra de escala= 2 μ m. **e.** MET da célula-flama localizada na região do saco membranoso. Barra de escala= 2 μ m. **f.** MET da vista geral do corpo mostrando o endocisto, com uma cercária, preenchido por resíduos de membranas, material amorfo e grânulos. Barra de escala bar= 2 μ m. **g.** MET do detalhe mostrando a natureza fibrilar da parede do endocisto. Barra de escala = 500nm. (t=tegumento; ms=saco membranoso; en=endocisto; ce=cercária; lms=lamelas membranosas; mif=figura de mielina; mf=fibras musculares; ol=camada externa; n=núcleo; v=vesícula; g=grânulo; fc=célula-flama; ci=cílios; vc=vacúolos; vs=vesícula secretora; fr=região fibrilar; bm=lâmina basal).

Figura 24: Região posterior do esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coleomaticum*. **a.** ML de corte semifino com um tegumento espesso e a cavidade do corpo sem larvas em desenvolvimento. Barra de escala = 7 μ m. **b.** MET da vista geral do corpo da larva mostrando a superfície externa com muitas dobras e figuras de mielina suportadas por uma nítida membrana trilaminar com invaginações cruzando as camadas amorfa e musculares e a presença de pontes citoplasmáticas e o corpo celular (cítion) com núcleo. Barra de escala = 2 μ m. **c** e **d.** MET do detalhe da camada externa com figuras de mielina, membrana, camadas amorfa, de músculos circulares e longitudinais e ponte citoplasmática conectando a camada externa com o corpo celular contendo um núcleo. Barra de escala = 1 μ m. **e.** MET do detalhe das figuras de mielina na superfície externa do tegumento. Barra de escala = 500nm. (t=tegumento; bcv=cavidade do corpo; al=camada amorfa; cm=camada de músculos circulares; lm= camada de músculos longitudinais; cb=ponte citoplasmática; mif=figura de mielina; in=invaginação; n=núcleo).

Figura 25: Cercária de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Vista geral de uma cercária mostrando o corpo com a ventosa oral (vo) na extremidade anterior e uma ventosa ventral (vv) na região média do corpo, e a cauda (ta) na extremidade posterior (ML). **b.** Detalhe da cauda (ta), mostrando a ausência de dobras tegumentares ou espinhos (ML). **c.** ML de uma

cercária mostrando a abertura da pequena cavidade (seta larga) anterior das glândulas de penetração, e as ventosas oral (vo) e ventral (vv). **d.** Detalhe da abertura da pequena cavidade das glândulas de penetração (ML). Barra de escala = 7 μ m. **e.** Vista dorsal de uma cercária mostrando o tegumento irregular com dobras e a cauda (ta) na extremidade posterior. Barra de escala = 20 μ m (MEV). **f.** Detalhe da superfície externa do tegumento na região entre as ventosas (MEV). Barra de escala = 10 μ m. **g.** MEV de uma região ventral de uma cercária, mostrando a ventosa oral (vo) com a abertura oral no centro (asterístico) e papilas (setas estreitas), e ventosa ventral (vv). Barra de escala = 20 μ m. **h.** Detalhe da extremidade anterior com a ventosa oral (vo), e a abertura oral (asterístico), rodeadas por papilas (setas estreitas), e a abertura da pequena cavidade das glândulas de penetração (seta larga) (MEV). Barra de escala = 10 μ m. **i.** MEV da ventosa ventral (vv) mostrando as poucas papilas. Barra de escala = 20 μ m.

Figura 26: Microscopia de luz de cercária de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Corpo da cercária, mostrando os ductos laterais (ld) das glândulas de penetração (gp). **b.** Região anterior de uma cercária mostrando os ductos centrais (cd) das glândulas pré-actabulares (pg) e os ductos laterais (ld) das glândulas de penetração. **c.** Região anterior do corpo da cercária mostrando a abertura oral (asterístico) no centro da ventosa oral (vo) seguida pela faringe muscular (pm). **d.** Cercária mostrando na região posterior do corpo, a vesícula secretora (sv) e o tubo coletor lateral (et). **e.** Detalhe da vesícula secretora (sv). **f.** Detalhe da vesícula secretora (sv) com duas células-flama (fc). **g.** Cercária com vesícula excretora e um canal excretor terminal (ec). 75

Figura 27: MET de cercária de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Vista geral de uma região do tegumento (t) frouxamente aderida ao corpo da cercária e o núcleo (n) dentro do corpo. Barra de escala = 2 μ m. **b.** Detalhe da camada externa do tegumento mostrando uma membrana celular (mb) e núcleo (n) de uma célula somática. Barra de escala = 500nm. **c.** Detalhe da camada sincicial externa (ol) do tegumento com muitos perfis mitocondriais (m). Barra de escala = 500nm. **d.** Corte ultra-fino de uma outra região do corpo cercarial mostrando a camada externa (ol), seguida por uma camada de músculos circulares (cm) e uma camada de músculos longitudinais (lm); uma discreta ponte citoplasmática (cb) está conectando a camada externa ao corpo celular onde o núcleo (n) está localizado. Barra de escala = 500nm. **e.** Camada externa do tegumento (ol) com intensa atividade mostrando a formação e liberação de grânulos (g). cm = músculos circulares. Barra de escala = 1 μ m. **f.** Detalhe da formação e liberação de grânulos (g) na camada externa do tegumento. Barra de escala = 500nm. **g.** Secção da periferia do corpo da cercária mostrando uma célula-flama (fc) com os cílios centrais, e as projeções citoplasmáticas internas e externas. Barra de escala = 2 μ m. **h.** Região interna com as células somáticas, com seus núcleos (n), um retículo endoplasmático (ere) bem desenvolvido e muitos grânulos (g). Barra de escala = 1 μ m. 76

Figura 28:	Varição no conteúdo de proteínas totais (mg/dl) na hemolinfa de <i>Bradybaena similaris</i> experimentalmente infectada com <i>Eurytrema coelomaticum</i> em função do tempo de infecção (dias).	82
Figura 29:	Varição no conteúdo de amônio (NH ₄ ⁺) (mM) na hemolinfa de <i>Bradybaena similaris</i> experimentalmente infectada com <i>Eurytrema coelomaticum</i> em função do tempo de infecção (dias).	82
Figuras 30 e 31:	Relação entre o tempo de infecção (dias) com <i>Eurytrema coelomaticum</i> e a atividade da AST (aspartato aminotransferase) (URF/ml) na hemolinfa de <i>Bradybaena similaris</i> .	85
Figuras 32 e 33:	Relação entre o tempo de infecção (dias) com <i>Eurytrema coelomaticum</i> e a atividade da ALT (alanina aminotransferase) (URF/ml) na hemolinfa de <i>Bradybaena similaris</i> .	87
Figura 34:	Relação entre o tempo de infecção (dias) com <i>Eurytrema coelomaticum</i> e a atividade da γ GT (gama glutamil transpeptidase) (UI/l) na hemolinfa de <i>Bradybaena similaris</i> .	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Medidas de espécimes adultos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> , segundo Travassos (1944).	12
Tabela 2:	Medidas dos ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> e <i>Eurytrema pancreaticum</i> , segundo Travassos (1944) e Tang (1950).	14
Tabela 3:	Medidas comparativas das cercárias de <i>Eurytrema coelomaticum</i> e <i>Eurytrema pancreaticum</i> .	22
Tabela 4:	Comparação das medidas dos ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> e <i>Eurytrema pancreaticum</i> . Média \pm desvio padrão; (amplitude de variação).	44
Tabela 5:	Medidas dos esporocistos de segunda geração de <i>Eurytrema coelomaticum</i> expelidos por <i>Bradybaena similis</i> experimentalmente infectada. Média \pm desvio padrão (amplitude de variação).	63
Tabela 6:	Morfometria comparativa dos esporocistos de primeira e segunda geração de <i>Eurytrema</i> . Medidas em mm.	65
Tabela 7:	Medidas de cercárias de <i>Eurytrema coelomaticum</i> de esporocistos de segunda geração dissecados e de esporocistos expelidos por <i>Bradybaena similis</i> experimentalmente infectadas.	72
Tabela 8:	Variação no conteúdo de proteínas totais, expresso em mg/dl, na hemolinfa de <i>Bradybaena similis</i> em função do tempo de infecção, em dias, com <i>Eurytrema coelomaticum</i> . ($X \pm SD$) média \pm desvio padrão.	79
Tabela 9:	Variação na concentração de amônio (NH_4^+) na hemolinfa de <i>Bradybaena similis</i> em função do tempo de infecção, em dias, com <i>Eurytrema coelomaticum</i> . $X \pm SD$ =média \pm desvio padrão.	81
Tabela 10:	Variação na atividade AST (aspartato aminotransferase) na hemolinfa de <i>Bradybaena similis</i> em função do tempo de infecção, em dias, com <i>Eurytrema coelomaticum</i> . N=Número de repetições feitas em cada dosagem; $X \pm SD$ =média e desvio padrão.	84
Tabela 11:	Variação na atividade ALT (alanina aminotransferase) na hemolinfa de <i>Bradybaena similis</i> em função do tempo de infecção em dias, com <i>Eurytrema coelomaticum</i> . N=Número de repetições feitas em cada dosagem; $X \pm SD$ =média e desvio padrão.	86
Tabela 12:	Variação na atividade Gama GT (gama glutamil transpeptidase) na hemolinfa de <i>Bradybaena similis</i> em função do tempo de infecção. N=Número de repetições feitas em cada dosagem; $X \pm SD$ =média e desvio padrão.	88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Filo Platyhelminthes	4
2.2 Ciclo de Vida Geral dos Trematódeos Digenéticos	7
2.3 <i>Eurytrema coelomaticum</i> (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907	7
2.3.1 <i>Eurytrema coelomaticum</i> x <i>Eurytrema pancreaticum</i>	11
2.4 Morfologia dos Trematódeos Digenéticos	13
2.4.1 Ovos	14
2.4.2 Miracídios	15
2.4.3 Esporocistos	18
2.4.4 Cercárias e metacercárias	21
2.5 Filo Mollusca: Biologia, Ecologia e Importância	23
2.5.1 O Molusco <i>Bradybaena similis</i> (Férussac, 1821)	23
2.6 Relacionamento Fisiológico entre Trematódeos Larvais e o Molusco/Primeiro Hospedeiro Intermediário	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Estabelecimento da Colônia e Manutenção de <i>Bradybaena similis</i> em Laboratório	30
3.2 Obtenção dos Ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	32
3.3 Obtenção dos Miracídios de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	32
3.3.1 Impregnação dos miracídios com nitrato de prata (AgNO ₃)	32
3.4 Infecção Experimental de <i>Bradybaena similis</i> com Ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	32
3.5 Eliminação dos Esporocistos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	33
3.6 Morfologia e Ultraestrutura dos Ovos e Estágios Larvais de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	36
3.6.1 Microscopia de luz	36
3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura	36
3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão	36
3.7 Análises Bioquímicas	41
3.8 Análises Estatísticas	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Morfometria e Ultraestrutura dos Ovos e Estágios Larvais de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	43
4.1.1 Ovos	43
4.1.2 Miracídios	49
4.1.3 Esporocistos	53
4.1.3.1 Esporocistos de primeira geração ou esporocistos-mãe	53
4.1.3.2 Esporocistos de segunda geração ou esporocistos-filho	57
4.1.4 Cercárias	71
4.2 Alterações Fisiológicas em <i>Bradybaena similis</i> Infectada com <i>Eurytrema coelomaticum</i>	78
4.2.1 Determinação do conteúdo de proteínas totais e produtos nitrogenados de excreção – Amônio (NH ₄) - na hemolinfa de <i>Bradybaena similis</i> infectada com <i>Eurytrema coelomaticum</i>	78

4.2.2 Atividade de aminotransferases na hemolinfa de <i>Bradybaena similaris</i> infectada com <i>Eurytrema coelomaticum</i>	84
Considerações Finais	91
5 CONCLUSÕES	93
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
7 ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

Trematódeos do gênero *Eurytrema* Looss, 1907 são frequentemente encontrados em pâncreas de bovinos abatidos durante, durante a realização de inspeção nos frigoríficos, sendo observado um aumento significativo da prevalência nos últimos anos. Dentre esses parasitos, podem ser destacadas as espécies *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) Looss, 1907 e *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907, digenéticos pertencentes à família Dicrocoeliidae Odhner, 1910 e que necessitam de dois hospedeiros intermediários para que seu desenvolvimento larval se complete e possam chegar à maturidade no hospedeiro definitivo, na maioria das vezes, mamíferos herbívoros.

Tanto *E. pancreaticum* quanto *E. coelomaticum* são parasitos comuns dos ductos pancreáticos, ocasionalmente ductos biliares e raramente intestino delgado de ruminantes. O primeiro tem sido descrito em bovinos, caprinos, ovinos, bubalinos, suínos, camelídeos, cervídeos e homem, enquanto que o segundo ocorre em bovinos, caprinos, ovinos, bubalinos, leporinos e camelídeos (MATTOS JÚNIOR & VIANNA, 1987). Ambas são espécies de ampla distribuição geográfica, sendo *E. coelomaticum* a única a ocorrer na América do Sul e endêmica do Brasil (TRAVASSOS, 1944; YAMAGUTI, 1975; ILHA et al., 2005).

Existe certa controvérsia quanto à posição taxonômica destas espécies, dada a grande semelhança morfológica, o que levou alguns autores a registrarem-nas como sinônimas. Sendo que, no Brasil, a espécie *E. coelomaticum* foi erroneamente referida por alguns autores como *E. pancreaticum* (MATTOS, 1987; AMATO & BEZERRA, 1989; GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1993). Porém, estudos revelaram diferenças morfológicas (TRAVASSOS, 1944; LOOSS & CUFFEY, 1907; EDUARDO et al., 1976; TANG & TANG, 1977), assim como a distinção entre as duas espécies é evidente a nível molecular pela análise de seus cariótipos (MORIYAMA et al., 1980; ZHENG et al., 2007).

Eurytrema coelomaticum apresenta ciclo biológico heteroxeno. Os ovos do parasito são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo, ruminantes, principalmente, e ingeridos passivamente pelo seu primeiro hospedeiro intermediário que, no Brasil, é o gastrópode terrestre *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (MATTOS, 1987). Dentro do molusco, duas gerações de esporocistos se desenvolvem e a segunda geração de esporocistos produz cercárias. O desenvolvimento no interior do molusco completa-se em, aproximadamente, 90 dias após a ingestão dos ovos sob a temperatura de 26°C, enquanto que em outras condições ambientais pode levar de 250 a 350 dias (BASSANI et al., 2007). Os esporocistos de segunda geração contendo as cercárias são liberados na vegetação e ingeridos pelo segundo hospedeiro intermediário, que, no Brasil, são ortópteros de duas espécies do gênero *Conocephalus* Thünberg, 1815. Neste inseto, as cercárias são liberadas pela ação mecânica do aparelho bucal do hospedeiro e por ação de enzimas e migram até o aparelho digestório perfurando o intestino e caindo na cavidade celomática do ortóptero onde encistam originando metacercárias, que são a forma infectante ao hospedeiro vertebrado, o qual adquire a infecção pela ingestão acidental do ortóptero infectado.

A euritrematose bovina está diretamente ligada às perdas econômicas, representadas pela diminuição da produção de carne e leite, afetando também a indústria extrativa de insulina devido às condenações de pâncreas parasitados. Quanto ao seu controle, alguns pesquisadores comprovaram a ineficiência dos anti-helmínticos disponíveis no mercado quando tentaram tratar os animais parasitados. Dessa forma, tem se buscado medidas alternativas para o controle desta parasitose.

No Brasil e no mundo, os estudos relacionados à interface *E. coelomaticum/B. similaris* foram mais recorrentes entre as décadas de 70 a 90, porém a nossa literatura ainda é carente de estudos atuais sobre o tema, que venham contribuir para a compreensão do relacionamento parasito-hospedeiro.

O conhecimento da morfologia dos helmintos, principalmente daqueles que apresentam hábito de vida parasitário, é de grande importância para a correta classificação destes organismos, sendo essencial para a sua identificação e o diagnóstico das doenças por eles causadas. Inicialmente, as características morfológicas dos adultos foram as principais ferramentas para a classificação dos helmintos, porém caracteres morfológicos dos estágios larvais (LA RUE, 1957; CABLE, 1974; ODENING, 1961) e padrões de ciclo de vida têm sido utilizados por diversos autores como ferramenta taxonômica (PEARSON, 1972). Além disso, novas informações sobre morfologia comparada baseadas em microscopia de luz e eletrônica fornecem valiosos indicadores na elucidação de relacionamentos filogenéticos (EHLERS, 1985).

Atualmente, com frequência técnicas bioquímicas e de biologia molecular têm sido utilizadas em substituição às características morfológicas na identificação e classificação dos helmintos. Porém, a combinação de dados morfológicos e moleculares pode fornecer uma caracterização mais ampla e uma identificação mais precisa. Assim sendo, é essencial que se proceda a uma caracterização morfológica detalhada, não apenas do estágio adulto, mas também de todos os estágios larvais presentes nos ciclos de vida desses helmintos, agregando-se as informações obtidas com as novas técnicas para estudos bioquímicos e moleculares.

A análise ultraestrutural dos helmintos, adultos e formas larvais, e da fisiologia do seu relacionamento com os hospedeiros, pode revelar aspectos da biologia celular dos mesmos, os quais, além de possuírem ter valor taxonômico, constituem um elemento adicional para o melhor conhecimento da fisiologia de um helminto, o que permite aumentar o desenvolvimento de pesquisas sobre seu controle, resistência a anti-helmínticos, quimioterapia, controle genético da imunidade do hospedeiro, patologia do hospedeiro, resistência genética à infecção, métodos diagnósticos e elaboração de vacinas para o controle da infecção.

Objetivo Geral:

Descrever morfologicamente os ovos e estágios larvais intramolusco de *E. coelomaticum* e analisar as alterações bioquímicas em *B. similaris* ocasionadas pela infecção com este helminto.

Objetivos Específicos:

- Descrever a morfologia e efetuar a análise morfométrica dos ovos *E. coelomaticum* através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- Analisar a morfologia dos miracídios de *E. coelomaticum* por microscopia de luz;
- Analisar a morfometria e descrever a topografia e estrutura da parede do corpo dos esporocistos de primeira e de segunda geração de *E. coelomaticum* através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- Descrever a topografia e a morfologia interna e analisar a morfometria de cercárias de *E. coelomaticum* por microscopias de luz e eletrônicas de varredura e transmissão;
- Realizar a morfometria dos ovos, miracídios, esporocistos e cercárias de *E. coelomaticum* através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- Determinar as alterações no conteúdo das proteínas totais e de amônio (NH₄) da hemolinfa de *B. similaris* durante o período de infecção com *E. coelomaticum*;
- Analisar a atividade das aminotransferases: aspartato aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1), alanina aminotransferase (ALT, EC 2.6.1.2) e gama glutamiltransferase (γGT, EC 2.3.2.2) na hemolinfa do molusco em função do parasitismo por *E. coelomaticum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Filo Platyhelminthes

Os helmintos compõem um grupo bastante heterogêneo de metazoários, incluindo três filas: Platyhelminthes, Acanthocephala e Nematoda.

O filo Platyhelminthes (do grego *platýs*, “chato”; *helminthos*, “verme”) inclui, segundo Brusca & Brusca (2007), aproximadamente 20.000 espécies viventes de animais de vida livre ou parasitos.

Segundo Soulsby (1987), estão incluídos no filo Platyhelminthes, vermes achatados dorsoventralmente; com simetria bilateral; aparelho digestório incompleto, quando presente; e, normalmente, hermafroditas. A superfície corporal é revestida por um tegumento de organização sincicial; são acelomados, com órgãos envoltos por um parênquima e as estruturas excretoras são protonefrídeos de células-flama. Não possuem sistema respiratório e circulatório. O sistema nervoso é ganglionar, característico em modelo de escala, com cordões nervosos longitudinais que se interligam por comissuras transversais.

A classificação do Filo Platyhelminthes pode ser observada na Figura 1, de acordo com Roberts & Janovy Jr. (1996) in Pinheiro (2003). Porém, Gibson (2002) em sua classificação dos platelmintos elevou a sub-classe Trematoda ao *status* de classe, segundo este autor, a Classe Trematoda Rudolphi, 1808, que inclui organismos que são parasitos de órgãos internos, primariamente de moluscos, onde se desenvolvem estágios larvais assexuados e, ocasionalmente, estágios adultos sexuados, e vertebrados que albergam estágios adultos sexuados. Os adultos apresentam dois órgãos de fixação, um deles desempenha este papel exclusivamente, o acetábulo, o outro é utilizado tanto para alimentação como para fixação, a ventosa oral; apresentando tegumento de natureza sincicial, onde podem ser observadas especializações, tais como, espinhos, escamas e papilas. Aparelho digestório presente, com uma abertura oral, normalmente localizada no interior da ventosa oral, pré-faringe, faringe muscular e intestino composto por cecos bifurcados, os quais, geralmente, terminam em fundo cego.

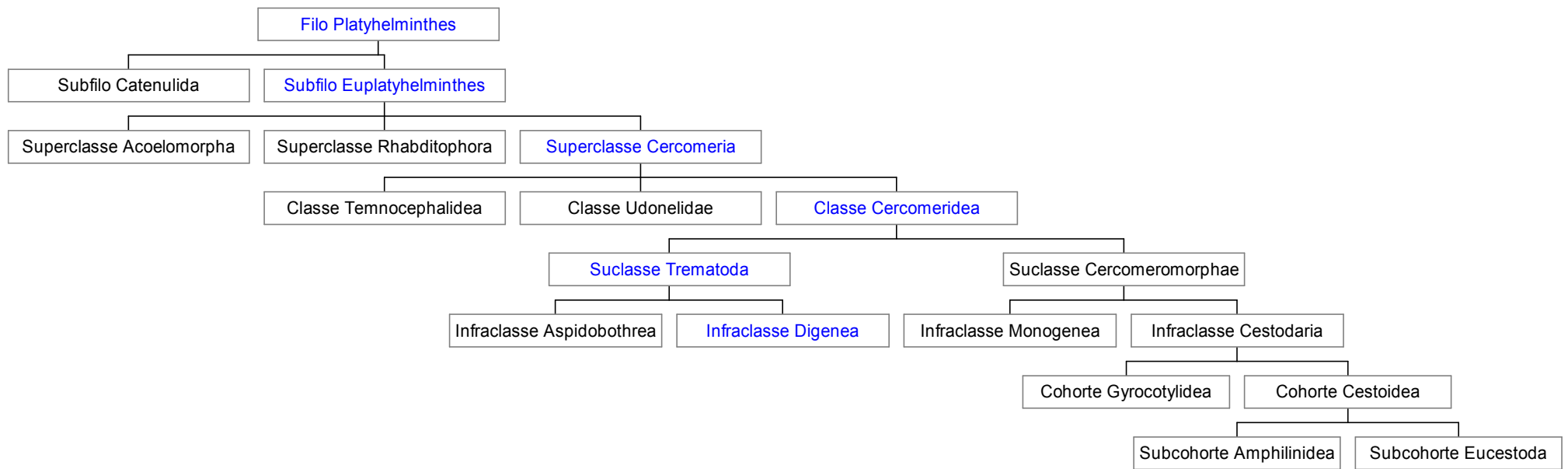
Os trematódeos apresentam-se subdivididos em duas Sub-Classes: (I) Aspidogastrea Faust & Tang, 1936 e (II) Digenea Carus, 1863. Os primeiros constituem um grupo pequeno, que inclui alguns organismos parasitos de moluscos, peixes e quelônios e reconhecidos pela presença de órgão adesivo característico, septado e que ocupa quase toda a superfície ventral do corpo. A segunda Sub-classe constitui um grupo maior, com 2.500 gêneros nominais, cuja maioria utiliza um molusco como hospedeiro intermediário e um vertebrado como hospedeiro definitivo.

Em seu estudo sobre a Filogenia e Classificação de Digenea, Olson et al. (2003) utilizaram sequências completas da subunidade menor do gene do RNA ribossomal (ssrDNA) e parcial da subunidade maior do gene do RNA ribossomal (lsDNA) para estimar a filogenia da Sub-Classe pela via máxima de parcimônia e inferência Bayesiana e concluíram que a principal diferença entre os dois métodos está em seu grau de resolução, e que a análise Bayesiana foi a que apresentou melhor estimativa da filogenia, sendo empregada para classificação e evolução de Digenea. Segundo os autores, essa sub-classe forma uma dicotomia que é dividida entre uma linhagem que leva à Brachylaimoidea, Diplostomoidea e Schistosomatoidea (coletivamente Diplostomida) e o restante de Digenea (Plagiorchiida), em Bivesiculata e Transversotremata que formam as duas linhagens mais basais, seguidas por

Hemiurata. O restante de Plagiorchiida forma um grande número de linhagens independentes levando a coroa do clado Xiphidiata que compreende Allocreadioidea, Gorgoderoidea, Microphalloidea and Plagiorchioidea, que estão unidos pela presença de um estilete em suas cercárias. Embora a maioria das famílias e, em menor grau, superfamílias tenham sua definição atualmente sustentadas, as divisões tradicionais de Echinostomida, Plagiorchiida e Strigeida observadas diferenciam da compreensão do consenso atual, assim os autores procuraram realizar uma proposta de classificação com base filogenética discutida à luz da ontogenia, morfologia e história taxonômica.

Dentre os platelmintos da Classe Trematoda que apresentam hábito de vida parasitário, aqueles pertencentes à Sub-Classe Digenea possuem exemplares de grande importância médica, como o *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, e veterinária, como a *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1759 e *Eurytrema coelomaticum*.

Figura 1: Subdivisão do Phylum Platyhelminthes de acordo com Roberts & Janovy Jr. (1996).



2.2 Ciclo de Vida Geral dos Trematódeos Digenéticos

Estima-se que os trematódeos digenéticos compreendam um grupo, de aproximadamente, 18.000 espécies já registradas, representando o maior grupo de metazoários endoparasitos (CRIBB et al., 2001). Eles formam um grupo que parasita os principais grupos de vertebrados, tendo neles seus hospedeiros definitivos; gastrópodes e bivalves atuam como primeiro e, às vezes, único hospedeiro intermediário e diversos filos atuam como segundo hospedeiro intermediário.

A importância da fasciolose e esquistossomose, entre outras doenças dos seres humanos e dos animais domésticos é a muito tempo reconhecida e continua a receber considerável atenção dos pesquisadores de diferentes áreas. A compreensão da biodiversidade e evolução dos digenéticos, no entanto tem recebido menor atenção e pouca pesquisa foi feita neste sentido ultimamente.

A Sub-classe Digenea inclui algumas das espécies de parasitos mais bem sucedidas. Um grande número de variações existe não somente na morfologia do adulto, mas também nos ciclos de vida. Os ovos são produzidos pelos vermes adultos em seu hospedeiro definitivo e após a fertilização, os ovos embrionados ou não, são liberados junto com as fezes, urina ou catarro do hospedeiro. Após alcançar ambiente aquático ou terrestre, os ovos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, nos padrões de infecção passiva ou o miracídio, larva ciliada livre-natante, penetra ativamente no hospedeiro intermediário, caracterizando o padrão de infecção ativa, que é exclusivo de ciclos aquáticos. Durante o desenvolvimento intramolusco, ocorrem várias gerações resultantes de reprodução assexuada: esporocistos de primeira e segunda geração, rédias e cercárias. Sendo que os estágios de esporocistos de segunda geração e rédia são exclusivos. Ou seja, não ocorrem em um mesmo ciclo. Nos ciclos de vida de *S. mansoni* e *E. coelomaticum* o esporocisto de primeira geração por um processo de poliembrião dá origem aos esporocistos de segunda geração. Enquanto que, no ciclo de *F. hepatica* os esporocistos de primeira geração dão origem a rédias, que originaram as cercárias (BRUSCA & BRUSCA, 2007).

Existem três possibilidades para a cercária, após o seu completo desenvolvimento: encistar, transformando-se em metacercária, no interior do molusco, único hospedeiro intermediário; abandonar o molusco, encistar no ambiente ou penetrar em um segundo hospedeiro intermediário e encistar, nestes casos a infecção do hospedeiro definitivo é passiva por ingestão da metacercária, ou penetrar ativamente no hospedeiro definitivo e maturar sexualmente, transformando-se no adulto.

2.3 *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907

Entre os parasitos comumente encontrados em pâncreas de bovinos, podem ser destacadas espécies de trematódeos digenéticos do gênero *Eurytrema* Looss, 1907. Esses pertencem à família Dicrocoeliidae Odhner, 1910 e necessitam de dois hospedeiros intermediários para que seu desenvolvimento larval se complete e possam chegar à maturidade sexual no hospedeiro definitivo, na maioria das vezes, mamíferos herbívoros.

Através da revisão da literatura verificou-se que os estudos tem se concentrado nas espécies: *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907, que segundo Travassos (1944) é a única espécie a ocorrer na América do Sul, e *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) Looss, 1907, que ocorre na Ásia, Europa e Rússia Oriental, por se tratarem de espécies que possuem uma maior distribuição geográfica e que também tem gerado controvérsias quanto a sua posição taxonômica. *Eurytrema coelomaticum* foi erroneamente

referida por alguns autores como *E. pancreaticum* (CAMPOS et al., 1974; Buseti et al., 1983). Contudo, estudos recentes como o realizado por Zheng et al. (2007), através da comparação da sequência gênica do RNA ribossomal 18S destas duas espécies, revelaram que a nível molecular, são de fato diferentes, sendo *E. coelomaticum* endêmica do Brasil (ILHA et al., 2005).

Eurytrema coelomaticum tem despertado o interesse de alguns pesquisadores pelas elevadas taxas de prevalência e intensidade de infecção observadas em bovinos abatidos em matadouros frigoríficos nos diversos estados brasileiros (BRANT, 1962; AZEVEDO et al., 2000; YAMAMURA & BASSANI, 2005).

A maioria dos autores descreve os aspectos parasitológicos, histopatológicos e descrições de necropsias. Contudo, informações referentes à patologia clínica em animais severamente infectados, não são fornecidas (PALATKIN, 1978 in BASSANI et al., 2007; BRITO et al., 1981; BORAY, 1985; GASTE, 1991; BELÉM et al., 1994).

Na China e no Japão, nas últimas décadas, a euritrematose também tem sido motivo de preocupação dos pesquisadores, porque a mortalidade em bovinos vem aumentando anualmente (SHIEN et al., 1979; SAKAMOTO et al., 1984), sendo que a continuidade dos estudos sobre o tema tem ocorrido, principalmente, no Brasil.

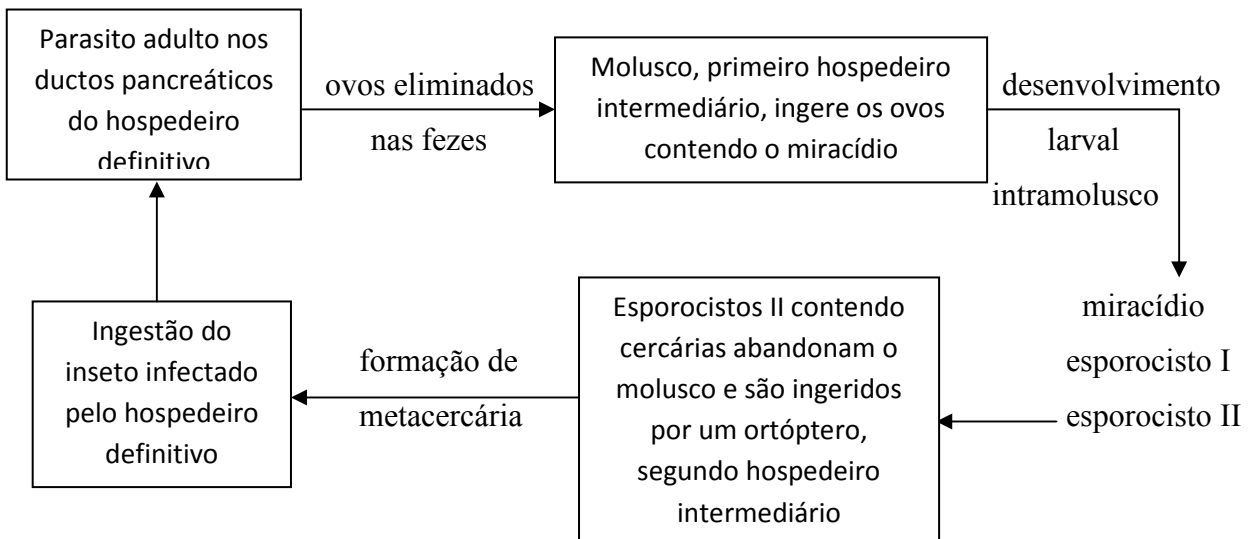
Estudos comprovaram a ineficiência dos anti-helmínticos usados para combater a euritrematose em bovinos (MATTOS JÚNIOR & VIANNA, 1987; YAMAMURA, 1989; ARAÚJO & BELÉM, 1993). Esta parasitose também causa prejuízos à indústria extrativa de insulina devido às condenações sumárias de pâncreas parasitados (PALATKIN, 1978 in BASSANI et al., 2007; BRITO et al., 1981; ZIEGLER et al., 1984; BORAY, 1985), perdas econômicas quanto à produção de carne e leite (BURGGRAAF, 1935 in BASSANI et al., 2007; BASCH, 1966 in BASSANI et al., 2007) e elevado índice de mortalidade, atingindo 6,6%, (19/300) (CORREA et al., 1984).

Yamamura (1989) classificou em três tipos as lesões macroscópicas causadas por *E. coelomaticum*, em função da extensão em: Tipo I – Ausência de lesões macroscópicas nos ductos e parênquima. Tipo II – Presença de lesões macroscópicas somente nos ductos. Tipo III – Presença de lesões macroscópicas nos ductos e parênquima. Os estudos histológicos dessa infecção demonstram invariavelmente a ocorrência de pancreatite intersticial crônica, com o tecido glandular sendo substituído por tecido fibroso; dilatação e obstrução de ductos pancreáticos; focos de células gigantes do tipo corpo estranho e acúmulo de ovos do parasito tanto nos ductos quanto no parênquima da glândula ou do pâncreas.

As lesões causadas e caracterizadas por pancreatite intersticial fibrosante e obliteração total ou parcial dos ductos pancreáticos, pode ocasionar transtornos, em graus variados, nas funções secretoras do pâncreas (BURGGRAAF, 1935 in BASSANI et al., 2007; SEIFRIED 1936 in BASSANI et al., 2007; CÔDO, 1952 in BASSANI et al., 2007; FOX et al. 1981).

Eurytrema coelomaticum apresenta ciclo biológico heteroxeno (Figura 2). Seu primeiro hospedeiro intermediário são espécies de caramujos terrestres do gênero *Bradybaena* Beck, 1837. *Bradybaena similis*, Férussac, (1821), foi descrita no Brasil como o primeiro hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum* (RAGUSA & CAMPOS, 1976).

Figura 2: Ciclo biológico de *Eurytrema* Looss, 1907.



2

Após a ingestão dos ovos do trematódeo, o miracídio eclode no tubo digestivo do molusco penetra na parede do tubo digestivo, onde se desenvolve em esporocisto-mãe, transformando-se em uma massa arredondada, fixada à superfície externa da parede intestinal. Os esporocistos-mãe crescem, e no seu interior muitos esporocistos-filhos se desenvolvem; quando estes se tornam alongados, abandonam o esporocisto-mãe e se localizam preferencialmente na glândula digestiva. Uma vez que o desenvolvimento das cercárias se complete, os esporocistos-filhos migram em direção ao pneumóstoma, a abertura respiratória do molusco e são eliminados ao ambiente. A emergência dos esporocistos-filhos normalmente ocorre horas antes do amanhecer. O desenvolvimento no interior do molusco se completa em 90 dias após a ingestão do ovo sob temperatura de 26°C, enquanto em condições ambientais pode levar de 250 a 350 dias (BRANDOLINI & AMATO, 2001; ITAGAKI & CHINONE, 1982).

De acordo com Yamaguti (1975) e Mattos et al. (1987), o segundo hospedeiro intermediário do *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* consiste em esperanças da família Tettigoniidae, gênero *Conocephalus* Baird & Girard, 1854 com as espécies: *C. maculatus* Bolivar, 1913, *C. chinensis* (Redtenbacher, 1891), *C. melas* Bei-Bienko, 1962, *C. gladius* (Redtenbacher, 1891), dentre outras. Itagaki & Chinone (1982) destacaram que o desenvolvimento da cercária em metacercária no segundo hospedeiro intermediário é também influenciado pela temperatura, informando que o aumento da temperatura acelera o desenvolvimento, podendo atingir o amadurecimento em 15 dias, na temperatura de 30°C.

A partir de um único miracídio de *Eurytrema* são produzidos cerca de 100 esporocistos filhos, que por sua vez contém em torno de 200 cercárias cada um, perfazendo um total de 20.000 formas infectantes, representadas pelas metacercárias (ITAGAKI & CHINONE, 1982).

Segundo Tang & Tang (1977), as metacercárias são encontradas na cavidade hemocelomática do inseto, podendo ou não atingir a região do tórax. Seu número pode variar de 1 a 461 metacercárias por inseto. Basch (1966) in Bassani et al. (2007) relatou que o hospedeiro definitivo adquire a infecção ao ingerir as esperanças infectadas junto com a pastagem. Estudos realizados por Chinone & Itagaki (1976), Sakamoto et al. (1980) e Chinone et al. (1984) demonstraram que as metacercárias são liberadas dos cistos no duodeno e migram para os ductos pancreáticos. O período pré-patente é de 90 a 100 dias e o período patente é de um a dois anos. Vários animais foram utilizados em infecções experimentais, mas somente os caprinos, coelhos, camundongos *BALB/c nude* e gatos adquiriram a infecção, sendo os caprinos e os camundongos *BALB/c nude* mais susceptíveis às infecções.

Ainda sobre o ciclo biológico do *E. coelomaticum*, Mattos Júnior & Vianna (1987) realizaram infecção experimental de *B. similaris* com ovos de *E. coelomaticum*, e as larvas desenvolvidas nesse hospedeiro foram estudadas morfológicamente através de ML, notando-se que a morfologia dos esporocistos expelidos pode caracterizar a espécie *E. coelomaticum*. O número de esporocistos expelidos por caramujo variou muito. As alterações histopatológicas encontradas no molusco hospedeiro intermediário foram causadas pela compressão das larvas que atingiam principalmente a glândula digestiva. Ortópteros das famílias Gryllidae, Acridiidae e Tettigoniidae foram capturados nos municípios de Lorena e Pindamonhangaba, Estado de São Paulo, e examinados à procura de metacercárias de *E. coelomaticum*. Apenas duas espécies de “esperanças”, os tettigoniídeos *Conocephalus saltator* Saussure, 1859 e *Conocephalus* sp. albergavam metacercárias de *E. coelomaticum*. Infecção experimental destes insetos, com esporocistos expelidos de *B. similaris* infectados experimentalmente, comprovou serem estes tettigoniídeos o segundo hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum*, o qual foi identificado pela primeira vez, no Brasil. A

prevalência média de *E. coelomaticum* em *B. similaris*, nos municípios estudados variou entre 9,7% e 20,1%, enquanto que em *Conocephalus* sp. variou entre 0,6% e 70%. Infecções experimentais em camundongos albinos linhagem BALB/c normal, em ratos linhagem Wistar e em cabras, utilizando-se “esperanças” infectadas experimental e naturalmente, bem como com metacercárias isoladas destes insetos, apresentaram resultados positivos apenas para as cabras. Os exemplares de *E. coelomaticum* coletados das cabras experimentalmente infectadas eram bem menores do que os normalmente coletados em bovinos. O que pode sugerir a influência do hospedeiro no desenvolvimento/crescimento do parasito. Embora, os autores não tenham mencionado tal relação.

Quanto ao desenvolvimento larval no primeiro hospedeiro intermediário, Brandolini & Amato (2001), através de processamento histológico dos moluscos infectados experimentalmente, traçaram a rota de migração intramolusco de *E. coelomaticum*, registrando um ovo do parasito na porção anterior do trato digestivo de *B. similaris* aos 15 minutos após o contato inicial com os ovos. Um miracídio livre foi observado no lúmen do trato digestivo de um molusco, dissecado uma hora após o contato inicial com os ovos. Nas dissecações realizadas aos 10 dias após a infecção, observaram esporocistos de primeira geração fixados na serosa da porção posterior do intestino. Aos 25 dias de infecção, foram observados esporocistos de primeira geração em vários estágios de desenvolvimento, espalhados pelo tecido peri-intestinal e ao redor da glândula digestiva. Estas autoras verificaram, ainda, esporocistos de segunda geração em vários estágios de desenvolvimento, na glândula digestiva, aos 60 dias pós-infecção. Esporocistos de segunda geração, totalmente desenvolvidos, foram observados migrando pelos espaços hemolinfáticos, no sentido da volta corporal de um molusco dissecado aos 70 dias pós-infecção. Os esporocistos de segunda geração emergiram sempre durante a noite, através do pneumóstoma. Sendo registrado pela primeira vez esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* emergindo pelo pneumóstoma de *B. similaris*.

As autoras supracitadas observaram a influência da temperatura no desenvolvimento do parasito no molusco, verificando uma relação positiva direta entre o número de esporocistos expelidos pelo molusco e a temperatura ambiente. Esta correlação foi mais evidente no mês de novembro. Chinone et al. (1976) estudaram o desenvolvimento de *E. pancreaticum* em *B. similaris* através de infecções experimentais realizadas em diferentes épocas do ano, verificaram que a duração do desenvolvimento larval no molusco variava de acordo com a época de infecção. Segundo estes autores, a extensão da luminosidade durante o dia poderia ter influenciado indiretamente o desenvolvimento deste trematódeo digenético, uma vez que a temperatura, outro fator a ser considerado, foi controlada e igual para as diferentes épocas de infecção. Tang & Tang (1977) verificaram as taxas sazonais de infecção dos hospedeiros intermediários de *E. pancreaticum* e, observaram uma alta prevalência de infecção, para ambos os hospedeiros, no verão, alcançando o pico no outono e diminuindo nos meses de inverno.

No Brasil e em outros países, os estudos relacionados à interface *E. coelomaticum*/*B. similaris* foram mais recorrentes entre as décadas de 70 a 90, porém a nossa literatura ainda é carente de estudos mais detalhados sobre o tema, que venham contribuir para a compreensão do relacionamento parasito-hospedeiro.

2.3.1 *Eurytrema coelomaticum* x *Eurytrema pancreaticum*

Na classificação dos trematódeos de localização pancreática, ao longo dos anos, surgiram dúvidas e quase todos os trabalhos inicialmente, descreviam os parasitos pela sua

localização habitual nos órgãos, pela localização errática nos seus hospedeiros, seguida pelas características fenotípicas, através das descrições morfológicas das estruturas dos órgãos do parasito e por fim pelas análises citológicas dos cromossomos do trematódeo.

Looss & Cuffey (1907), revendo a taxonomia desses trematódeos digenéticos apresentada por diversos autores, salientaram que a medida e a posição relativa das ventosas representavam características específicas. O diâmetro das ventosas oral e ventral era igual e a distância entre as duas ventosas era menor em *E. coelomaticum*, quando comparado com *E. pancreaticum*. Também era menor a formação de grupos de folículos da glândula vitelogênica encontrada em *E. coelomaticum*. A partir destas considerações, outros autores começaram a caracterizá-las como espécies distintas e acrescentaram outras estruturas, como o útero, que em *E. coelomaticum* não forma curvas anteriores à ventosa ventral, e as glândulas vitelogênicas que são constituídas de pequenos folículos arredondados (EDUARDO et al., 1976 in BASSANI et al., 2007).

Travassos (1944), em sua revisão da família Dicrocoeliidae reconheceu efetivamente *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* como espécies distintas e ressaltou ainda que a espécie prevalente na América do Sul era *E. coelomaticum*. Muitos autores a denominaram em seus trabalhos como *E. pancreaticum*, como Horta (1918), Freire (1967), Campos et al. (1974), Ribeiro et al. (1980), Busetti et al. (1983) e Correa et al. (1984), devendo na realidade, se tratar de *E. coelomaticum* levando em consideração a afirmação feita por Travassos (1944). Possivelmente, em outros países do continente sul americano, como a Venezuela, onde Mayaudon (1954) reportou a ocorrência de *E. pancreaticum* e levantou suspeita de que o animal parasitado fora importado do Brasil, poderia se tratar de *E. coelomaticum* (BASSANI et al., 2007).

Conforme Travassos (1944), *E. coelomaticum* possui um corpo achatado com 10 a 13mm por 6 a 7mm de largura. Tegumento liso, ventosa oral subterminal com 0,9 a 1mm de diâmetro. Acetábulo no terço médio do corpo, com dimensões iguais às da ventosa oral (Tabela 1). Faringe e esôfago delgados. Cecos intestinais delgados e sinuosos. Poro genital ligeiramente pós-bifurcal mediano. Bolsa do cirro muito grande, geralmente claviforme. Testículos pós-acetabulares com zonas coincidentes e campos afastados. Ovário submediano, pós-testicular. Glândulas de Mehlis, espermateca e canal de Laurer presentes. Vitelinos laterais, extracecais e com alguns folículos intercecais. Ovos com 0,042-0,50mm por 0,023-0,03mm. Vesícula excretora simples e poro excretor terminal.

Tabela 1: Medidas de espécimes adultos de *Eurytrema coelomaticum*, segundo Travassos (1944).

<i>Eurytrema coelomaticum</i>	Tamanho (mm)
Comprimento do corpo	10 – 13
Largura do corpo	6 – 7
Ventosa oral (diâmetro)	0,9 – 1
Acetábulo (diâmetro)	0,9 – 1

Tang & Tang (1977) realizaram trabalhos que diferenciaram os aspectos morfológicos dos parasitos adultos, bem como a morfologia das formas larvais encontradas nos hospedeiros intermediários, ressaltando a segunda geração de esporocisto.

Posteriormente, outros autores, Moriyama et al. (1980), abordaram em seus estudos as características fenotípicas e genotípicas, através das análises cariológicas de cromossomos de tecido gonadal de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*, designando-os neste estudo de tipo I e tipo II respectivamente, concluindo haver diferenças morfológicas e biométricas dos cromossomos, bem como as posições dos centrômeros nestas duas espécies.

De acordo com Mattos Júnior & Vianna (1987), há muitos anos, alguns problemas tem sido levantados quanto à diferenciação das espécies de *Eurytrema* mais especificamente de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*.

Sakamoto & Oikawa (2007) realizaram um estudo sobre as inclusões de cristais cúbicos na neoderme de *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum*, revelando que estas eram histoquimicamente positivas para proteínas, que foram analisadas através de diferentes métodos, especialmente: microscopia de luz, eletrônica de varredura, eletrônica de transmissão e eletroforese. Inclusive com resultados sobre as características morfométricas das formas adultas e dos ovos desses dois parasitos, contribuindo assim, com dados para a diferenciação entre as espécies.

2.4 Morfologia dos Trematódeos Digenéticos

Os caracteres morfológicos dos estágios larvais vem sendo cada vez mais utilizados na classificação dos trematódeos digenéticos. Ehlers (1985) usou caracteres ultraestruturais observados em larvas e conservados nos adultos em uma hipótese de relacionamento filogenético entre taxa. Brooks et al. (1985; 1989) apresentaram em sua classificação, uma análise cladística baseada em todos os estágios do ciclo biológico. A espécie *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) foi revista por Kanev et al. (1993) baseando-se na morfologia das projeções tegumentares da cauda das cercárias. Gibson & Bray (1994) e Gibson (1996) sugeriram uma classificação bastante simplificada dos digenéticos, dividindo o grupo em três ordens, de acordo com a morfologia da cauda da cercária e o padrão de infecção do molusco primeiro hospedeiro intermediário. Tais referências servem para exemplificar o importante papel que o conhecimento de detalhes da morfologia dos estágios larvais dos trematódeos digenéticos pode exercer na taxonomia deste grupo.

De semelhante modo, o estudo da ultraestrutura das larvas dos trematódeos pode fornecer informações adicionais que permitam esclarecer pontos acerca das características destes organismos, que muitas vezes fogem ao poder de resolução da microscopia de luz. Como também informações sobre aspectos celulares dos parasitos, alguns detalhes da interface parasito-hospedeiro, aspectos da fisiologia da larva e de sua interação com o hospedeiro, que contribuam para o sucesso da colonização de seu primeiro hospedeiro intermediário.

Em se tratando da contribuição dos caracteres morfológicos para determinar a posição taxonômica de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*, nos estudos realizados na China por Tang & Tang (1977), não só os aspectos morfológicos dos parasitos adultos foram utilizados para esta distinção, mas também a morfologia das formas larvais nos hospedeiros intermediário foi considerada, como o tamanho (comprimento e largura) e formato do corpo das larva, dos esporocistos expelidos e o tamanho das cercárias (ventosa oral, acetábulo e células da parede de excreção) das duas espécies de *Eurytrema* em questão.

2.4.1 Ovos

Os ovos contendo o embrião em desenvolvimento ou o miracídio já completamente formado, ao serem eliminados pelo hospedeiro definitivo, passam por meios de diferentes composições químicas, como sangue, fezes ou escarro, chegando ao meio externo, onde são lançados na água, sendo, então, submetidos a uma nova e brusca variação na osmolaridade, pH e composição do meio, ou são lançados no solo, onde estão sujeitos à dessecação. Apesar de toda esta adversidade, muitos dos ovos liberados pelos trematódeos digenéticos permanecem viáveis e permitem o prosseguimento do ciclo biológico do helminto.

Sendo os fatores acima suficientes para justificar a grande quantidade de estudos realizados sobre a morfologia, ultraestrutura e composição, principalmente a casca dos ovos dos trematódeos.

Muitos autores tem analisado a ultraestrutura da casca do ovo de *S. mansoni* (BASCH & BASCH, 1982; RACE et al., 1971; KUSEL, 1970; RACE et al., 1969) e *F. hepatica* (WILSON, 1967), mas poucos observaram o ovo inteiro. Neill et al. (1988) realizaram uma análise ultraestrutural dos ovos de *S. mansoni*, observando a existência das três camadas: a camada externa microespinhosa, a camada média intermediariamente densa e a camada interna densa. A camada de Reynold, que se desenvolve subjacente à casca do ovo, sendo formada por filamentos ramificados à qual se adere uma única camada de células escamosas denominada envelope de von Lichtenberg. Entre este envelope e o embrião há um espaço, a lacuna de Lehman.

No que se refere ao estudo dos ovos de *Eurytrema* spp., a literatura apresenta informações acerca do tamanho dos ovos e algumas características da casca.

Considerando as espécies *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*, Travassos (1944) registrou o comprimento e a largura de 50 - 42µm por 30 - 23µm, respectivamente para ovos de *E. coelomaticum*. Tang (1950) observou medidas de comprimento e largura de 46 e 32µm, respectivamente, para os ovos de *E. pancreaticum*. As medidas realizadas por estes autores indicam que os ovos de *E. coelomaticum* são maiores que os de *E. pancreaticum* (Tabela 2). Outros estudos destacaram que os ovos, quando maduros, são de cor castanho pardo e apresentam casca espessa (TRAVASSOS, 1944). Porém, Tang & Tang (1977) demonstram que a casca do ovo é dividida em três camadas, conforme a maioria das espécies de trematódeos analisadas e que, geralmente, apresenta as camadas externa e a interna finas e mais elétron densas e a camada média espessa e densa. Porém, cada grupo apresenta sua particularidade na constituição da parede do ovo.

Tabela 2: Medidas comparativas dos ovos de *Eurytrema coelomaticum* e *Eurytrema pancreaticum*, segundo Travassos (1940) e Tang (1950).

Tamanho dos Ovos (µm)	Travassos (1944)	Tang (1950)
	<i>E. coelomaticum</i>	<i>E. pancreaticum</i>
Comprimento	42 – 50	46
Largura	23 – 30	32

Atualmente, estudos que analisam a ação de fungos nematófagos sobre ovos de trematódeos têm sido realizados como uma forma de controle biológico alternativo da euritrematose. Ao observar *in vitro* a ação deste tipo de fungo sobre os ovos de *E. coelomaticum*, Braga et al. (2008), classificaram em três tipos os efeitos causados pelos isolados dos fungos nos ovos do parasito, após completarem sete, 10 e 14 dias de exposição:

- tipo I, efeito lítico sem prejuízo morfológico da casca do ovo;
- tipo II, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião; e,
- tipo III, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo.

Um dos isolados (VC1) apresentou resultados percentuais para o efeito do tipo III que determinam a atividade ovicida de um fungo: 27,2% aos sete dias, 23,1% aos 10 dias e 25,0% aos 14 dias. Da mesma forma que outro isolado (VC4) apresentou: 15,0% aos sete dias, 25,4% aos 10 dias e 21,8% aos 14 dias respectivamente. Os autores concluíram que *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschlo ex Barron & Onions) Zare & W-Gams é um fungo promissor que pode ser usado no controle biológico de *E. coelomaticum*.

Em estudo sobre mortalidade de gado bovino parasitado por *E. coelomaticum* no Estado do Paraná, os autores, Ilha et al. (2005), relataram terem observado ovos refringentes acastanhados de *Eurytrema* sp. aderidos em áreas de fibrose no pâncreas dos bovinos desencadeando uma reação inflamatória que variou de ausente a severa, sendo caracterizada como reação granulomatosa composta por linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas de segmentação e ovos operculados ovais com casca grossa marrom refringentes de trematódeos. Headlley et al. (2009) relataram que infiltrados inflamatórios associados a infecção induziu lesões pancreáticas predominantemente eosinofílicas e em alguns casos, as reações granulomatosas no parênquima pancreático foram observadas quando os ovos foram fagocitados por células gigantes. Resultados semelhantes haviam sido descritos anteriormente por Belém et al. (1994) e Yamamura et al. (1995). Todos esses dados demonstram a importância da parasitose no que tange a produção pecuária uma vez que estudos registram que a destruição do pâncreas é diretamente proporcional à intensidade de infecção (número de adultos ou ovos) presentes nos ductos pancreáticos interlobulares (BASSANI et al., 2006; HEADLEY et al., 2009). Condenando o gado ao descarte, mesmo quando o número de ovos nas fezes dos animais parasitados seja inversamente proporcional à severidade das lesões ocorridas no pâncreas. Isso, provavelmente, seja devido à obstrução mecânica dos ductos pancreáticos pela reação inflamatória crônica ocorrida ao redor e fibrose com obstrução do lúmen dos ductos pancreáticos, impedindo que os ovos sejam excretados com a bÍlis (YAMAMURA, 1989). Assim, a ausência de ovos nos exames de fezes não significa que o animal não esteja parasitado por *E. coelomaticum*.

2.4.2 Miracídios

Uma das etapas importantes do ciclo de vida de um trematódeo é a penetração do miracídio no molusco hospedeiro. Este processo inclui a adesão do miracídio à superfície do molusco e, subsequente entrada, através da derme do hospedeiro. Assim sendo, a participação da papila apical, o “terebratorium”, neste processo é de prima importância, como destacaram Dawes (1960) in Wilson (1969a) e Wajdi (1966).

LoVerde (1975) postulou que o topo do “terebratorium” pudesse invaginar para formar uma estrutura que funcionasse como uma ventosa, o que facilitaria sua adesão ao molusco.

Muitos dos estudos realizados sobre a morfologia e ultraestrutura de miracídios utilizaram como modelos, ciclos aquáticos com infecção ativa do molusco e, principalmente, com espécies de *Schistosoma* (WIKEL & BOGITSCH, 1974; SAKAMOTO & ISHII, 1978; PAN, 1980) e *F. hepatica* (WILSON, 1969a; SOUTHGATE, 1970; KOIE et al., 1976).

Wilson (1969b) descreveu a morfologia das células-flama dos miracídios de *F. hepatica*, estando estas localizadas anteriormente e, geralmente, orientadas paralelamente ao longo do eixo do corpo.

Kümmel (1958) realizou observações ultraestruturais do sistema protonefridial do miracídio de *F. hepatica*, com detalhes das células-flama e dos túbulos e poros excretores.

Southgate (1970) descreveu a ultraestrutura do tegumento, denominado por ele de “epiderme”, do miracídio de *F. hepatica*, citando que as células epidérmicas apóiam-se sobre a lâmina basal existente logo após a camada muscular e que estas células aderiam-se através de numerosas junções fechadas (*tight junctions*).

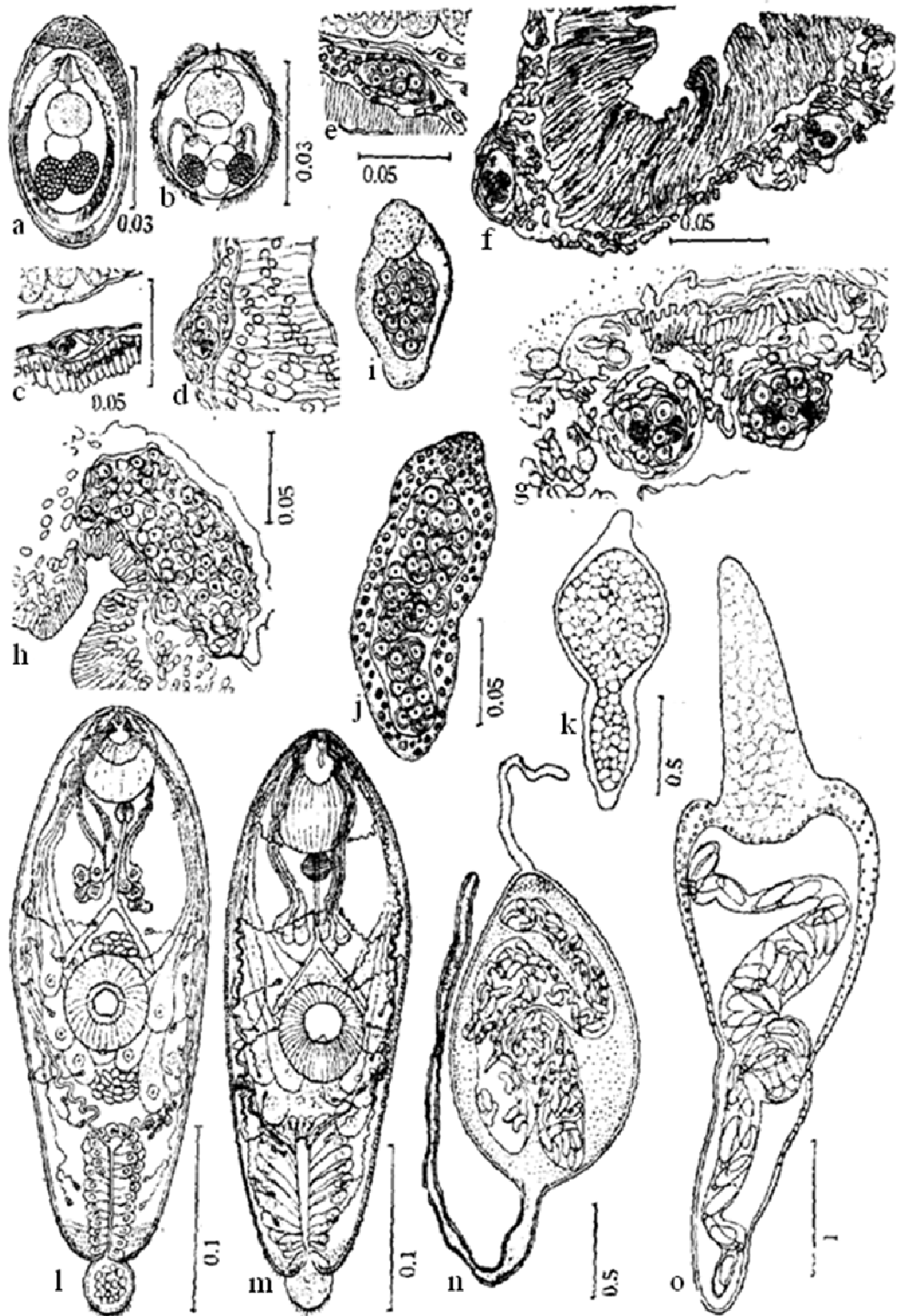
Diferente do que ocorre em *S. mansoni*, o miracídio de outros trematódeos, como *F. hepatica* e *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967, perdem suas placas epidérmicas ciliadas antes da penetração no molusco hospedeiro, o que faz com que as alterações que ocorrem nas placas epidérmicas de miracídios de *S. mansoni* somente após sua penetração no molusco, possam ser observadas nos miracídios de *E. paraensei* mesmo antes que se dê a penetração no primeiro hospedeiro intermediário. Tang & Tang (1977) relataram que os miracídios emergidos dos ovos de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* na região da primeira parte do intestino do molusco, perdem os cílios antes de atravessarem a camada de células (parede celular) do intestino. O que leva à conclusão de que a perda das placas ciliadas ocorra dentro do molusco. O trabalho destes autores constitui o único registro ilustrado do miracídio de *E. coelomaticum*, como pode ser observado na Figura 3.

Segundo Voge & Seidel, 1972, durante o processo de eliminação das placas epidérmicas ciliadas, podem estar envolvidos mecanismos como: ação concomitante do batimento ciliar, atividade muscular, expansão das faixas interepidérmicas contra e sob as placas, mudança da osmolaridade do meio. Nos miracídios de *S. mansoni* (WIKEL & BOGITSCH, 1974; BASCH & DICONZA, 1974) e de *F. hepatica* (SOUTHGATE, 1970), a cavitação basal ou a formação de vacúolos sob as placas tem sido apontada como causa do processo de eliminação destas estruturas. Inclusive a presença esporádica destas cavidades ou vacúolos é indicação de que estas estruturas sejam mais uma consequência do que a causa da eliminação das placas epidérmicas, como afirma Meuleman et al. (1978).

Pan (1980) realizou um extenso estudo sobre a ultraestrutura do miracídio de *S. mansoni* fazendo poucas referências às características das células epidérmicas ciliadas. Porém, o autor descreveu a ultraestrutura das glândulas apical e lateral no miracídio de *S. mansoni*, demonstrando uma grande quantidade de grânulos elétron-densos em seu interior e a abertura da glândula apical, a qual conduz material de secreção para o meio externo.

Posteriormente, ao detalhar a região anterior do miracídio de *F. hepatica*, Buzzell (1983), observou que esta possui uma grande glândula apical e quatro glândulas laterais unicelulares, todas apresentando ductos que se abrem na extremidade do “terebratorium”. A glândula apical parece estar envolvida no processo de penetração do miracídio em seu hospedeiro intermediário, secretando substâncias químicas com atividade lítica no momento em que a larva adere à superfície do corpo do molusco. Já as glândulas laterais apresentam-se PAS-positivas e podem conter glicoconjugados neutros.

Figura 3: Comparação entre fases de desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 e *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) Looss, 1907 dentro do primeiro hospedeiro intermediário molusco. *Eurytrema coelomaticum*: **a.** Ovo; **b.** Miracídio; **c-e.** Esporocisto-mãe de primeira fase (5-16 dias); **i-k.** Esporocisto de primeira fase e fase intermediária (70 dias e 11 meses); **l.** Cercária; **n.** Esporocisto maduro. *Eurytrema pancreaticum*: **f-h.** Esporocisto-mãe de primeira fase (10-20 dias); **m.** Cercária; **o.** Esporocisto maduro. Fonte: Tang & Tang, 1977.



Alguns autores (LIE & BASCH, 1967; DIMITROV et al., 1995; DIMITROV et al. 1998) utilizaram o estudo das estruturas argentofílicas de miracídio de equinostomatídeos propondo uma taxonomia para representar a distribuição de placas epidérmicas ciliadas e de papilas ao longo do corpo da larva, observando outras estruturas como a presença de papilas na região do “terebratorium” e na primeira faixa interepidérmica dos miracídios, através de técnica de impregnação com o nitrato de prata (AgNO₃). Esses dados reforçam a hipótese de que o número de faixas de células epidérmicas ciliadas e o número destas células em cada faixa sejam características que contribuam para classificação de gênero.

Nenhuma observação foi realizada, até o momento, sobre a morfologia e ultraestrutura das placas ciliadas epidérmicas ou sobre o sistema excretor ou demais estruturas dos miracídios de *Eurytrema*.

2.4.3 Esporocistos

A ausência de uma abertura oral, como encontrada nas rédias, de estruturas especializadas, como o “terebratorium” e as placas ciliadas presentes nos miracídios; das ventosas oral e ventral e da cauda das cercárias, fizeram com que os esporocistos fossem considerados, durante muito tempo, como simples sacos germinativos, sendo, por isso, deixados à parte no estudo das formas larvais dos trematódeos digenéticos.

Alguns estudos foram realizados sobre a morfologia e a ultraestrutura dos estágios larvais dos digenéticos, porém o estágio esporocisto foi seguidamente omitido nestes estudos (SAKAMOTO & ISHII, 1978; KREJCI & FRIED, 1994).

Boa parte dos estudos realizados sobre a morfologia/ultraestrutura de esporocistos de trematódeos digenéticos encontra-se voltada para o desenvolvimento de *F. hepatica* e *S. mansoni*.

Southgate (1970) observou que após a perda das placas epidérmicas ciliadas e a penetração no molusco hospedeiro, o miracídio de *F. hepatica* origina o esporocisto, através da expansão das faixas interepidérmicas.

Segundo Meuleman et al. (1978), em um período compreendido entre duas e 48 horas após a penetração, o miracídio de *S. mansoni* dá origem ao esporocisto-mãe. Após a perda das placas epidérmicas ciliadas, há o desenvolvimento da camada sincicial do tegumento em sua maior extensão. A fina camada externa, agora exposta, torna-se mais espessa e uniforme e tornando-se fortemente aumentada pela presença de um grande número de microvilosidades e dobras, as quais são envolvidas por um material eletrondenso, o que indica a necessidade de haver intensas trocas entre a larva e a hemolinfa do molusco hospedeiro neste estágio. Na base destas projeções citoplasmáticas, ocorrem invaginações, onde são encontradas várias vesículas, as quais parecem estar se dirigindo ao interior do citoplasma, sugerindo a ocorrência de um processo de endocitose. Nesta camada externa, encontram-se mitocôndrias, glicogênio, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso e inclusões lipídicas.

O desenvolvimento dos esporocistos de segunda geração de *S. mansoni* no interior dos esporocistos de primeira geração foi descrito por Meuleman et al. (1980). O tegumento dos esporocistos de segunda geração apresenta uma organização semelhante àquela dos esporocistos de primeira geração descrita por Meuleman et al. (1978), com uma camada externa conectada a corpos celulares localizados internamente, os quais formam extensões que envolvem as células germinativas. As células do parênquima, onde as células germinativas estavam incluídas antes, sofreram degeneração. Quando os embriões do esporocisto de segunda geração se desenvolvem, eles são envelopados por um epitélio primitivo formado pelas extensões da estrutura tegumentar dos esporocistos de primeira

geração. As células somáticas se expandem e coalescem na periferia da larva em desenvolvimento, para formarem a futura camada externa do tegumento, o epitélio primitivo degenera e a camada recém-formada perde seus núcleos, tornando-se conectada aos corpos celulares nucleados localizados internamente.

As alterações ocorridas na transformação do miracídio de *S. mansoni* após a sua penetração em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) foram descritas por Pan (1996) através de técnicas ultraestruturais relatando que cinco horas após a penetração, a larva não tem características específicas que lhe permitam classificar como miracídio ou esporocisto, sendo denominada por este autor de pós-miracídio, caracterizando-se num estágio vulnerável, pois se encontra desprovido de sua superfície protetora e estando os tecidos internos como a lâmina basal e os músculos expostos às atividades de defesa do hospedeiro. Cerca de cinco horas após sua penetração no molusco, o miracídio dá origem a um esporocisto, já completamente envelopado por um fino tegumento sincicial, cujos corpos celulares estão localizados abaixo das camadas musculares e conectados ao sincício por pontes citoplasmáticas. O autor observou que durante este processo, logo após a perda das placas epidérmicas ciliadas, as faixas interepidérmicas se expandem e o número das vesículas ligadas à membrana aumenta significativamente nas faixas interepidérmicas e nos corpos celulares destas, onde há um aumentado número de mitocôndrias e a expansão das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, encontrando ainda grande número de ribossomos e complexo de Golgi e carboidratos sugerindo uma intensa atividade de síntese protéica. Estas vesículas também foram observadas assim como nas pontes citoplasmáticas, o que sugere que estas estruturas são sintetizadas nos corpos celulares e deslocadas até as faixas interepidérmicas. Muitas das vesículas aderem à superfície interna da membrana das faixas interepidérmicas e, então, rompem-se liberando seu conteúdo eletrondenso nos tecidos do molusco, enquanto suas membranas são incorporadas ao novo tegumento em formação. Nas regiões onde o conteúdo destas vesículas é liberado, os pseudópodes dos amebócitos se espalham sobre a superfície do tegumento do parasito. Tal fato sugere que além de atuarem como reservas de membrana para a rápida formação do novo tegumento, as vesículas ligadas à membrana liberam substância(s) que protege(m) o esporocisto-mãe recém-formado do ataque das células de defesa do hospedeiro, evitando seu íntimo contato com a superfície do novo tegumento.

Segundo Ataev et al. (1997), o desenvolvimento intramolusco dos esporocistos de *Echinostoma caproni* Richard, 1964 é constituído por cinco fases. (I) Repouso - o esporocisto-mãe pára e não se move por, no mínimo cinco minutos, tornando a parede do corpo mais espessa e com formação de processos papiliformes posteriores, através dos quais os esporocistos se prendem aos tecidos do molusco. (II) Migração - após cinco a nove horas da penetração, o esporocisto começa a se mover ativamente em direção ao coração do molusco (dependendo do local de penetração a rota de migração pode ser variada). (III) Crescimento - após alcançar o coração, ocorre o rápido aumento do número de células somáticas e o rápido desenvolvimento do material germinativo, tendo uma duração de oito a 14 dias. (IV) O período de reprodução - com duração de 14 a 24 dias, é caracterizado por um intenso processo de desenvolvimento e produção de embriões de rédias, durante seu tempo de vida, o esporocisto origina cerca de 15 rédias-mãe, metade destas é originada das células germinativas e a outra metade das células germinativas secundárias originadas a partir das células indiferenciadas. (V) Degeneração - ocorre entre 22 a 31 dias após a infecção, após o período de produção de rédias, sendo o início da degeneração o fator responsável pelo final do processo de reprodução, uma vez que quando os esporocistos começam a degenerar, há ainda embriões de rédia em seu interior.

Segundo Tang & Tang (1977), os esporocistos de primeira geração de *E. coelomaticum* são formados após a travessia dos miracídios na parede do intestino do molusco. Os esporocistos, então, crescem e assumem um formato de bola e se aderem na parte externa da parede do intestino. Em condições de temperatura adequada, estes se desenvolvem e após 3 a 4 meses de infecção, as bolas germinativas existentes no interior do esporocisto de primeira fase (Figura 3), também chamado de esporocisto mãe, originam esporocistos em formato de tiras, alongados, de tamanhos diferentes (Figura 3). Depois de 5 a 6 meses, são produzidas no interior do esporocisto, cercárias de cauda curta e espinhosa. Os esporocistos maduros, esporocistos de segunda geração ou esporocistos filhos, saem do esporocisto mãe, se movem em direção à câmara de ar localizada na região anterior do molusco e se depositam nesta região, podendo formar grupos de 10 a 120 indivíduos. Em seguida, estes são liberados através do orifício de respiração dos moluscos (pneumóstoma). Os esporocistos maduros de *E. coelomaticum* são finos e compridos/alongados (6,9-7,9 x 0,7-1,0mm). Ao entrar em contato com o ambiente externo, a parede externa se destaca da parede interna do esporocisto, as duas extremidades da parede externa encolhem, a parede interna da cercária se move em direção à parede média do corpo e se dobra, deixando todo esporocisto estufado na parte intermediária. As extremidades apresentam formatos e comprimentos diferentes (Figura 3).

Cortes histológicos da serosa da porção posterior do intestino de *B. similaris* infectada por *E. coelomaticum*, realizados por Brandolini & Amato (2001), mostraram que os esporocistos de primeira geração apresentavam formato oval, contendo em seu interior uma massa de células germinativas, sendo as referências citadas acima as únicas que relatam sobre a morfologia deste estágio larval em *E. coelomaticum*.

A questão sobre a classificação de *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum* sempre foi ponto de discussão de diversos autores. Durante o processo de trabalho de Tang & Tang (1977) foi possível observar que as espécies possuem características com diferenças sutis em relação ao ciclo de vida, como por exemplo, o tamanho do esporocisto de primeira geração de *E. pancreaticum* é maior que o de *E. coelomaticum* (Figura 3), assim como os esporocistos de segunda geração, maduros, eliminados pelos caramujos policromos são mais curtos e grossos (2,3–5,9 x 0,9–1,5mm). No ambiente externo, a parede interna do esporocisto de *E. pancreaticum* é descamada como a parede externa. Diferente do que ocorre em esporocistos de *E. coelomaticum*, os esporocistos de *E. pancreaticum*, ao serem eliminados encolhem e se dobram na região imediatamente após o meio do corpo, o tegumento na região anterior é mais espesso, cuja base aumenta, adquirindo um aspecto inchado, o qual vai diminuindo em direção à região posterior do corpo (Figura 3).

Segundo Ataev et al., 1998, grande parte dos estudos que mostram o desenvolvimento dos esporocistos, o fazem através de análise histológica e histoquímica, uma vez que observações *in vitro*, não permitem a sobrevivência das larvas por um tempo prolongado, sendo difícil a manutenção de larvas de trematódeos em meios de cultura. Dessa forma, o que se observa na verdade é apenas a transformação de miracídio em esporocisto e não o desenvolvimento deste último estágio larval.

Porém, nos trabalhos de Tang & Tang (1977), os autores registraram a capacidade de sobrevivência dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* no ambiente externo. Nos esporocistos maduros após sua eliminação pelo pneumóstoma dos moluscos para o meio externo, graças à proteção da parede do cisto e dos líquidos da parede interna, as cercárias mantem a capacidade de infecção no meio externo depois de certo período. Hashito (1973) *in* Tang & Tang (1977) registrou que as cercárias de *E. pancreaticum* podem sobreviver até 48 horas no meio externo e são capazes de sobreviver até 60 horas em condições de laboratório.

Sob temperatura de 20-23 °C, Tang & Tang (1977) colocaram esporocistos maduros ou de segunda geração junto com folhas de grama em meio úmido, pouco úmido e seco durante 24 – 60 horas. Em tempos diferentes, realizaram dissecação de *C. maculatus* e analisaram as condições de infecção dos esporocistos. Os autores concluíram que: (I) a parede interna completa garante a sobrevivência das cercárias no interior do esporocisto por um período no meio externo; (II) a capacidade de encolhimento da parede interna dos esporocistos não muito maduros é deficiente, as cercárias também não são maduras. Ao sair do corpo dos caracóis, os esporocistos são engolidos pelo *C. maculatus* e apenas poucas cercárias podem se desenvolver para metacercárias; (III) as cercárias dos esporocistos maduros no meio externo podem sobreviver de 30 a 60 horas, mas a capacidade de infecção atinge pico nas primeiras 24 horas. O ambiente de sobrevivência dos *C. maculatus* é próximo ao dos caracóis. No meio pouco úmido, os esporocistos liberados pelos caracóis possuem capacidade de infecção em 1-2 dias.

2.4.4 Cercárias e metacercárias

Na maior parte das espécies dos trematódeos a cercária constitui um estágio larval que deixa o organismo do molusco hospedeiro intermediário, alcança o meio exterior e conquista um novo hospedeiro, seja um segundo hospedeiro intermediário, por infecção ativa ou passiva, ou um hospedeiro definitivo, infecção ativa. Isso torna este estágio larval alvo de muitos estudos e observações, principalmente, no que se refere a sua capacidade de adaptar-se tão rapidamente a mudanças de ambientes com características tão variadas, como pH, temperatura e osmolaridade.

Em um estudo sobre a ultraestrutura das cercárias de *S. japonicum* Katsurada, 1904, utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), Sakamoto & Ishii (1978) observaram a presença de espinhos no tegumento das larvas, inclusive na região da cauda destas. Utilizando a impregnação com AgNO₃, estes autores observaram o número e o padrão de distribuição das papilas no corpo e na cauda das cercárias.

A existência de algumas características marcantes das cercárias define seu tipo morfológico, podendo, inclusive, determinar o gênero – a “echinostome cercaria”, como é o caso de *Echinostoma*, que apresenta um característico colar de espinhos periorais.

A descrição da morfologia e ultraestrutura das cercárias recebe grande atenção taxonômica pela presença destas e de outras estruturas, especialmente nos estudos voltados para *Echinostoma*. Vários autores registraram características das cercárias durante o seu desenvolvimento, como: constituição do tegumento e surgimento de espinhos (MOHAMED,1992); (re)descrição da cauda e dobras tegumentares (JEYARASASINGAM et al., 1972; KANEV & FRIED, 1982; KANEV et al.,1993; KANEV & FRIED, 1994); terminações nervosas sensoriais/papilas (Zdarska, 1992; FRIED & FUJINO, 1987).

Em 2002, Dorsey et al. realizaram uma extensa revisão sobre a ultraestrutura da cercária de *S. mansoni*, descrevendo, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), os tipos celulares que ocorrem no tegumento e sistemas nervoso, osmorregulador, muscular e primórdios do digestivo. Células características do estágio cercarial também foram descritas e estes autores relacionaram estes tipos celulares com o processo de penetração no hospedeiro definitivo.

Tang & Tang (1977) observaram que os esporocistos de segunda geração maduros possuem, em seu interior, centenas de cercárias de cauda curta espinhosa (Figura 3). O tamanho da cercária de *E. coelomaticum* é de 0,23 – 0,37 x 0,112 – 0,140mm, de comprimento e largura, respectivamente, ventosa oral com 0,049 – 0,055mm de diâmetro, que é menor do que a ventosa ventral que apresenta 0,05 – 0,06mm de diâmetro; as células da

parede do ducto excretor são em forma de tubo e possuem núcleo celular visível, a fórmula das células-flama é $2[(2+2+2)+(2+2+2)]=24$, esta ordem continua até as cercárias da fase tardia (Figura 3.16). Os autores sugerem que esta ordem continue até a fase adulta.

As cercárias de *E. pancreaticum* apresentam 0,33 – 0,38 x 0,12 – 0,15mm de comprimento e largura, respectivamente, ventosa oral com 0,06 – 0,07mm de diâmetro, que é pouco maior do que ventosa ventral que possui 0,05 – 0,06mm de diâmetro, as células da parede do ducto excretor são mais grossas (Figura 3) quando comparadas as de *E. coelomaticum*. Com estas diferenças, os autores consideraram *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum* como espécies próximas, mas diferentes.

Os valores descritos acima podem ser comparados com os registrados anteriormente por Travassos (1944) e Tang (1950) na Tabela 3.

O estudo mais detalhado sobre o desenvolvimento de *E. coelomaticum* no seu segundo hospedeiro intermediário, inseto, foi realizado por Tang & Tang (1977) no qual percorreram sobre a quantidade de esporocistos administrados experimentalmente aos insetos, evidenciando que estes podiam albergar de uma a 461 metacercárias, e que estas poderiam ser encontradas na cavidade abdominal do inseto, podendo ou não atingir a região do tórax. Os autores também concluíram que ao saírem do corpo dos caramujos e serem engolidas pelo *Conocephalus maculatus*, apenas poucas cercárias podem se desenvolver em metacercárias, apesar das cercárias dos esporocistos maduros no meio externo poderem sobreviver de 30 a 60 horas, a capacidade de infecção atinge pico nas primeiras 24 horas.

Posteriormente, Itagaki & Chinone (1982) registraram as medidas das metacercárias de *E. coelomaticum*. Os autores observaram que estas atingem 350µm de comprimento.

Segundo Mattos Jr. (1987), as metacercárias de *E. coelomaticum* se localizam tanto no abdômen, onde ocorrem com maior frequência, quanto no tórax do seu segundo hospedeiro intermediário. O número de metacercárias por inseto foi de 72 em média e, as medidas dos cistos aos 23 dias pós-infecção variou de 322 a 368µm de comprimento, por 184µm de largura. Os cistos possuíam aspecto brilhante de coloração marrom pálido, eram arredondados ou ovais e demonstravam uma parede bem delimitada, lisa e bastante resistente. As metacercárias estão envolvidas por um tecido frouxo acidofílico e os cistos apresentavam parede acelular, coloração basofílica e possivelmente constituídas por fibras colágenas. O número médio de metacercárias encontradas por estes autores foi bem menor que os registrados por Tang & Tang (1977). Bash (1966) destacou que é difícil assegurar a maturidade do esporocisto e que, algumas cercárias podem ser mortas pelas peças bucais do hospedeiro (esperança), regurgitadas, ou não penetrarem no intestino do inseto devido a causas desconhecidas.

Tabela 3: Medidas comparativas das cercárias de *Eurytrema coelomaticum* e *Eurytrema pancreaticum*.

Tamanho das cercárias (mm)	Travassos (1944)	Tang (1950)
	<i>E. coelomaticum</i>	<i>E. pancreaticum</i>
Comprimento do corpo	0,23-0,370	0,33-0,38
Largura do corpo	0,112-0,140	0,12-0,15
Ventosa oral (diâmetro)	0,049-0,055	0,06-0,07
Ventosa ventral (diâmetro)	0,05-0,06	0,05-0,06

2.5 Filo Mollusca: Biologia, Ecologia e Importância

O Filo Mollusca se constitui em um dos mais numerosos filios animais apresentando-se distribuído em diferentes habitats até mesmo nos mais especializados micronichos ecológicos. Espécies de moluscos são encontradas desde profundas depressões marinhas até montanhas com grandes altitudes, em regiões áridas e desérticas e até em planícies geladas duramente atingidas pela longa duração do inverno (BARBOSA, 1995).

Os gastrópodes pulmonados terrestres são conhecidos por sua importância econômica e médico-veterinária. Diversas espécies são comestíveis e amplamente comercializadas, enquanto outras são pragas agrícolas de diversas culturas ou atuam como hospedeiros intermediários de várias espécies de helmintos. Aceitam uma ampla lista de itens alimentares, podendo permanecer durante semanas ou meses sem alimento (MEAD, 1979).

2.5.1 O molusco *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821)

Posição taxonômica segundo BURCH (1982) e THOMÉ et al. (1996).

Filo Mollusca Linnaeus, 1758

Classe Gastropoda Cuvier, 1797

Ordem Stylommatophora Schimidt, 1856;

Subordem Sigmurethra Pilsbry, 1900;

Infraordem Holopoda Pilsbry, 1896;

Superfamília Helicoidea Rafinesque, 1815;

Família Xanthonychidae Strebel & Pfeiffer, 1879;

Subfamília Bradybaeninae Pilsbry, 1939;

Gênero *Bradybaena* Beck, 1837;

Bradybaena similaris (Férussac, 1821).

Bradybaena similaris tem como sinônimos *Helix similaris* Férussac & Deshayes, 1820/1850 e *Eulota similaris* Tryon & Pilsbry, 1894 (THIELE, 1931; BURCH, 1982).

Em sua revisão sobre o gênero *Bradybaena* Beck, 1837, PILSBRY (1934) considerou *Fruticicola* Held, 1837 como seu sinônimo. Entretanto, THIELE (1931) havia citado *Bradybaena* e o sinônimo *Eulotella* (Moussoun) Martens, 1891.

Segundo Burch (1982), Xanthonychidae Strebel & Pfeiffer, 1879 tem como sinônimos Bradybaenidae Pilsbry, 1934 e Fruticicolidae Lindholm, 1927.

A concha de *B. similaris* apresenta aspecto geral heliciforme, com parede espessa e forte, constituída por cinco a seis voltas de espiras. O perfil das voltas é convexo, base arredondada translúcida e lisa. Mostra suturas evidentes, porém não muito profundas. As linhas de crescimento são mais pronunciadas na volta corporal, dando um aspecto levemente rugoso à superfície da concha. O umbílico é aberto, com os bordos se abrindo amplamente, sem, contudo, ser muito profundo. A abertura da concha é semilunar, com os bordos refletidos, não sendo guarnecida por lamelas ou dentes. Cor variando de castanho claro a marrom, com ou sem uma faixa de coloração marrom, que acompanha a sutura no seu limite superior e se estende na volta corporal até o bordo da abertura, sendo visível também pela face interna da concha, como pode ser observado na Figura 4. No espécime adulto, a concha mede aproximadamente 9 a 13 mm de altura e 13 a 18 mm de diâmetro (ARAÚJO, 1989; THOMÉ et al., 1996).

Figura 4: Conchas de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821).
Fonte: Sea Shell Hub, 2006.



60.21112008C06 -
H 9 mm x W 12 mm
Malaysia-selfcollected

seashellhub.com

4

Vários caracóis e lesmas têm distribuição mundial graças à atividade humana. O comércio de plantas e a importação de matrizes para criações são as principais rotas para a introdução de espécies exóticas. A espécie *B. similaris* é originária do sudeste da Ásia (região da China) e foi introduzida em várias regiões tropicais do mundo, inclusive no Brasil, através do comércio de plantas (PURCHON, 1968). Foi registrada no continente americano (LOURENÇO, 1960; HUBRICHT, 1963; OLIVEIRA et al., 1971; FULLINGTON, 1975; DUNDEE & CANCIENNE, 1978; JAUME et al., 1981; LEAHY, 1980, 1984) e nos continentes Europeu e Asiático (PILSBRY, 1926, 1934; GERMAN, 1929; YANAGIHARA, 1930; EMURA, 1932; HASS, 1935; KARAVAEVA, 1976).

Os moluscos constituem excelentes modelos para experimentação animal em estudos de fisiologia, comportamento, genética, ecologia, evolução e relação parasito/hospedeiro. Dentre os pulmonados terrestres, *B. similaris* é uma das espécies mais comuns no Brasil. Esse fato a torna ideal para estudos experimentais, pois apresenta manejo simplificado, alta taxa reprodutiva e grande adaptação a condições de laboratório.

Bradybaena similaris está amplamente distribuída em nosso território, sendo registrada em todos os Estados da União, desde a linha do Equador até aqueles situados nos limites da Região Sul, podendo ser citados os estados do Amapá, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (ARAÚJO, 1989). Sendo mais freqüentemente encontrada nos meses quentes e chuvosos do ano (MATTOS, 1987; AMATO & BEZERRA, 1989; GRAEFF-TEIXEIRA et al. 1993).

Bradybaena similaris foi utilizada como modelo experimental em diversos estudos de criação e manutenção sob condições de laboratório (LOUREIRO, 1960); biologia (OLIVEIRA et al., 1968); morfologia do sistema reprodutor (OLIVEIRA et al., 1971; LEAHY, 1984; PICORAL & THOMÉ, 1989); morfologia da concha, câmara palial, rádula, mandíbula e aparelho genital (ARAÚJO, 1989); morfo-anatomia (THOMÉ et al., 1996); densidade populacional x crescimento x reprodução (ALMEIDA & BESSA, 2000); fisiologia e bioquímica (HODASI, 1979, 1982; LEAHY, 1980; LIRA et al., 2000; COOK, 2001; FURTADO, 2002); levantamentos de pragas-agrícolas (SANTOS, 1982, 1994), entre outros.

A importância médico-veterinária de *B. similaris* se deve ao fato de participar de diversos ciclos de parasitos, como primeiro e, às vezes, único hospedeiro intermediário. Sendo utilizada em diferentes estudos experimentais envolvendo o desenvolvimento dos parasitos, rota de migração, aspectos bioquímicos, ecológicos, entre outros.

A infecção natural de *B. similaris* pelo digenético *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923, foi registrada pela primeira vez, em Honolulu, Hawaí por Alicata (1938). Este parasito quando adulto é encontrado nos cecos intestinais de aves domésticas, principalmente galinhas caipiras, *Gallus gallus* Linnaeus, 1758. Bezerra (1989) estudou sob condições experimentais aspectos do relacionamento de *B. similaris* como hospedeiro intermediário de *P. gallinum*.

Estudos sobre a influência da infecção por *E. coelomaticum* sobre consumo de oxigênio, reserva glicolítica, alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva de *B. similaris* foram realizados por Paschoal & Amato (1993; 1996). O desenvolvimento larval de *E. coelomaticum* em *B. similaris* foi estudado sob condições experimentais por Brandolini & Amato (2001) que detalharam a rota de migração dos estágios larvais intra-molusco. Estudos bioquímicos envolvendo espécimes de *B. similaris* infectados e não-infectados foram realizados por Azevedo et al. (1996); Pinheiro & Amato (1994); Pinheiro (1996); Souza et al. (2000).

Além dos registros de infecção por trematódeos digenéticos, *B. similaris* também atua como hospedeiro intermediário de nematóides. Em 1993, foi registrado por Graeff-Teixeira et

al. na região Sul do Brasil, a infecção natural de *B. similaris* por *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) *costaricensis* (Monera & Céspedes, 1971). Caldeira et al. (2007) registraram a infecção de *B. similaris* por *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) na região Sudeste do país.

2.6 Relacionamento Fisiológico entre Estágios Larvais de Trematódeos e o Molusco/Primeiro Hospedeiro Intermediário

Segundo Becker (1980), ao invadir o seu hospedeiro molusco, as larvas de trematódeos causam-lhe danos pela retirada de substâncias, as quais seriam utilizadas como nutrientes pelo molusco, causando-lhe um estado nutricional semelhante aquele gerado por um curto período de jejum severo. Além da retirada de substratos utilizados pelo molusco para a manutenção de seu metabolismo basal e para os processos de crescimento e reprodução, as larvas de trematódeos ainda eliminam, no organismo do molusco, os seus produtos de degradação e outros produtos que interferem no metabolismo normal do animal hospedeiro.

O estudo realizado por Paschoal & Amato (1993) com *B. similaris* infectada experimentalmente com *E. coelomaticum* revelou que não existe diferença significativa no consumo de oxigênio entre moluscos infectados e não-infectados e verificaram um menor acúmulo de glicogênio nas células da glândula digestiva dos moluscos infectados, quando comparados aos não-infectados. Enquanto que os esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* apresentaram reação que indicava presença de reservas glicolíticas.

Pinheiro & Amato (1994) observaram neste mesmo sistema, que alterações nos depósitos de glicogênio na glândula digestiva e da massa cefalopodal do molusco sofreram reduções de 99,14% e 96,70%, respectivamente, ao final do período pré-patente. Porém, esta redução foi menor em relação à concentração de glicose na hemolinfa do hospedeiro.

Pinheiro & Amato (1995) observaram que a oviposição de *B. similaris* infectada com *E. coelomaticum* foi reduzida em 96,32% e que com a evolução dos estágios larvais intramolusco, o conteúdo de DNA no complexo glândula de albúmen-ovotestis aumentava gradativamente, alcançando 700% ao final do período pré-patente. Já com relação ao conteúdo do RNA neste mesmo sítio, estes autores observaram redução de até 8,38%. Tais resultados demonstraram que a infecção provoca alterações no metabolismo de carboidratos do molusco, causando um estado de inanição, determinando um processo de castração nutricional, onde os processos de duplicação de material genético não sofrem influência, mas provocam alterações nos processos plásticos que envolvem a transcrição e a tradução da informação genética.

O jejum é uma condição fisiológica que se assemelha à infecção por trematódeos, que causam mudanças quantitativas e qualitativas nos níveis de proteína e carboidrato dos caracóis. Pinheiro (1996) observou que o jejum leva a uma redução semelhante àquela observada por Pinheiro & Amato (1994), nos depósitos de glicogênio e galactogênio de *B. similaris* infectada. Trinta dias de privação de alimento causaram uma porcentagem de redução equivalente a 140 dias de infecção por *E. coelomaticum*. Em resposta a essa redução dos níveis de carboidrato ocasionado pelo jejum, o caracol usa outros substratos para obtenção de energia para sua manutenção.

Lira et al. (2000) observaram uma alteração no conteúdo da proteína total na hemolinfa de *B. similaris* após um período curto de jejum, mostrando uma tendência significativa a decrescer. Tais resultados sugerem que em resposta ao jejum e ao decréscimo

nos depósitos de carboidratos, o molusco passa a metabolizar/degradar mais intensamente aminoácidos e proteínas.

Souza et al. (2000) analisaram o conteúdo de uréia e ácido úrico na hemolinfa de *B. similaris* em função da inanição e da infecção com *E. coelomaticum* ao longo de 30 dias e observaram que a concentração de uréia nos moluscos era de 15.090mg/dl para os não-infectados e de 9.399mg/dl para os alimentados, sendo a relação de uréia/ácido úrico 1.6. A concentração de uréia nos moluscos em de inanição aumentou até 363.237mg/dl, aos 15 dias de inanição e o conteúdo do ácido úrico variou até 11.761mg/dl, aos 10 dias de jejum. A concentração de uréia nos infectados foi reduzida até 2.123mg/dl, aos 30 dias de infecção, e o conteúdo de ácido úrico aumentou significativamente aos 25 dias de infecção, sendo 13.820mg/dl. O que vem corroborar os resultados de Lira et al. (2000), evidenciando a geração de elevadas quantidades de produtos nitrogenados de degradação em virtude da imensa utilização de aminoácidos e proteínas pelos moluscos em jejum.

Por se tratarem de bons indicadores de lesões de tecido, a atividade das aminotransferases (transaminases) foi estudada por alguns autores: na hemolinfa de moluscos infectados com larvas de trematódeos (MANOHAR et al., 1972), em tecidos infectados por trematódeos (CHRISTIE & MICHELSON, 1975) e em caracóis não-infectados (NABIH et al., 1990). A atividade destas enzimas também foi estudada em caracóis sob jejum (EL-EMAM & EBEID, 1989). A atividade de aminotransferases nos caracóis sob jejum pode ser alterada. Um estudo, sobre a atividade das aminotransferases (AST e ALT) na hemolinfa de *B. similaris* sob condições experimentais de jejum severo, de Pinheiro et al. (2004), revelou que ao 10º dia de jejum, atividade da AST foi 416,6% mais alta que a observada em caracóis alimentados e a atividade da ALT só variou significativamente aos 30 dias de jejum. Tais dados indicam haver a lesão celular em moluscos em jejum, determinando a elevação da atividade da AST na hemolinfa destes animais.

Moreira et al. (2003) ao analisarem os efeitos de diferentes períodos de jejum nos depósitos de cálcio na hemolinfa e na concha de *B. similaris* verificaram que após trinta dias de jejum, o conteúdo de cálcio na hemolinfa do caracol reduziu em 84%, enquanto que o conteúdo de cálcio na concha reduziu em 25%.

Outros estudos realizados recentemente, apesar de não considerarem a mesma interface parasito/hospedeiro do presente trabalho, também contribuem para elucidar as questões a que vem sendo direcionadas as pesquisas atuais quanto à relação trematódeo x molusco.

No estudo sobre o comportamento de amebócitos de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) infectadas por *S. mansoni*, por outros Digenea e a resistência à superinfecção, presente em infecções mistas, Balan et al. (1993) verificaram nos exames histopatológicos que nas superinfecções ocorre total degeneração dos esporocistos primários de *S. mansoni*, tendo os esporocistos de todas as outras espécies de digenéticos permanecido íntegros. Os testes com hemolinfa revelaram que nos exemplares não infectados, o valor protéico foi maior que nos exemplares infectados por *S. mansoni*. Quando se comparou com moluscos capturados no campo, os moluscos nascidos e mantidos em laboratório apresentaram valores maiores de proteína na hemolinfa. Também se verificou “in vitro” que a atividade fagocítica aumenta em grupos infectados. Pelo perfil eletroforético obtido da hemolinfa dos moluscos infectados pelos diferentes trematódeos, foram encontradas alterações que mostram características específicas de cada diferente tipo de infecção. As imunodifusões e imunoeletroforeses permitiram afirmar que há diferenças qualitativas e quantitativas na hemolinfa de *B. tenagophila* do campo, parasitadas quando comparadas com a hemolinfa de moluscos do grupo controle, livres de infecção.

Ao testar a suscetibilidade de *B. glabrata* à infecção com o trematódeo digenético *E. paraensei*, DeGaffé & Loker (1998), correlacionando-a com a habilidade de produtos de excreção e secreção derivados dos esporocistos deste parasito interferirem no comportamento de propagação de hemócitos do hospedeiro, concluíram que o número de hemócitos disponível para um determinado molusco recebe influência quanto a sua vulnerabilidade à infecção com o parasito.

Otranto e Traversa (2003) num estudo sobre microcoeliose registraram que os relatórios sobre a parasitose estão aumentando, especialmente devido à expansão de habitats secos desertificados e o aumento da resistência a anti-helmínticos, discutindo as mais recentes investigações sobre sua diagnose e controle, assim como a viabilidade de estratégias de administração ambientalmente amistosas.

Um estudo desenvolvido por Walker (2006) sobre o regulamento molecular da resposta do sistema de defesa do molusco fornece uma nova corrente para estudos que enfocam uma extensão do conceito original – alterações nas vias de sinalização celular do hospedeiro através da ação de trematódeos. A hipótese é de que, para facilitar a sua sobrevivência e replicação no hospedeiro intermediário, os trematódeos parasitos “downregulate” as respostas de defesa do hospedeiro, interferindo com vias de transdução de sinal chave nas células de defesa do molusco.

Massa et al. (2007) utilizaram análises de cromatografia líquida de alta eficiência para determinar os efeitos de uma infecção patente por *S. mansoni* nos ácidos carboxílicos do complexo glândula digestiva-gônada e hemolinfa de *B. glabrata*, e concluíram que a infecção pelo parasito causa uma redução significativa nas concentrações de ácidos acético, fumárico, málico e ácido pirúvico do complexo glândula digestiva-gônada, mas não na hemolinfa dos moluscos quando comparados a moluscos não infectados. Essa redução sugere que estes ácidos sejam utilizados pelos esporocistos e cercárias em desenvolvimento no molusco ou que a infecção estimule a redução da produção ou aumento na utilização pelo tecido do molusco.

Um estudo onde *B. glabrata* foi exposta concomitantemente aos trematódeos, *S. mansoni* e *E. caproni*, revelou que a co-exposição não só influencia o estabelecimento (presença ou ausência) de determinadas espécies de parasitos, mas também causa impactos à história de vida do hospedeiro, reprodução do parasito e interação de virulência (SANDLAND et al., 2007).

Muñoz-Antoli et al. (2007) estudaram o efeito experimental da infecção por *Echinostoma friedi* (Toledo et al. 2000) na longevidade, crescimento e fecundidade de moluscos juvenis das espécies *Radix peregra* (Müller, 1774 - *Lymnaea peregra sensu* Toledo et al. 2000) e *B. glabrata*, constatando que em moluscos infectados *R. peregra* a morte começa mais cedo, mas numa extensão prolongada, enquanto que *B. glabrata* tem um tempo de vida mais curto. A infecção e exposição por miracídios pode retardar o desenvolvimento normal de *R. peregra*, enquanto que *B. glabrata* pode ter o crescimento excessivo (gigantismo) quando comparado ao grupo controle. Além disso, o parasito causa uma castração parasitária total nos dois moluscos infectados.

No trabalho de Lefèvre et al. (2008), os autores propõem quanto às alterações de comportamento do hospedeiro induzidas pelos parasitos, de que certos parasitos afetam características relacionadas ao desempenho de seus hospedeiros, com o objetivo de ativar nestes, respostas compensatórias, uma vez que elas possam contribuir para transmissão do parasito. Assim, segundo Poulin (2007), muitos parasitos reduzem totalmente ou parcialmente a fecundidade do hospedeiro, por drenagem da energia do hospedeiro, reprodução e para o seu próprio crescimento. E uma freqüente consequência da redução da fecundidade é o

gigantismo do hospedeiro, especialmente em moluscos que atuam como os primeiros hospedeiros intermediários de trematódeos (MINCHELLA, 1985).

No intuito de melhor compreender a imunidade de *B. glabarta* e a compatibilidade na relação hospedeiro-parasito, com *S. mansoni*, foram estudadas as respostas anti-patogênicas do molusco através de ORESTES (Open reading frames EST sequences). A comparação dos processos biológicos com diferentes transcriptomas indicou que o molusco aumenta o transporte de oxigênio e ligação de metal em reação a todos os desafios e que as respostas do molusco frente a bactérias *Escherichia coli* (Escherich, 1885) e *Micrococcus luteus* (Schroeter, 1872) Cohn, 1872 (Approved Lists 1980) emend. Wieser et al. 2002) eram semelhantes e diferiam das respostas para *S. mansoni*, que era menos inclusiva e ineficaz que para bactérias (HANELT et al. 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Tendo em vista atingir os objetivos propostos foi empregada a metodologia descrita a seguir.

3.1 Estabelecimento da Colônia e Manutenção de *Bradybaena similaris* em Laboratório

Espécimes jovens e adultos de *B. similaris* foram coletados, manualmente, em jardins e hortas nas circunvizinhanças do Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), RJ, Brasil (Latitude -22°44'28", Longitude 43°42'27", Altitude 23m), acondicionados em recipientes plásticos e transferidos para o Laboratório de Biologia e Ecologia de Helmintos, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, da mesma Instituição.

No laboratório, os moluscos foram mantidos em terrários plásticos que mediam 20x30x10cm e forrados com uma camada de terra de aproximadamente 2cm de altura, previamente esterilizada em estufa a 100°C por 2 horas, sendo mantida a umidade necessária para sua sobrevivência através de borrifações durante a manutenção dos terrários que foram fechados por um tecido de malha fina para evitar a entrada de insetos e a saída dos moluscos (Figura 5).

Os moluscos foram alimentados com folhas frescas de alface (*Lactuca sativa*) e pepino (*Cucumis sativus*), ambos *ad libitum*, os quais eram previamente imersos em uma solução de ácido acético 0,05%. A manutenção e observação dos terrários foram feitas periodicamente até a realização das dissecações.

Grupos com, aproximadamente, 30 moluscos foram distribuídos e mantidos em 10 desses terrários.

Uma amostra de 30 moluscos coletados foi dissecada para verificação de infecções prévias. Verificando-se a ausência de infecções naturais nos diferentes locais de coleta, os demais moluscos poderiam ser utilizados para a realização do presente estudo.

A manutenção foi realizada em dias alternados e periodicamente, a terra era revolvida e examinada, na presença de postura, os ovos eram transferidos para outro terrário.

Figura 5: Terrário para manutenção de espécimes de *Bradybaena similaris* no Laboratório de Biologia e Ecologia de Helminhos, da UFRRJ.



5

3.2 Obtenção dos Ovos de *Eurytrema coelomaticum*

As formas adultas do parasito foram coletadas do pâncreas de bovinos naturalmente infectados com *E. coelomaticum* e abatidos no Frigorífico Irapuru Indústria e Comércio de Carnes Ltda (Barra Mansa, RJ, Brasil), originários de diferentes municípios do Estado, como Passa Três, Itaguaí, Seropédica, Resende e do próprio município de Barra Mansa.

Os pâncreas infectados foram transferidos para recipientes plásticos e levados, sob refrigeração, até o laboratório nas dependências da UFRRJ, onde a coleta dos helmintos presentes nos ductos pancreáticos foi processada utilizando tesoura de ponta fina, estilete e pincel nº2 (Figura 6).

Os espécimes de *E. coelomaticum* eram transferidos para placa de Petri, contendo solução salina fisiológica de NaCl a 0,85% ou solução balanceada de Locke (HUMASON, 1972), onde permaneciam por 24 horas, à temperatura ambiente, para eliminação dos ovos. Posteriormente, o conteúdo líquido de cada placa, assim como os helmintos, foi passado por uma peneira colocada sobre cálice de sedimentação. Sobre o material da peneira, foi derramada água destilada para que todos os ovos eliminados e os que estivessem aderidos ao tegumento do parasito, passassem para o interior do cálice. Os helmintos foram retirados destas peneiras e processados segundo AMATO (1985). O cálice de sedimentação permaneceu em repouso por 2 horas. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e o sedimento transferido para pequenos recipientes. Os ovos foram lavados três vezes em solução de Locke e reservados para utilização sob refrigeração.

3.3 Obtenção dos Miracídios de *Eurytrema coelomaticum*

Os miracídios de *E. coelomaticum* não eclodem no ambiente externo, uma vez que a infecção do molusco hospedeiro é passiva, os ovos são ingeridos pelo molusco e, através do movimento de raspagem realizado pela rádula, sofrem um processo abrasivo e abrindo-se, na região do opérculo, permitindo a eclosão do miracídio. Desta forma, para proporcionar a observação do miracídio fora do ovo, seguiu-se a técnica descrita por Tang (1950). Os ovos foram colocados entre lâmina e lamínula, efetuando-se uma leve pressão sobre esta última. Com a aplicação desta pressão, o ovo se rompe, não pela região opercular, mas permite a saída do miracídio e visualização de suas estruturas.

3.3.1 Impregnação dos miracídios com nitrato de prata (AgNO_3)

Esta etapa foi realizada para observação da estrutura das placas ciliadas, sua organização e arranjo no corpo do miracídio, assim como estruturas sensoriais argentofílicas, tais como papilas, dos miracídios de *E. coelomaticum* utilizando a técnica de impregnação com nitrato de prata (AgNO_3), segundo Amato et al. (1991).

Os ovos foram colocados entre lâmina e lamínula contendo água destilada e pressionados. Uma solução aquosa de AgNO_3 0,5% foi aquecida a 60° C em vidro de relógio e uma gota desta solução foi adicionada ao material da lâmina. O material foi exposto a luz de uma lâmpada de 100 W, por dez minutos para a redução da prata e lavado três vezes em água destilada, utilizando cinco minutos em cada lavagem.

As lavagens do conteúdo da lâmina eram feitas, por capilaridade, através do gotejamento de água destilada em um dos lados da lamínula e puxando a água com um papel filtro encostado no outro lado da lamínula.

Posteriormente, foi feita a lutagem da lamínula com esmalte incolor e o material foi observado em microscópio de luz campo claro, usando objetiva de imersão (100x).

3.4 Infecção Experimental de *Bradybaena similis* com Ovos de *Eurytrema coelomaticum*

Para a realização das infecções experimentais, os moluscos foram, primeiramente, medidos (diâmetro da concha) com auxílio de paquímetro, sendo considerados para o estudo aqueles com a medida da concha de 6 a 14mm (Figura 7). Inicialmente, os moluscos foram divididos em 4 classes de tamanho, considerando a variação do diâmetro da concha: Classe C (3 a 5,9mm), Classe B (6 a 9,9mm), Classe A (10 a 13,9mm) e Classe D (14 a 16,9mm). Posteriormente, foram colocados agrupados em placa de Petri, com 10cm de diâmetro e 2cm de altura, que continham pedaços de folha de alface pipetados com ovos de *E. coelomaticum*, aproximadamente 10 ovos/molusco. As placas foram tampadas e os moluscos foram mantidos em contato com os ovos “overnight”. Após esse período, os moluscos foram transferidos para os terrários onde se dava continuidade à manutenção (alimentação, manutenção da umidade, higienização do terrário com retirada dos moluscos mortos, verificação e transferência de ovipostura) e às observações até a coleta da hemolinfa e dissecação. O material residual das dissecações era descartado, seguindo normas de rotina, sendo portanto fixado em etanol 70° GL e encaminhado para incineração. A princípio, estabeleceu-se que as dissecações seriam realizadas aos 0, 30, 60 e 90 dias após a exposição aos ovos do parasito com a finalidade de observação dos diferentes estágios larvais intramolusco, porém devido à mortalidade ocorrida, especialmente nas Classes A e D, as dissecações dos moluscos ocorreram nos períodos de 0, 30, 60, 82, 100 dias após a infecção. Isso levou à desconsideração da divisão em Classes no decorrer do experimento, optando-se por priorizar o tempo de infecção/número de moluscos garantindo, assim, a terminalidade do desenvolvimento larval intramolusco.

A caracterização morfológica dos esporocistos de primeira geração foi baseada em larvas obtidas através da dissecação dos moluscos 30 dias após a exposição aos ovos de *E. coelomaticum*. Já a caracterização dos esporocistos de segunda geração foi baseada em larvas divididas em dois grupos: (I) composto por esporocistos de segunda geração em desenvolvimento em *B. similis*, experimentalmente infectados e dissecados com 82 a 100 dias de infecção, e outro grupo (II) composto por larvas expelidas espontaneamente pelos caramujos infectados, *B. similis*, de 79 a 120 dias após a exposição aos ovos *E. coelomaticum*.

As cercárias foram divididas em dois grupos: (I) composto por cercárias obtidas de esporocistos de segunda geração retirados de moluscos dissecados aos 82 aos 100 dias de infecção, e outro grupo (II) composto por cercárias obtidas de esporocistos expelidos dos 79 aos 120 dias pós-exposição aos ovos de *E. coelomaticum* pelos moluscos *B. similis* infectados.

3.5 Eliminação dos Esporocistos de *Eurytrema coelomaticum*

Vinte moluscos experimentalmente infectados, divididos em dois grupos, foram mantidos em placas de Petri a partir do 82° dia de infecção para facilitar a observação dos esporocistos de segunda geração após serem eliminados. Estes foram recolhidos das placas utilizando-se pincel fino nº2 e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a 4° C até serem processados para análise morfológica.

Figura 6: Esquema demonstrativo da obtenção dos ovos de *Eurytrema coelomaticum*.

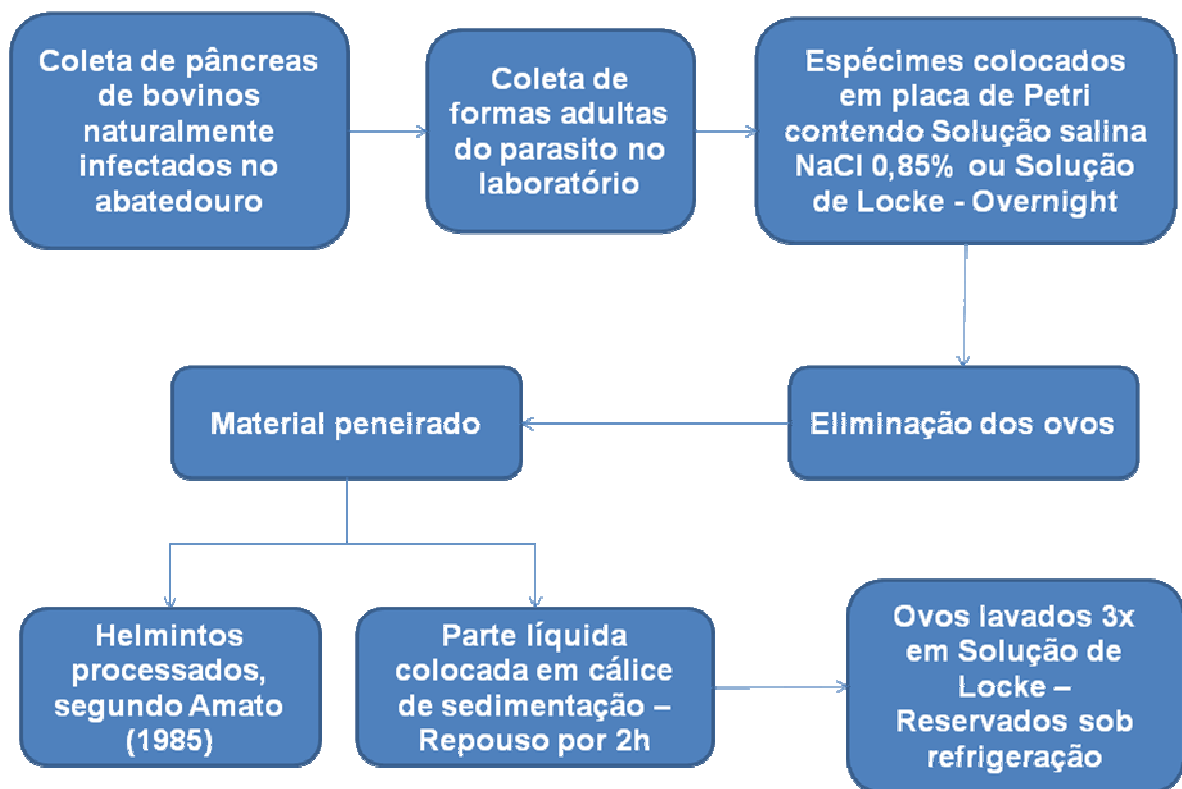
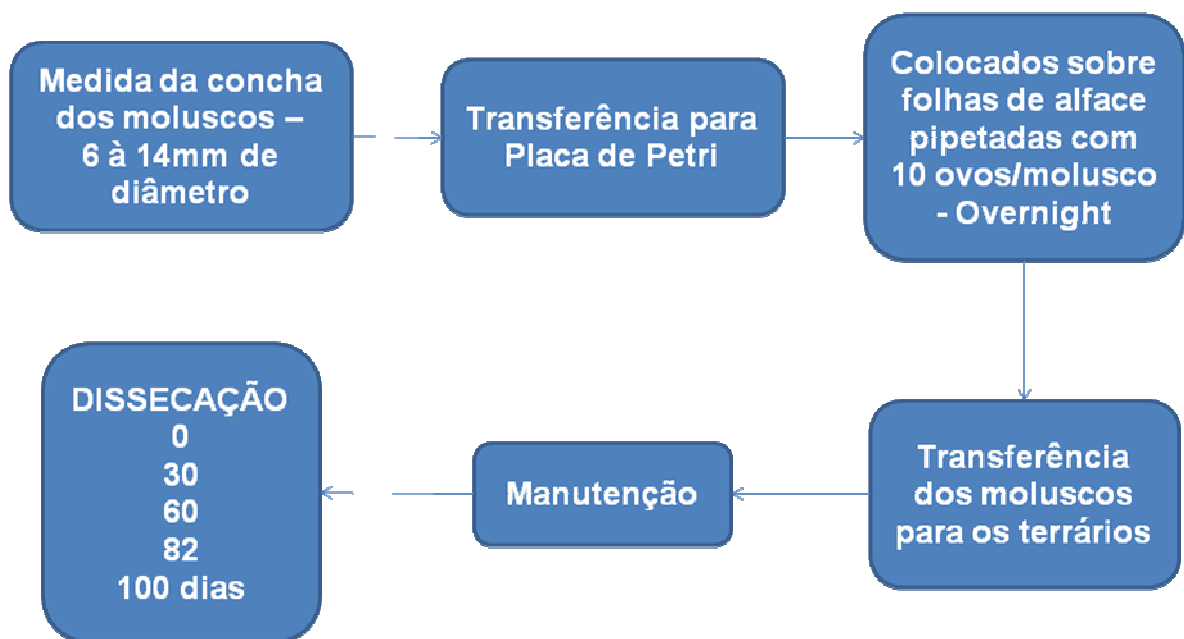


Figura 7: Esquema demonstrativo da infecção experimental de *Bradybaena similaris* com ovos de *Eurytrema coelomaticum* e período de dissecação.



7

3.6 Morfologia e Ultraestrutura dos Ovos e Estágios Larvais de *Eurytrema coelomaticum*

3.6.1 Microscopia de luz

Esta etapa foi realizada para observação da morfologia dos ovos, miracídios, esporocistos e das cercárias.

Para o estudo através da microscopia de luz (ML), o material obtido de dissecações dos vermes adultos (ovos) e aqueles dos moluscos infectados (esporocistos e cercárias) foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato ($C_2H_6AsO_2Na$) 0,1 M, pH 7,4, a 4° C, por 24 horas, corados pela Hematoxilina de Delafield (Humanson, 1972) e montados em lâminas de vidro com Bálsamo do Canadá (Figura 8). Estas lâminas foram observadas ao microscópio e as larvas medidas usando câmera Olympus BX5, utilizando ML de campo claro e DIC (contraste interferencial diferencial) para observação de sua morfologia geral, as imagens foram obtidas com câmera Olympus DP12.

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

Ovos embrionados de *E. coelomaticum* foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato ($C_2H_6AsO_2Na$) 0,1 M, pH 7,4, a 4° C, por 24 horas (Figura 9). Após a fixação, foram lavados no mesmo tampão por três vezes, durante 15 minutos cada lavagem, e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% por 40 minutos, no escuro. A seguir, os ovos eram lavados, novamente, por três vezes, durante 15 minutos cada lavagem no mesmo tampão e seguindo-se a desidratação em série etanólica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 3 x 100%), utilizando 15 minutos para cada concentração de álcool etílico. Após a desidratação, o material foi secado em câmara de ponto crítico CPD BALTEC, utilizando CO_2 (Baltec CPD). Os ovos secos foram montados em suportes metálicos, previamente revestidos com fita dupla face de carbono e cobertos com ouro (PINHEIRO et al., 2004a), aplicando-se uma camada de, aproximadamente, 14 nm.

Os ovos foram observados utilizando um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 5310, a 20 kV e as imagens digitalizadas através do programa SemAfore.

Os esporocistos e as cercárias foram processados e observados da mesma forma que os ovos.

3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Os ovos foram fixados do mesmo modo empregado para MEV e lavados três vezes no mesmo tampão de diluição do fixador e pós-fixados em OsO_4 1% e $K_4Fe(CN)_6$ 0,8%, por 40 minutos, a temperatura ambiente, no escuro, seguindo-se a desidratação, empregando-se em série cetônica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 3 x 100%), utilizando quinze minutos em cada concentração de acetona (Figura 10).

Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina epóxi Polybed-812 em proporções crescentes de resina, mantidos por 24 horas em cada diluição acetona:Epon (5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5). Após esta etapa, os ovos foram mantidos em resina pura, sendo feitas três trocas de resina a cada 24 horas. Os ovos foram transferidos para uma forma contendo resina pura e deixados polimerizar de forma convencional em estufa, a 60° C, por 48 horas. Os blocos obtidos foram trimados manualmente e as secções ultrafinas, com 60 nm de espessura, feitas em ultramicrotomo RMC. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de 300 malhas e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila [$(UO_2CH_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$] 2,5% por 40 minutos, no escuro, sendo, em seguida, lavados três vezes em água destilada, utilizando dez minutos em cada lavagem e transferidos para uma solução

aquosa de citrato de chumbo $[\text{Pb}(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7)_2]$ por cinco minutos e, após este tempo, lavados três vezes em água destilada, utilizando, dez minutos em cada lavagem (PINHEIRO, 2004b).

Os cortes foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900, usando 80 kV. As imagens foram obtidas usando o software iTEM.

Os esporocistos e as cercárias foram processados e observados da mesma maneira que OS OVOS.

Figura 8: Microscopia de luz dos ovos e estágios larvais de *Eurytrema coelomaticum*.

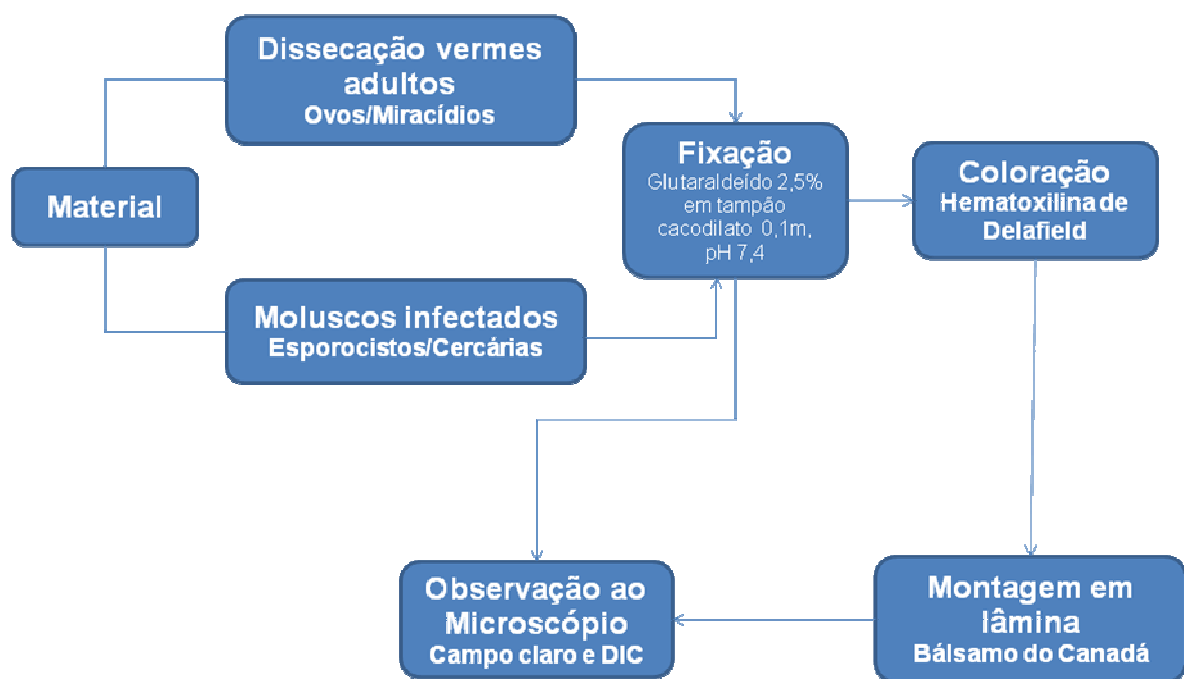


Figura 9: Protocolo de processamento dos ovos e larvas de *Eurytrema coelomaticum* para microscopia eletrônica de varredura, segundo Pinheiro et al. (2004a).

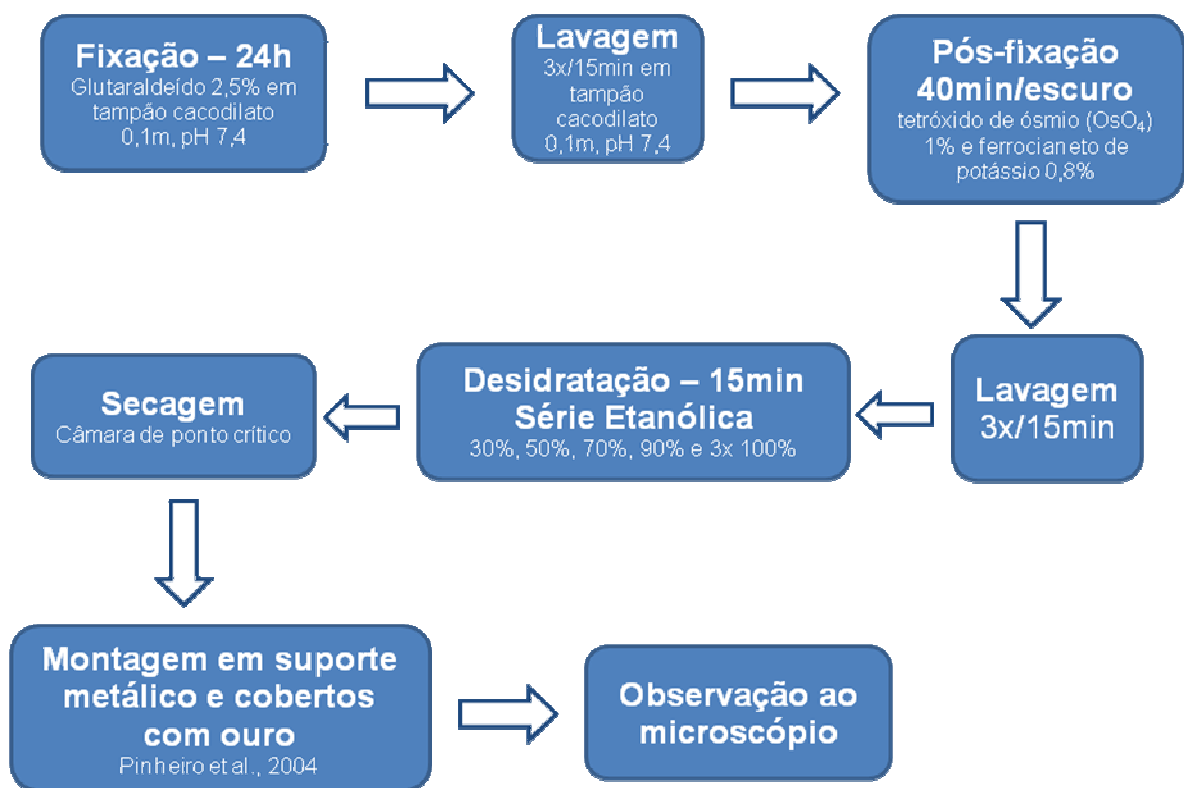
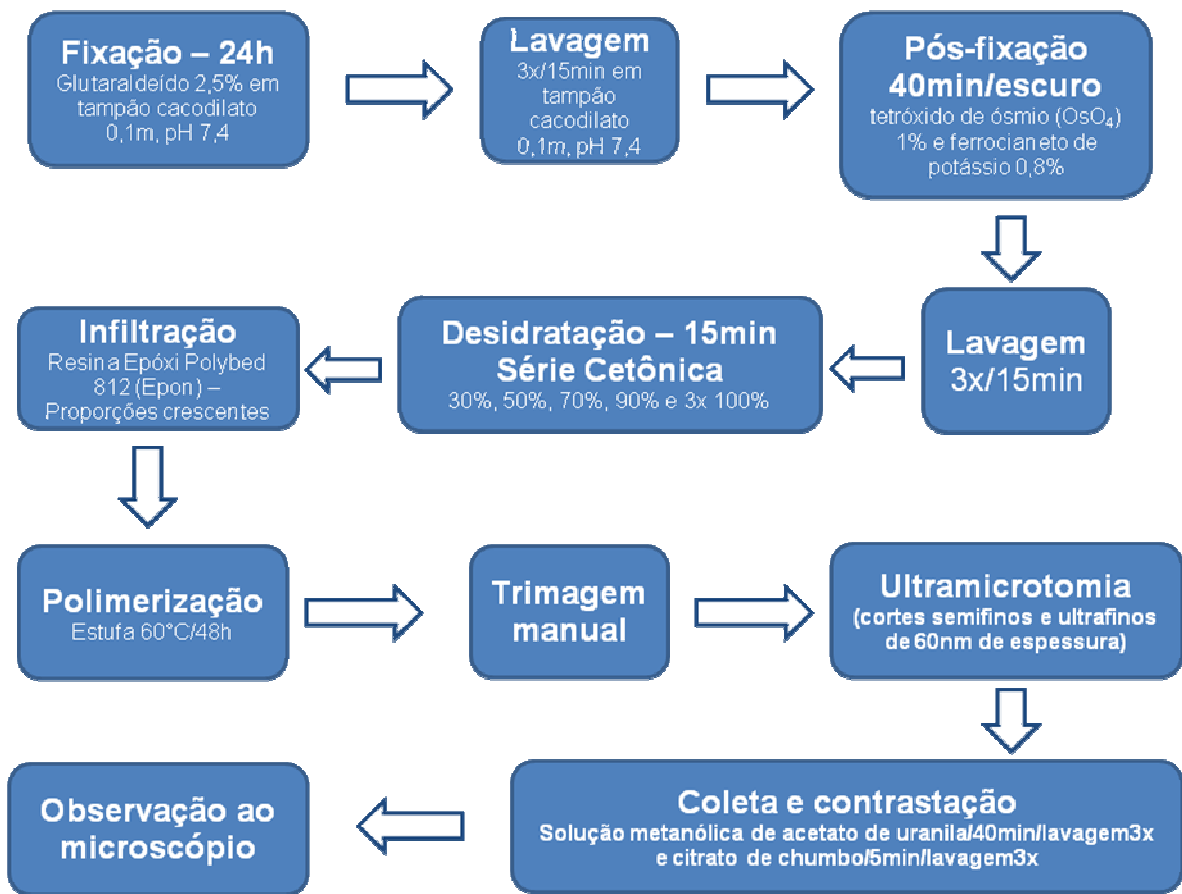


Figura 10: Protocolo de processamento de ovos e larvas de *Eurytrema coelomaticum* até a observação ao microscópio eletrônico de transmissão, segundo Pinheiro et al. (2004b).



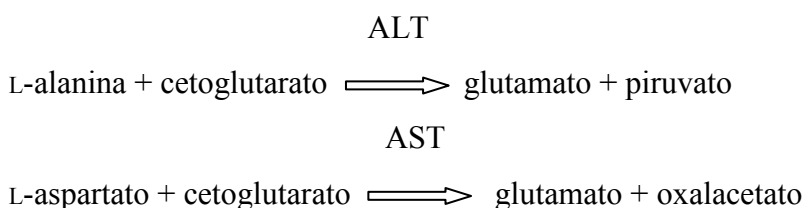
3.7 Análises Bioquímicas

Para o estudo bioquímico, a hemolinfa dos moluscos infectados e não-infectados foi coletada por punção da cavidade pericárdica, sob estereomicroscópio, usando-se capilar e foi mantida sob refrigeração até a sua utilização.

A atividade das aminotransferases, AST, ALT e γ GT, na hemolinfa do molusco infectado foi determinada pelo método de Reitman & Frankel (1957), empregando-se Kit Doles, seguindo o princípio:

i) ALT e AST

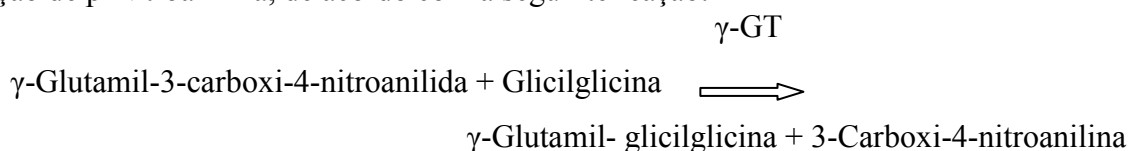
As aminotransferases são enzimas que catalisam a transferência de grupamentos amina e alfa aminoácidos para alfa acetoácidos:



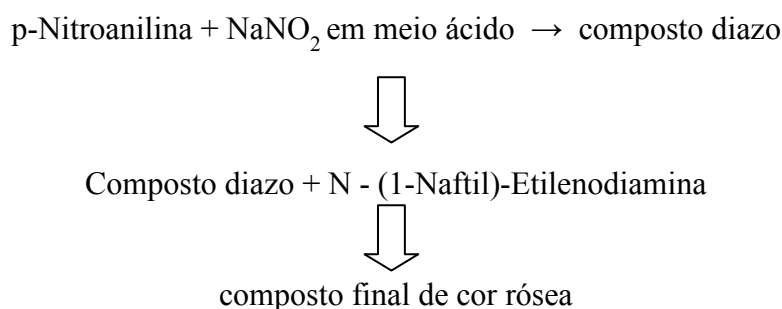
O piruvato e o oxalacetato formados são proporcionais à atividade enzimática e medidos através de suas hidrazonas, intensamente coradas, em meio alcalino.

ii) γ GT

A γ -Glutamyltransferase (γ GT) é uma enzima que catalisa a transferência do grupo Glutamil, da γ -Glutamyl-p-Nitroanilida (substrato), para a Glicilglicina (receptor), com liberação de p-Nitroanilina, de acordo com a seguinte reação:



A p-Nitroanilina liberada é diazotada através da reação de Bratton-Marshall modificada:



A absorvância do composto final é medida em 530nm ou filtro verde.

A hemolinfa coletada e congelada também foi utilizada para determinação do conteúdo de proteínas totais e amônia, após ser misturada e homogeneizada, a dosagem das proteínas totais e amônia foi realizada através do reagente de Folin-Ciocalteau para proteínas segundo Lowry et al. (1951) *in* Villela et al. (1997) e expressa em mg%, que se baseia na redução do cobre em meio alcalino. As leituras foram feitas usando um espectrofotômetro Micronal em 700 nm de comprimento de onda, com um branco de reação onde a amostra foi substituída por água destilada, os valores de concentração de proteínas totais foram determinados através da Lei de Lambert-Beer, a partir das absorvâncias obtidas, utilizando-se uma solução-padrão de BSA 40 mg/dl.

Para a determinação do conteúdo de amônia na hemolinfa, foi utilizado método colorimétrico de Mitchel (1972) e Felker (1977), onde a amônia é quantificada como íons NH_4^+ . A determinação colorimétrica foi feita em espectrofotômetro Micronal, usando comprimento de onda de 630 nm, tendo como branco de reação um tubo onde a amostra foi substituída por água deionizada e uma curva de solução-padrão de cloreto de amônio (NH_4Cl) com valores de 0 a 1000 nmoles de NH_4^+ /ml foi construída para a determinação dos valores observados nas amostras.

Todas as leituras espectrofotométricas foram feitas com, pelo menos, três repetições.

3.8 Análises Estatísticas

Os valores das determinações bioquímicas para os diferentes períodos de infecção foram expressos pela média e desvio padrão e analisados através do teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias. A relação entre o conteúdo de produtos nitrogenados e a atividade das aminotransferases e γ -glutamiltansdase nos moluscos infectados e do grupo controle e o tempo de infecção foi determinada pela análise de regressão polinomial de primeira ordem para verificar a significância da relação entre as alterações observadas e o tempo de infecção com *E. coelomaticum*.

Para estas análises foram utilizados os programas GraphPad Prism™, versão 1.00, GraphPad Software Incorporated e GraphPad InStat™, versão 2.05a, GraphPad Software Inc.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfometria e Ultraestrutura dos Ovos e Estágios Larvais de *Eurytrema coelomaticum*

4.1.1 Ovos

Quando observados ao microscópio de luz (ML), os ovos embrionados e não embrionados de *E. coelomaticum* apresentam-se distintos. Os ovos embrionados ou maduros apresentavam formato alongado, coloração marrom escura (castanha) e continham em seu interior o miracídio totalmente desenvolvido (Figura 11a, b). Já os ovos não embrionados ou imaturos apresentavam coloração amarelo clara e, em seu interior, o embrião ainda em processo de formação (Figura 11c, d). Também pode ser observado o opérculo (Figura 11c, d) que pode ser destacado sob uma leve pressão sobre a lamínula (Figura 11e, f).

Segundo Soulsby (1987), após a fecundação, os ovos são envoltos pelos precursores da casca e durante seu deslocamento pelo útero, ocorre o desenvolvimento do embrião e a elaboração da casca, com liberação dos ovos através do poro genital. Dependendo do ambiente em que o ciclo aconteça, o ovo quando liberado contém o miracídio totalmente formado ou não. Sendo a infecção do molusco, ativa ou passiva e os fatores determinantes da eclosão do miracídio, de origem ambiental ou do hospedeiro, respectivamente. Os ovos do *E. coelomaticum* contêm o miracídio totalmente formado e são ingeridos pelo molusco, caracterizando a infecção passiva, com a eclosão ocorrendo no interior do trato digestivo do molusco. A observação dos ovos ao ML com a luz polarizada demonstrou a diferença de refração entre os ovos maduros e imaturos (Figura 12a-d). Tal diferença pode estar relacionada ao processo de tanificação de proteínas presentes na casca dos ovos, que ocorre no interior do útero do verme adulto e que caracteriza a maturação dos ovos.

Quando observados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram registrados os ovos agrupados (Figura 13a) e os ovos isolados, onde a casca do ovo apresentou uma superfície sem especializações evidentes, sendo esta quase lisa. O opérculo se apresentava arredondado, na região anterior do ovo, com uma topografia bem demarcada (Figura 13b, c). O limite entre o opérculo e as demais regiões da casca do ovo também ficou bastante evidente ao MEV.

Os ovos foram medidos apresentando comprimento médio igual a $44,97 \pm 3,83$ (38,67 - 51,40) μm e largura média igual a $30,71 \pm 2,54$ (25,79 - 34,47) μm . Tais medidas se aproximam mais das registradas por Travassos (1944), onde *E. coelomaticum* apresentava ovos com comprimento e largura de 42 - 50 μm por 23 - 30 μm , respectivamente. Tais medidas são menos semelhantes às registradas por Tang (1950), que observou medidas de comprimento e largura de 41 - 55 μm por 28 - 38 μm , respectivamente, para os ovos de *E. pancreaticum*, sendo maiores do que as de *E. coelomaticum* (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação das medidas dos ovos de *Eurytrema coelomaticum* e *Eurytrema pancreaticum*. Média \pm desvio padrão; (amplitude de variação).

Medidas (μm)	Estudo atual <i>E. coelomaticum</i>	Travassos (1944) <i>E. coelomaticum</i>	Tang (1950) <i>E. pancreaticum</i>
Comprimento	44,97 \pm 3,83 (38,67 - 51,40)	42 - 50	41 - 55
Largura	30,71 \pm 2,54 (25,79 - 34,47)	23 - 30	28 - 38

Diante da tão controvertida nomenclatura destes trematódeos, a diferença nas dimensões dos ovos, pode constituir um parâmetro para corroborar a separação de *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum* como espécies diferentes. Estando de acordo com o que foi apontado por Zheng et al. (2007) através de estudos moleculares.

A observação de cortes ultrafinos dos ovos de *E. coelomaticum* ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), evidenciou a sua casca e restos de um miracídio em degeneração no seu interior (Figura 13d). A casca deste ovo é bastante espessa, medindo $3,70 \pm 0,56\mu\text{m}$ (3,3 - 4,1) de espessura nas extremidades (pólos) e $2,32 \pm 0,43\mu\text{m}$ (1,8 - 2,8) de espessura nas laterais. Sendo possível distinguir três diferentes camadas: as camadas interna e externa mais eletrondensas e finas e a camada intermediária menos eletrondensa e constituindo praticamente todo o material que compõe a casca do ovo (Figura 13e).

A euritrematose bovina causa, principalmente, danos pancreáticos aos animais infectados, o que lhe confere importância veterinária. Dessa forma, o estudo ou a descrição da morfologia e ultraestrutura dos ovos das espécies de trematódeos envolvidas (*Eurytrema* spp.) torna-se mais um instrumento para a identificação do parasito e conseqüente o tratamento com medidas de controle para evitar a doença.

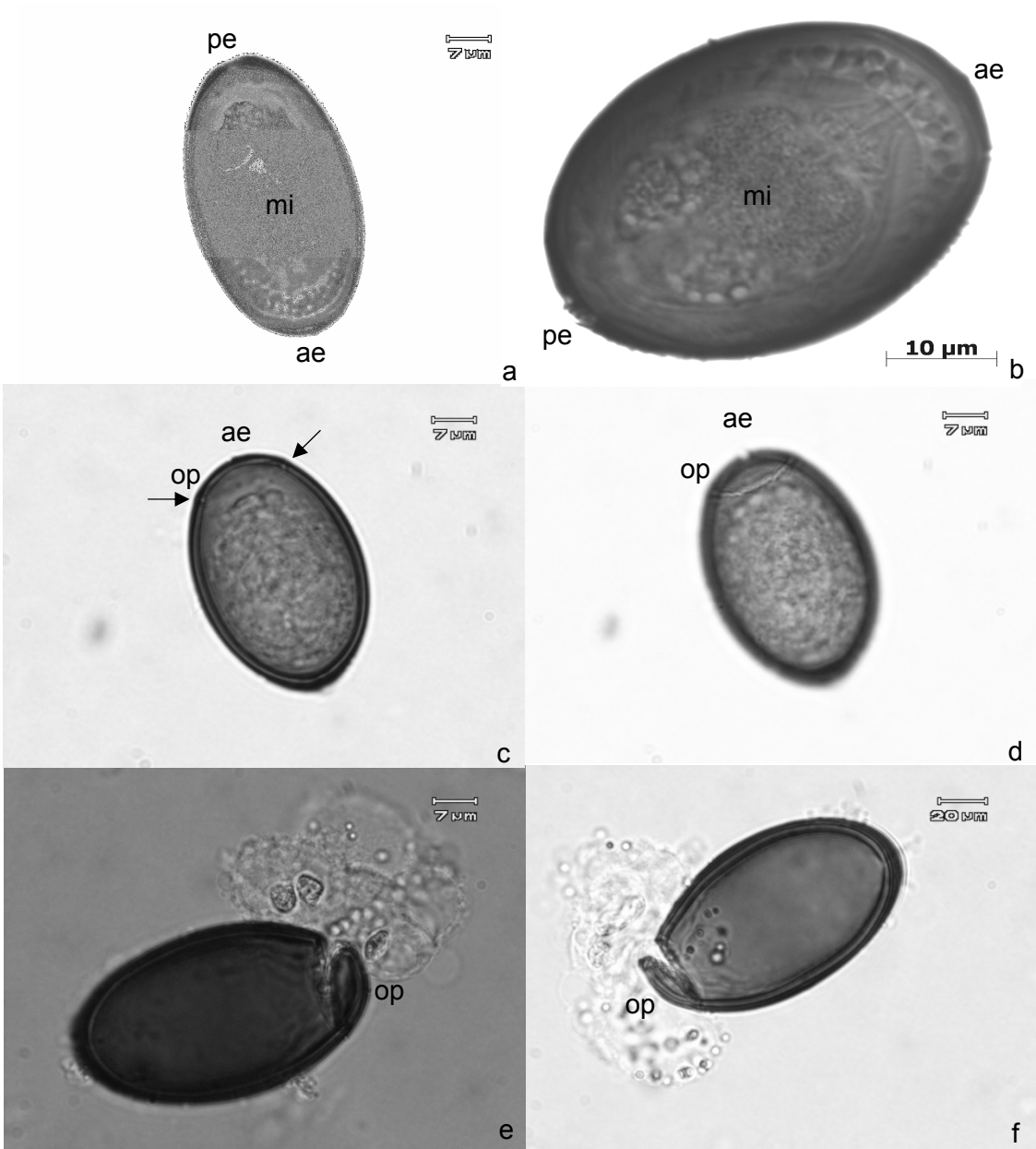
Em estudo sobre mortalidade de gado bovino parasitado por *E. coelomaticum* no Estado do Paraná, Ilha et al. (2005), relataram terem observado ovos refringentes acastanhados de *Eurytrema* sp. aderidos em áreas de fibrose no pâncreas dos bovinos desencadeando uma reação inflamatória que variou de ausente a severa, sendo caracterizada como reação granulomatosa composta por linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas envolvendo ovos do trematódeo (operculados ovais com casca grossa marrom refringentes).

Headlley et al. (2009) relataram que infiltrados inflamatórias associadas ao mesmo parasito induziram lesões pancreáticas predominantemente eosinofílicas e em alguns casos, as reações granulomatosas no parênquima pancreático foram observadas quando os ovos haviam sido fagocitados por células gigantes. Resultados semelhantes foram descritos anteriormente por Belém et al. (1994) e Yamamura et al. (1995).

Todos esses dados demonstram a importância da parasitose no que tange a produção pecuária uma vez que estudos registraram que a destruição do pâncreas é diretamente proporcional à intensidade de infecção (número de adultos ou ovos) nos ductos pancreáticos interlobulares (BASSANI et al., 2006; HEADLLEY et al., 2009), condenando o gado ao

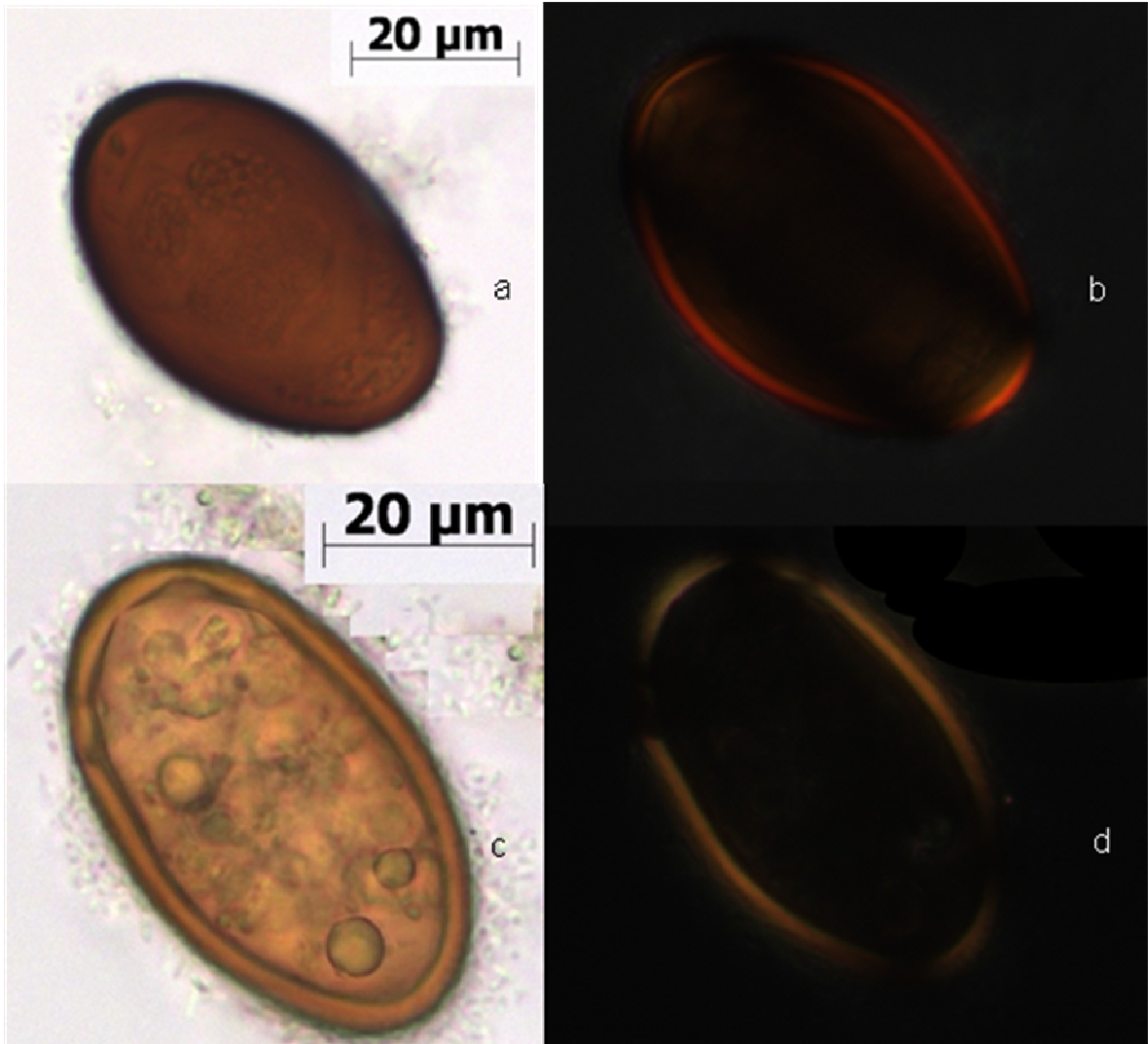
descarte, mesmo quando o número de ovos nas fezes dos animais parasitados seja inversamente proporcional à severidade das lesões ocorridas no pâncreas. Isso, provavelmente, ocorra devido à obstrução mecânica dos ductos pancreáticos pela reação inflamatória crônica desenvolvida ao redor e fibrose com obstrução do lúmen dos ductos pancreáticos, impedindo que os ovos sejam excretados com o suco pancreático (YAMAMURA, 1989). Assim, a ausência de ovos nos exames de fezes não significa que o animal não esteja parasitado por *E. coelomaticum*.

Figura 11: Microscopia de luz de ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **a e b.** Ovos mostrando **a.** extremidade anterior (ae) e posterior (pe) com o miracídio (mi) dentro. **c.** Ovo com a extremidade anterior (ae) mostrando a região do opérculo (op). O ponto de inserção do opérculo no ovo é mostrado pelas setas. **d.** A extremidade anterior (ae) do ovo com o opérculo (op) evidente. **e e f.** Ovo com opérculo (op) destacado.



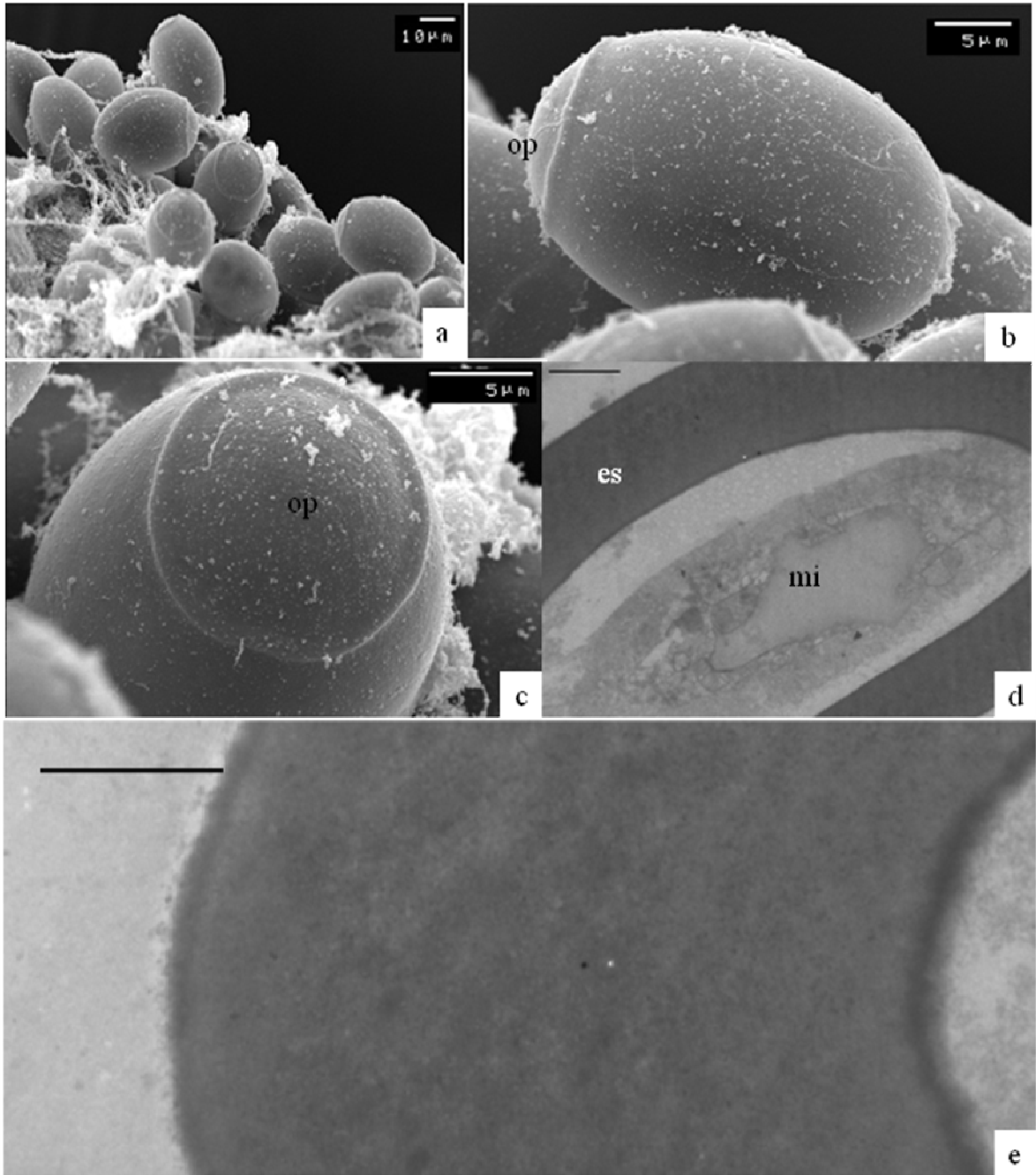
11

Figura 12: Microscopia de luz polarizada dos ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Ovo maduro. **b.** Birrefringência do ovo maduro. **c.** Ovo imaturo. **d.** Birrefringência do ovo imaturo.



12

Figura 13: Ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Vista geral de um conjunto de ovos (MEV). **b.** Vista lateral de um ovo com a região do opérculo (op) evidenciada (MEV). **c.** Vista superior da região do opérculo (op) (MEV). **d.** Secção ultrafina transversal de um ovo, evidenciando sua casca (es) e o miracídio (mi) degenerado em seu interior. Barra de escala=2 μ m (MET). **e.** Corte ultrafino mostrando um detalhe da extremidade posterior de um ovo, com as camadas externa e interna mais eletrondensas e a região intermediária menos eletrondensa e muito mais espessa. Barra de escala= 1 μ m (MET).



4.1.2 Miracídio

Os miracídios de *E. coelomaticum* não eclodem no ambiente externo, uma vez que a infecção do molusco hospedeiro é passiva, os ovos são ingeridos pelo molusco e, através do movimento de raspagem realizado pela rádula, sofrem um processo abrasivo e abrindo-se, na região do opérculo, permitindo a eclosão do miracídio. Desta forma, para proporcionar a observação do miracídio fora do ovo, seguiu-se a técnica descrita por Tang (1950). Os ovos foram colocados entre lâmina e lamínula, efetuando-se uma leve pressão sobre esta última. Com a aplicação desta pressão, o ovo rompeu, não pela região opercular, mas permitiu a saída do miracídio (Figura 14a).

O miracídio é alongado no sentido antero-posterior. Na região anterior, observou-se o “terebratorium” (Figura 14b), o qual Tang (1950) chamou de “estilete”, segundo este autor esta estrutura é eversível, podendo se introverter ou extroverter, e corresponde a cerca de um quarto do comprimento do corpo do miracídio. No presente estudo, com a variação do foco, foi possível observar o corpo da larva coberto por cílios (Figura 14c, d). E na Figura 15a um detalhe de um miracídio no momento da sua eclosão, com o opérculo do ovo ainda preso a linha de fratura em um ponto do ovo, evidenciando as células germinativas em posição posterior.

O “terebratorium”, também denominado papila apical por alguns autores, conforme dito anteriormente é uma estrutura eversível que pode ser encontrada em diferentes estágios de contração, em função do momento em que se observa o miracídio. A movimentação do “terebratorium” pode formar uma estrutura côncava, semelhante a uma ventosa a qual tem como função aderir a larva à superfície do molusco hospedeiro, dando início ao processo de penetração, como foi observado por Wilson et al. (1971) nos miracídios de *F. hepatica*.

Pinheiro et al. (2005) ao observar secções da região do “terebratorium” de *E. paraensei* ao MET, constatou a natureza altamente muscular do “terebratorium”, com fibras musculares dispostas em dois sentidos diferentes, o que indica que esta estrutura tem a capacidade de introverter-se e extroverter-se, num plano vertical, e também de alongar-se ou distender-se no plano horizontal. Wilson (1969a) atestou que a musculatura do “terebratorium” de *F. hepatica* é complexa, havendo uma camada de fibras circulares abaixo da superfície corrugada e a seguir existem seis fibras retratoras papilares. As fibras longitudinais e circulares estão aderidas umas às outras e à camada mais superficial por numerosos desmossomos e o “terebratorium” se contrai como uma unidade, não havendo o deslizamento de uma fibra em relação à outra. Em seu extenso estudo sobre a ultraestrutura dos miracídios de *S. mansoni*, Pan (1980) apenas citou a presença destes dois tipos de fibras musculares e a sua implantação.

No presente estudo foi observado o tamanho do miracídio de *E. coelomaticum*, 29,5x33,7µm, largura e comprimento, respectivamente. Os estudos de Tang (1950) registraram o tamanho dos miracídios de *E. pancreaticum*, que variou de 28-32µm e os de Tang & Tang (1977) registraram em suas ilustrações medidas de 24,6x30µm, largura e comprimento, respectivamente. Assim, os miracídios de *E. coelomaticum* registrados no presente estudo apresentaram medidas maiores que os de *E. pancreaticum* e *E. coleomaticum* registrados anteriormente.

Através da microscopia de contraste diferencial interferencial (DIC), são observadas as estruturas que correspondem às células germinativas, predominantemente localizadas na região posterior do corpo dos miracídios (Figura 15a, b), que darão origem ao estágio larval seguinte, o esporocisto de primeira geração.

Na Figura 15b, pode-se observar um miracídio com a faixa interepidérmica evidente. Tal observação permite concluir que a faixa anterior de placas epidérmicas ciliadas anteriormente é constituída por duas células. Provavelmente, a imagem da faixa interepidérmica tenha sido confundida com um estilete por Tang (1950), nas observações feitas para o miracídio de *E. pancreaticum* e por Tang & Tang (1977) para o miracídio de *E. coelomaticum*. Uma placa epidérmica ciliada posterior pode ser observada em um miracídio submetido à impregnação por AgNO₃ (Figura 15c). O tamanho e a posição desta placa, associados à observação da faixa interepidérmica na região anterior, demonstram que o miracídio de *E. coelomaticum* possui duas faixas de células epidérmicas ciliadas, uma anterior e outra posterior, sendo cada faixa composta por duas células (ou placas) epidérmicas ciliadas em posição ventrodorsolateral. Desta forma, de acordo com a nomenclatura proposta por Dimitrov et al. (1995), pode-se propor a seguinte descrição:

$$E=2E_1 + 2E_2 \quad \begin{array}{l} E_1=1 + 1E_1V DL \\ E_2=1 + 1E_2V DL \end{array}$$

No presente estudo, não foram observadas papilas na região do “terebratorium” e da faixa interepidérmica do miracídio de *E. coelomaticum*.

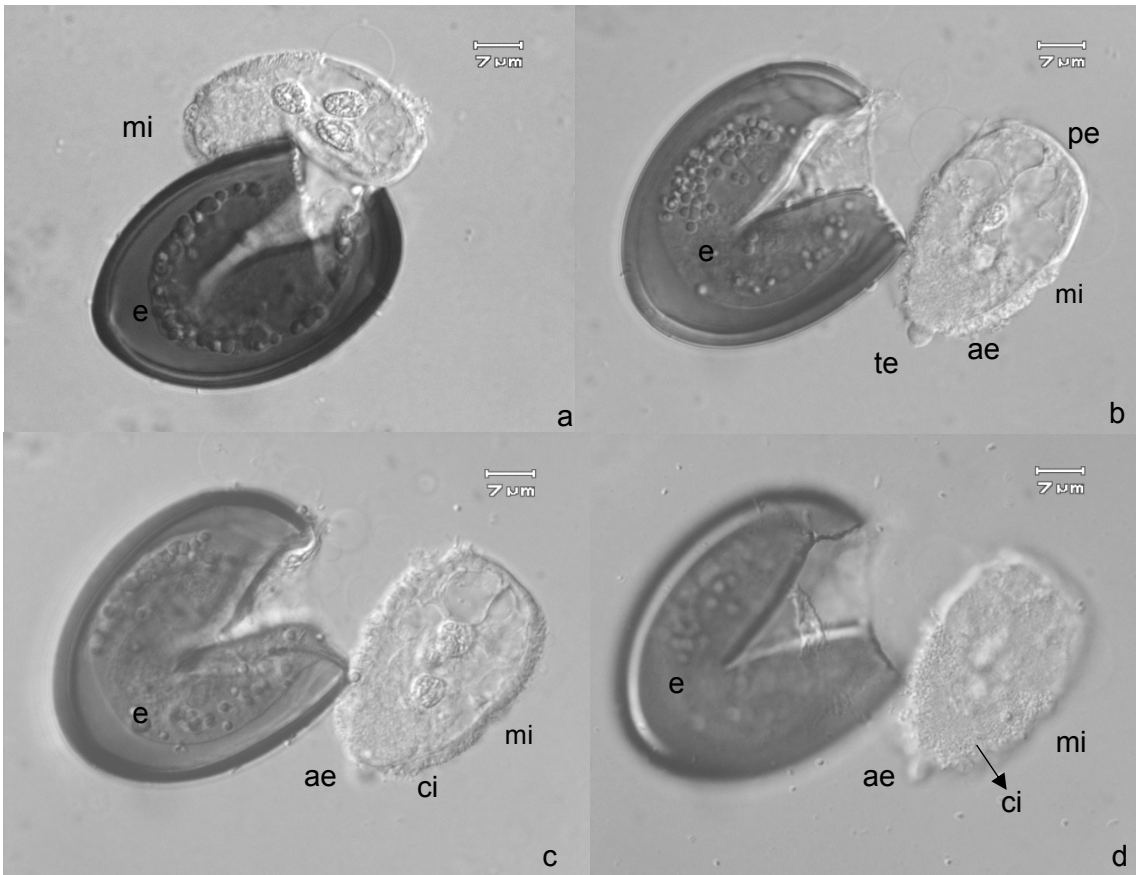
Tang (1950) observou que o miracídio de *E. pancreaticum* possui uma marcação de faixas de placas epidérmicas e ausência de cílios. O autor relatou que existiam duas linhas de placas ciliadas na epiderme do miracídio, mas o número de placas em cada linha não foi determinado. E acrescentou que as extremidades, anterior e posterior, do corpo, bem como a zona em frente à região equatorial do corpo do miracídio também não eram ciliadas.

Miracídios de algumas espécies de trematódeos, como *E. paraensei*, apresentam manchas oclares (“eyespot”). Diferente do miracídio de *E. coelomaticum* que não apresenta estas estruturas. As manchas oclares estão diretamente relacionadas com a fase de vida livre da larva e a necessidade de encontro do hospedeiro ativamente, o que não ocorre em *E. coelomaticum*, já que a infecção do primeiro hospedeiro intermediário ocorre de forma passiva.

Cabe destacar que os resultados apresentados no presente estudo, constituem o primeiro registro de imagens por microscopia de luz do miracídio de *E. coelomaticum*. Tang (1950) registrou em seu estudo acerca do ciclo de vida de *E. pancreaticum* aspectos do miracídio desta espécie de trematódeo. No que diz respeito ao *E. coelomaticum* sequer a fórmula que descreve a distribuição das placas epidérmicas ciliadas ao longo do corpo do miracídio havia sido descrita. Para permitir a observação de maiores detalhes da sua morfologia externa e interna, é preciso obter uma quantidade elevada de miracídios dos ovos e proceder a impregnação desses miracídios com nitrato de prata (AgNO₃) para realizar a observação das mesmas e sua distribuição através de ML. A obtenção de um elevado número de larvas permitirá ainda seu processamento visando a observação destas ao MET e ao MEV.

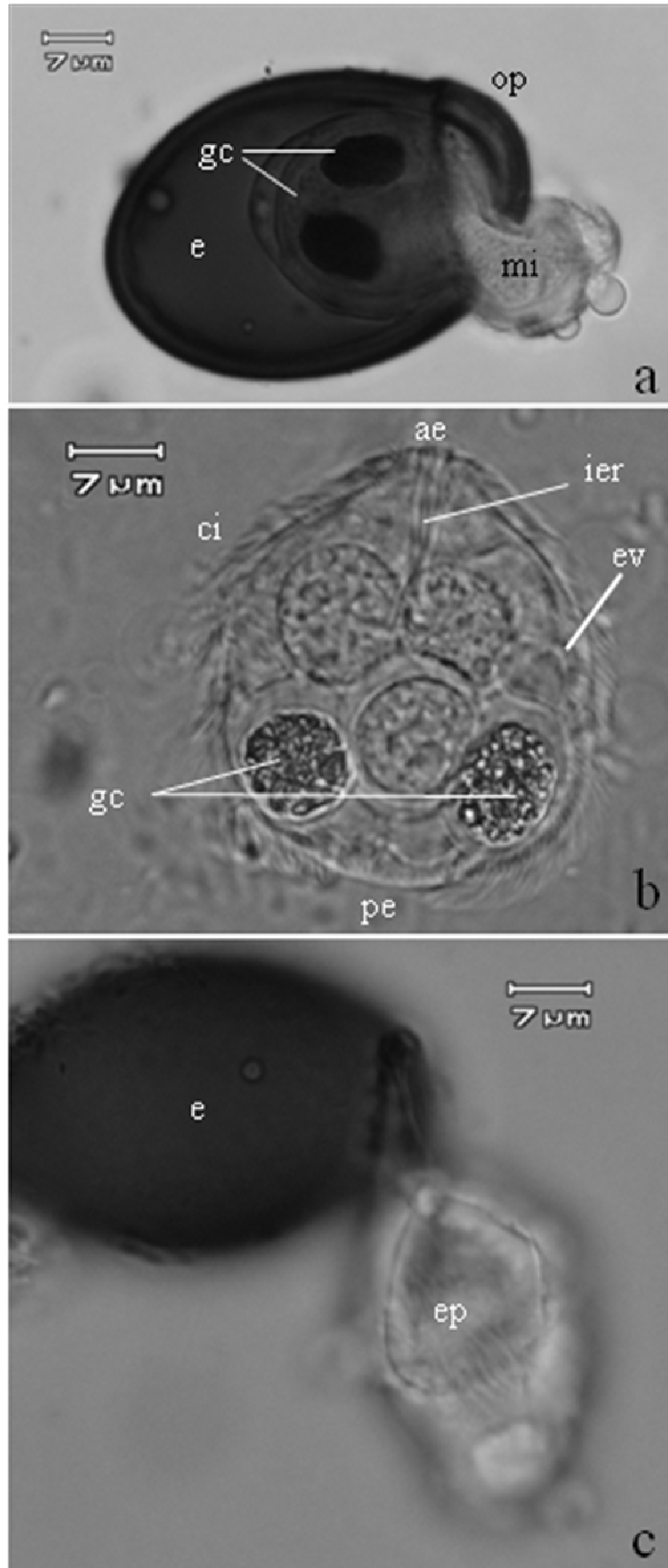
As características descritas no presente estudo para os miracídios de *E. coelomaticum*, corroboram com Tang & Tang (1977) quando a figura (desenho) contida neste trabalho é comparada com as observações realizadas no presente estudo. Contudo, esses autores não descreveram a morfologia do miracídio, apenas ilustraram-no.

Figura 14: Microscopia de luz de miracídio de *Eurytrema coelomaticum* miracidium. **a.** Ovo (e) mecanicamente fraturado com liberação de um miracídio (mi). **b.** Miracídio (mi) mostrando a extremidade anterior (ae) com o “terebratorium” (te) extrovertido e extremidade posterior (pe). **c** e **d.** Miracídio (mi) mostrando os cílios (ci) da placas epidérmicas ciliadas na região anterior (ae).



14

Figura 15: Microscopia de luz de miracídio de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** DIC do detalhe de um miracídio (mi) no momento da eclosão, onde é possível evidenciar o opérculo (op) destacado do ovo (e) e as células germinativas posteriores (gc). **b.** DIC da região anterior evidenciando a faixa inter-epidérmica (ier) entre as placas epidérmicas ciliadas anteriores, células germinativas (gc), vesícula excretora (ev) e os cílios (ci). ae=extremidade anterior; pe=extremidade posterior. **c.** Detalhe de miracídio impregnado com nitrato de prata (AgNO_3) evidenciando o contorno de uma placa epidérmica ciliada posterior (ep).



4.1.3 Esporocistos

4.1.3.1 Esporocisto de primeira geração ou esporocisto-mãe

Os esporocistos de primeira geração, também chamados de esporocistos-mãe, foram observados nos moluscos, 30 dias após a exposição aos ovos de *E. coelomaticum*. Estes se apresentaram como uma massa aderida à face celomática da parede intestinal de *B. similaris*, caramujo hospedeiro (Figura 16a) e de acordo com sua posição no corpo do molusco, foram vistos como uma massa arredondada ou alongada, com $0,1078 \pm 0,0269$ mm (0,096-0,1196mm) (Figura 16b, c). No interior dos esporocistos de primeira geração foi possível observar inúmeras células germinativas agrupadas, chamadas no conjunto de bolas germinativas, as quais darão origem aos esporocistos de segunda geração ou esporocistos-filhos. As bolas germinativas tem núcleo evidente com nucléolos proeminentes e densos, posicionados centralmente. O tegumento é composto por uma camada de poucas células (Figura 16b, c).

A superfície externa do tegumento não tem especializações, apresentando apenas algumas dobras e quando um espécime fraturado foi analisado, foi possível observar a parede membranosa do tegumento com 3,0-4,5 mm de espessura, assim como, bolas germinativas e fibras musculares no interior da larva (Figura 16d).

A presença das dobras no tegumento, nesta fase de desenvolvimento larval do parasito, sugere um aumento da superfície de absorção. Visto que não existe uma abertura oral, determinando que o esporocisto adquira os nutrientes, necessários para seus intensos processos metabólicos de divisão e diferenciação celulares exclusivamente por absorção via tegumento. Southgate (1970) observou também inúmeras dobras no tegumento dos esporocistos de *F. hepatica* após 24 horas de infecção e 60 horas após o contato do molusco com o miracídio, foram observadas involuções entre as dobras, sugerindo a ocorrência de pinocitose através desta estrutura.

As secções semi-finas de esporocistos de primeira geração mostraram que o tegumento foi dividido em duas regiões diferentes: uma camada externa mais eletrondensa e, imediatamente abaixo, uma camada interna menos eletrondensa (Figura 17a). A cavidade corporal com bolas germinativas foi observada logo abaixo da camada interna do tegumento (Figura 17a).

Secções ultrafinas observadas por MET mostraram a superfície externa do tegumento com muitas projeções e dobras (Figura 17b). Pelo fato dos esporocistos estarem aderidos à parede do intestino, foi possível observar a interface entre a larva e os tecidos do molusco hospedeiro (Figura 17d, f), em alguns pontos desta interface, a larva está intimamente associada aos tecidos do hospedeiro, sendo difícil definir o limite entre ambos (Figura 17f). Porém, em outros cortes observa-se um considerável espaço entre a larva em desenvolvimento e os tecidos do hospedeiro, alcançando $3,8\mu\text{m}$ (Figura 17d).

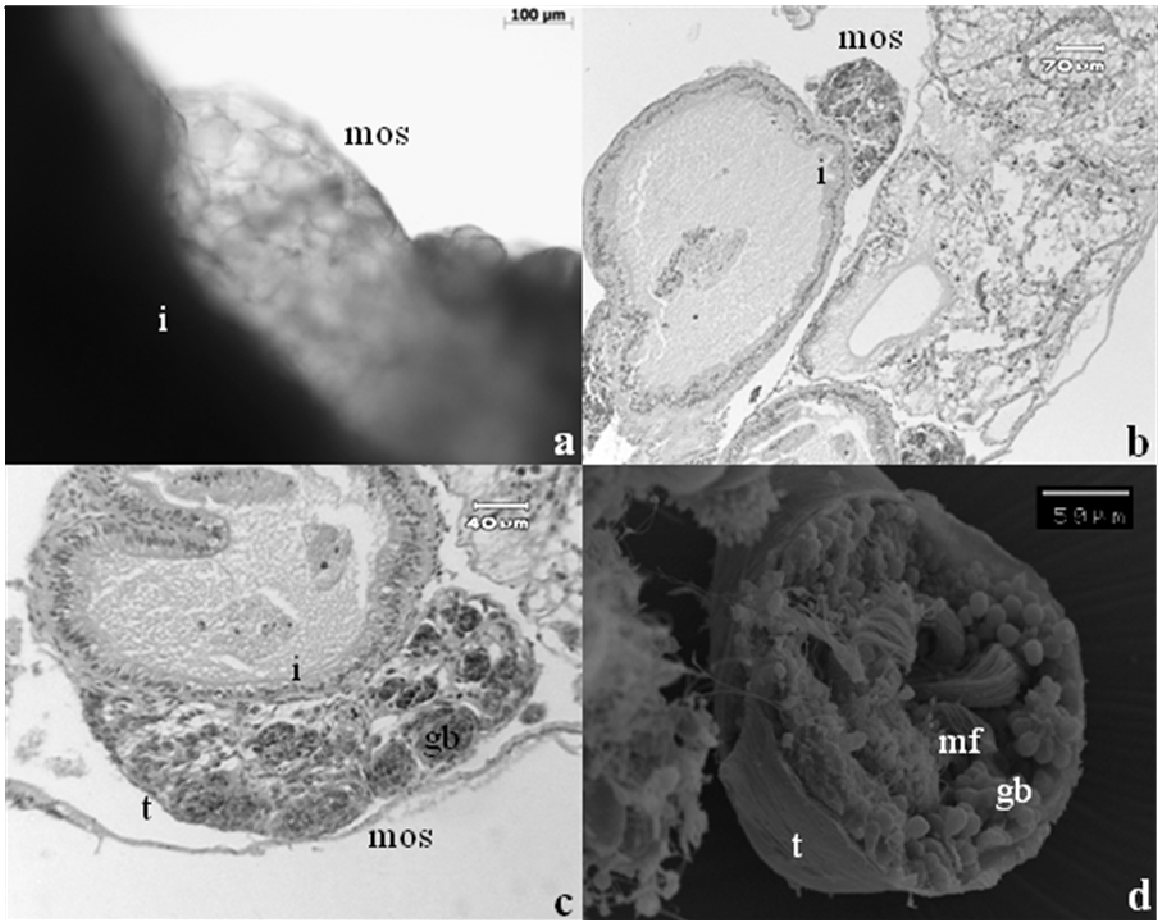
Logo abaixo da superfície do corpo da larva está localizada a camada sincicial com muitos grânulos eletrondensos e perfis mitocondriais (Figura 17e). A camada sincicial está apoiada sobre uma lâmina basal cuja espessura varia. Em algumas regiões esta lâmina basal é muito fina e quase imperceptível (Figura 17a, b, c, f). Abaixo desta lâmina basal, a camada de fibras musculares circulares foi observada, seguida imediatamente por outra camada de fibras musculares arrançadas longitudinalmente (Figura 17c, d, e). Desmosomos ou hemidesmosomos não foram observados nas junções da lâmina basal e das fibras musculares circulares, nem entre estas e as fibras musculares longitudinais. Abaixo da camada de fibras longitudinais, está localizado o parênquima composto por células somáticas e germinativas

(Figura 17f). A camada sincicial apresenta uma região que se projeta para dentro do corpo da larva, se conectando a camada interna através de pontes citoplasmáticas que cruzam as camadas musculares formando os cítons onde observa-se o núcleo da célula.

De acordo com Tang (1950), e também observado no presente estudo, os esporocistos de primeira geração são envolvidos pelos tecidos do molusco hospedeiro. Contudo, as observações por MET revelaram um espaço bem definido entre a larva e os tecidos, o qual não é facilmente visto em ML ou observações histológicas.

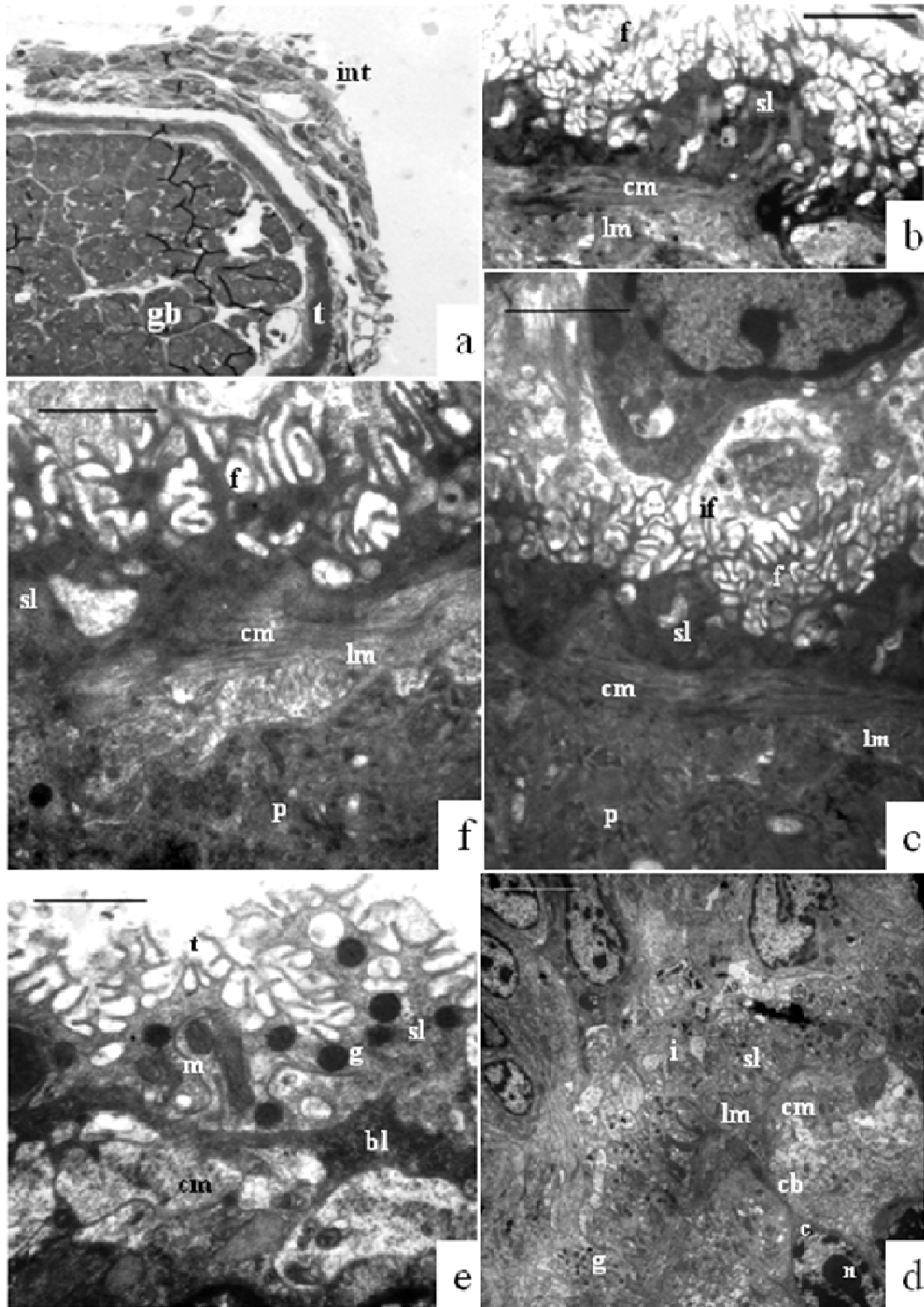
Segundo Jang (1969) a superfície externa parece ser lisa sob ML. Porém no presente estudo, por ML e MEV esta apresenta algumas dobras confirmadas pela MET, como altamente dobrada formando uma intrincada malha sobre a superfície externa da larva. A presença de numerosas dobras aumenta a superfície de absorção, permitindo a aquisição dos nutrientes para o desenvolvimento larval. Além disto, o acesso dos nutrientes é facilitado pelas profundas invaginações, as quais alcançam as camadas musculares.

Figura 16: Esporocisto de primeira geração de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** ML de um esporocisto de primeira geração (mos) aderido a face celomática da parede do intestino (i). **b e c.** Corte histológico de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada com *E. coelomaticum* mostrando diferentes posições do esporocisto de primeira geração (mos) em desenvolvimento na parede do intestino (i). Destaque para o tegumento (t) e as bolas germinativas (gb). **d.** MET de um espécime fraturado de esporocisto de primeira geração de *E. coelomaticum* mostrando o tegumento (t), bolas germinativas (gb) e fibras musculares (mf).



16

Figura 17: Esporocisto de primeira geração de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** ML de um corte semifino de um esporocisto de primeira geração aderido à parede intestinal do molusco hospedeiro intermediário *Bradybaena similaris*. Tegumento e bolas germinativas são observados. Barra de escala = 40µm. **b.** Camada externa do tegumento com muitas dobras, camada sincicial, camadas musculares circular e longitudinal. Barra de escala = 2µm. **c.** Detalhe do tegumento e seus componentes. Barra de escala = 1µm. **d.** Interface entre o esporocisto de primeira geração em desenvolvimento e os tecidos do molusco hospedeiro. Barra de escala = 2µm. **e.** Detalhe do tegumento. Uma lâmina basal bem definida, perfis mitocondriais e muitos grânulos eletrondensos podem ser vistos. Barra de escala = 1µm. **f.** Interface do esporocisto de primeira geração e o molusco mostrando a ponte citoplasmática ligando a camada sincicial à região do cíton com o núcleo evidente. Barra de escala = 5µm. (int=parede do intestino; t=tegumento; f=dobras tegumentares; gb=bolas germinativas; sl=camada sincicial; cm=camada de músculos circulares; lm=camadas de músculos longitudinais; p=parênquima; m=perfis mitocondriais; n=núcleo; g=grânulos; bl=lâmina basal; if=interface; cb=ponte citoplasmática; c=cíton).



17

4.1.3.2 Esporocistos de segunda geração ou esporocistos-filho

Esporocistos de segunda geração provenientes de dissecações

As larvas obtidas de dissecações efetuadas mais cedo (Figura 18a) foram menores do que aquelas das dissecações posteriores, as quais foram também mais alongadas (Figura 18b). Elas apresentavam, ao menos, uma extremidade do corpo com o seu diâmetro reduzido, mas também foi possível observar constrições na região mediana do corpo (Figura 18c, d). Tang e Tang (1977) registraram que cada larva desenvolve uma estrutura semelhante a uma probóscide na extremidade posterior do corpo. A mesma estrutura foi observada no presente estudo (Figura 18a, b, f). Este estágio larval não apresenta abertura oral. Assim, a região cônica e oca terminal é chamada de região anterior, e a extremidade alongada denominada região posterior, segundo Tang 1950. Na porção dilatada central do corpo da larva estão concentradas as cercárias em desenvolvimento firmemente envolvidas por um tegumento interno altamente enovelado, chamado endocisto, que se apresenta separado do saco membranoso externo quando os esporocistos dissecados são observados (Figura 18e, 19a). O endocisto encontra-se dobrado dentro do esporocisto, não dando uma impressão precisa sobre o seu tamanho real.

A superfície externa do tegumento é dobrada, apresentando estriações transversais e concêntricas bem definidas na extremidade anterior do corpo da larva (Figura 19b, c e d). Essas estrias terminam em uma cavidade de fundo cego na região cônica e oca localizada anteriormente no corpo da larva (Figura 18e, f). Quando observado ao MEV, o tegumento mostra que as estriações transversais são interrompidas por estriações longitudinais, que são mais conspícuas na extremidade anterior do corpo (Figura 19c, d, e).

As larvas estão ligadas aos tecidos da glândula digestiva do caramujo pela extremidade anterior, onde a cavidade em fundo cego está localizada, essa região apresenta um aspecto oco granular e denso nas observações ao ML (Figura 19a). A extremidade posterior encontra-se direcionada para fora do tecido, sendo banhada pela hemolinfa do hospedeiro.

Através da análise por MET, constatou-se que o tegumento dos esporocistos de segunda geração era mais espesso do que nos esporocistos de primeira geração, apresentando regiões altamente dobradas e os núcleos localizados abaixo desta região, indicando o corpo celular ou cíton (Figura 20a). Em uma visão geral, dos cortes ultrafinos transversais e longitudinais, o corpo da larva pode ser dividido em cinco diferentes regiões. O tegumento é composto por: camada sincicial externa (camada 1); camada amorfa (camada 2); camadas musculares (camada 3), formada por músculos circulares seguidos de músculos longitudinais. Abaixo do tegumento, os cítons estão localizados (camada 4) seguido pela região central do corpo onde bolas germinativas foram encontradas (camada 5) (Figura 20b).

A superfície da camada interna estava altamente dobrada (Figura 20c, d) apresentando invaginações que atravessam as camadas amorfa e de músculos circulares (Figura 20d). A camada externa do tegumento estava conectada a camada interna através de pontes citoplasmáticas que cruzam as camadas musculares (Figura 20c). Na região do cíton, foram observados os núcleos e muitos perfis mitocondriais (Figura 20b, c). De acordo com o grau de contração dos músculos, a organização destas camadas foi perdida e não foi possível diferenciá-las (Figura 20e). A camada externa do tegumento estava apoiada em uma membrana com aspecto trilaminar e mais espessa na face interna. Uma camada amorfa foi observada logo abaixo desta membrana com um aspecto fibroso (Figura 20d). A região do tegumento exibia um aspecto que sugere uma intensa atividade secretora, apresentando muitas vesículas e grânulos, principalmente na camada externa (Figura 20f).

Figura 18: Esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* obtido de dissecações de *Bradybaena similaris*, experimentalmente infectada, em diferentes períodos. **a e b.** ML de larva inteira, mostrando variação na forma. **c.** MEV de larva mostrando constrições (ct) no meio do corpo, o alongamento na extremidade posterior (pe) do corpo e a extremidade anterior oca e alongada. **d.** MEV de uma outra larva mostrando o alongamento posterior (pe) e a região anterior (ae) oca e alongada (ht). **e.** ML de esporocisto de dissecação mostrando a extremidade anterior com a região oca e alongada (ht), semelhante a probóscide, com a cavidade em fundo cego, como um ventosa, localizada anteriormente. **f.** MEV da extremidade anterior de esporocisto de segunda geração com a cavidade em fundo cego (bc) de esporocisto de segunda geração e estriações (s).

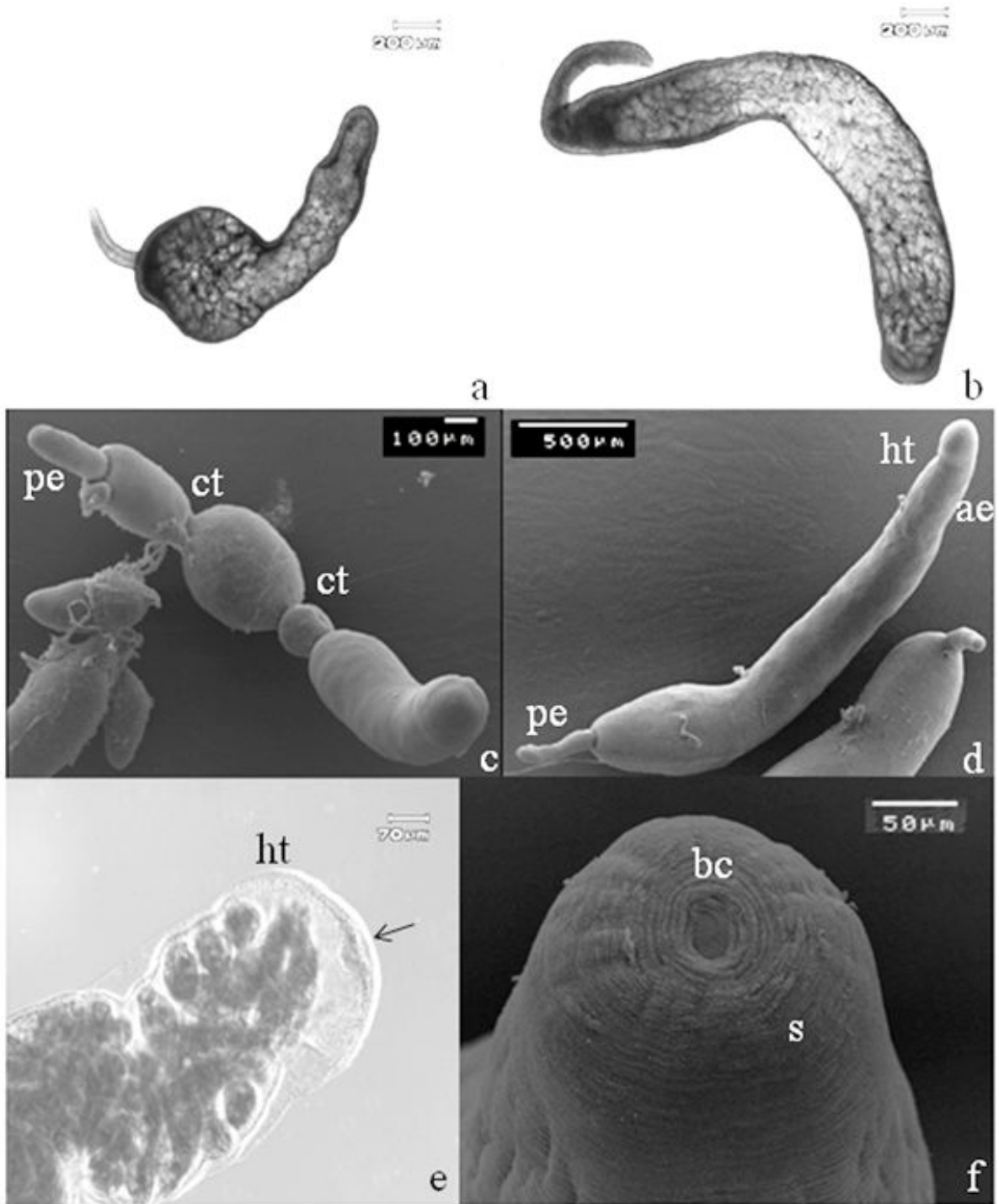


Figura 19: Esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** ML de esporocisto filho obtido de dissecação de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada mostrando a extremidade anterior oca e cônica com a cavidade em fundo cego (bc) e aspecto granular (g). As cercárias (ce) estão completamente formadas e o endocisto (en) é visível. **b.** ML da extremidade anterior de um esporocisto filho obtido de dissecações do hospedeiro molusco, com estriações transversais e concêntricas (s). **c.** MEV das estriações transversais e concêntricas transversal (s) por todo o corpo da larva. **d.** MEV de detalhe das estriações transversais mostrando as estriações longitudinais na superfície do tegumento. **e.** MEV de extremidade anterior do corpo do esporocisto com aspecto oco e cônico e muitas estriações concêntricas (s). **f.** ML de esporocisto filho expelido por *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada mostrando a região central oval, semelhante a uma saco, e transparente (cr) do corpo e ambos prolongamentos, o menor na extremidade anterior (ae) e o maior na extremidade posterior (pe). **g.** MEV de esporocisto filho inteiro expelido por *B. similaris* experimentalmente infectada mostrando a extremidade anterior (ae), o meio do corpo (cr) e a extremidade posterior (pe). **h** e **i.** MEV da região de formação dos filamentos anterior e posterior, respectivamente. **j.** MEV de esporocisto filho expelido mostrando um detalhe da superfície externa do tegumento.

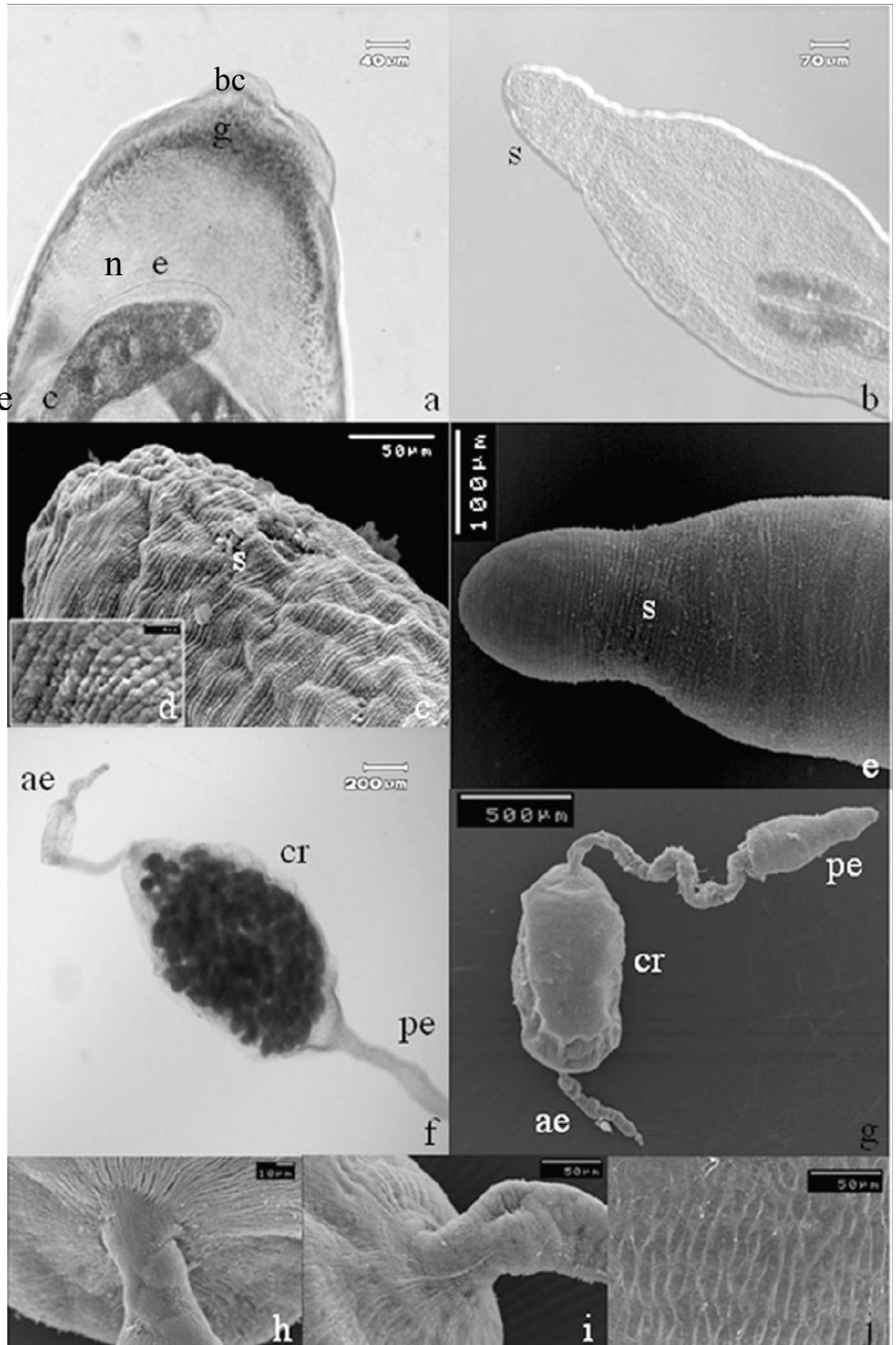
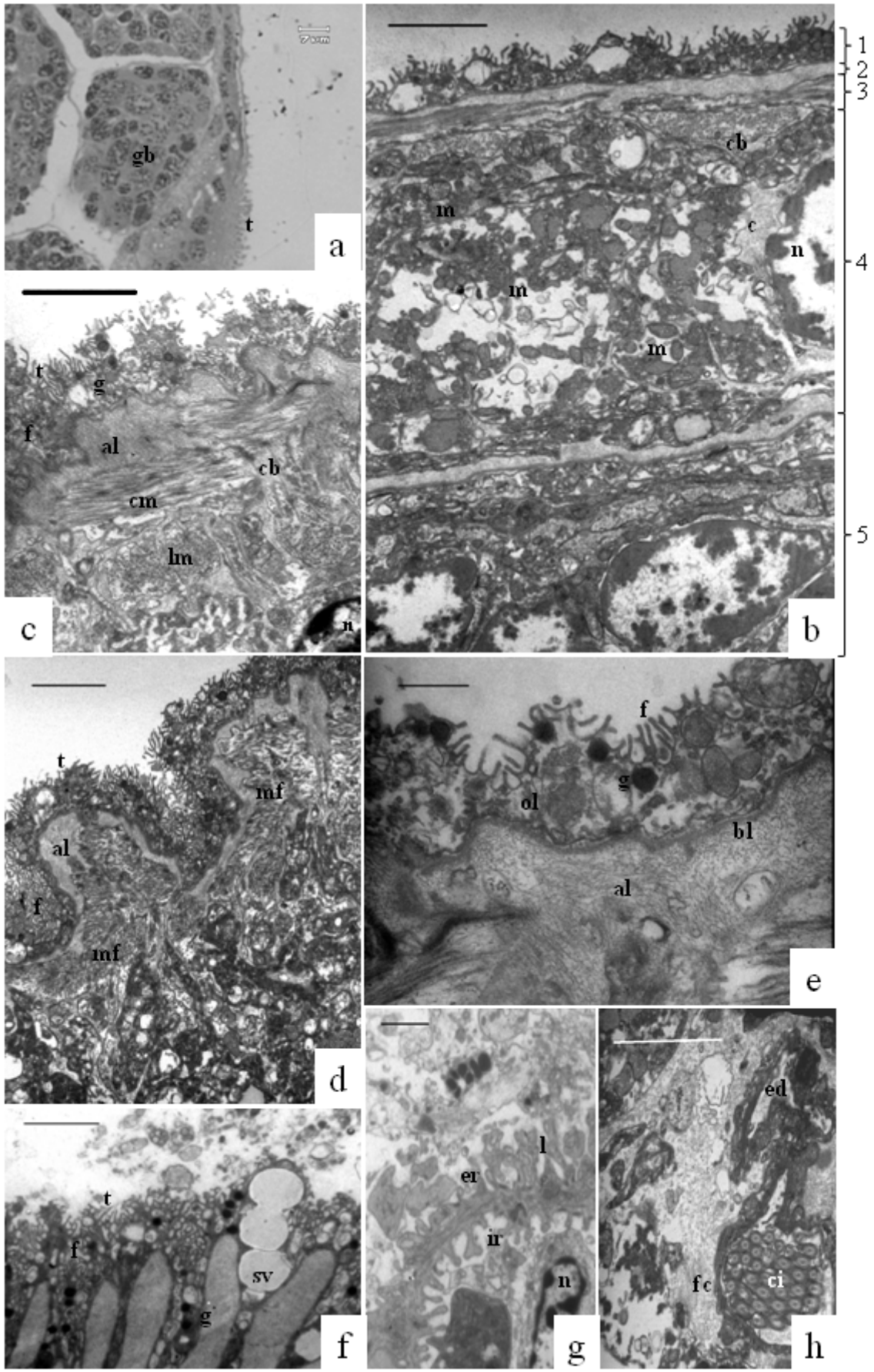


Figura 20: Secção transversal de esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* obtidos de dissecações de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada. **a.** ML de corte semifino mostrando o tegumento com núcleos e a cavidade do corpo com as bolas germinativas. **b.** MET da vista geral das diferentes camadas na parede do corpo do esporocisto: 1: camada externa sincicial; 2: camada amorfa; 3: camadas musculares (circular e longitudinal); 4: camada interna do corpo celular ou cíton; 5: região interna central do corpo com bolas germinativas. Barra de escala = 2 μ m. **c.** MET do detalhe da parede do corpo com a superfície externa com dobramentos seguida por uma camada amorfa, camadas de músculos circulares e longitudinais. A ponte citoplasmática e o cíton são evidentes. Barra de escala = 1 μ m. **d.** MET da larva contraída mostrando desorganização das camadas musculares. Barra de escala = 2 μ m. **e.** MET do detalhe da camada sincicial com dobras, grânulos, lâmina basal evidente e camada amorfa. Barra de escala = 500nm. **f.** MET da atividade secretora na camada externa do tegumento. Barra de escala = 2 μ m. **g.** MET da secção na base da célula-flama com as projeções citoplasmáticas internas e externas, leptotríquios e o núcleo. Barra de escala = 2 μ m. **h.** MET da parte superior da célula flama na região do barril co o tufo de cílios dentro do cilindro. Barra de escala = 1 μ m. (t=tegumento; gb=bolas germinativas; cb=pontes citoplasmáticas; m=perfis mitocondriais; c=cíton; n=núcleo; al=camada amorfa; cm=camada de músculos circular, lm=camada de músculos longitudinal; g=grânulos; f=dobramentos; mf=fibras musculares; bl= lâmina basal; ol=camada externa; sv=vesícula secretora; er=projeções citoplasmáticas externas; ir=projeções citoplasmáticas internas; l=leptotríquios; fc=célula-flama; ed=duto excretor).



Estruturas excretoras foram observadas na região do cíton, que se localizava a $8,72 \pm 0,79\mu\text{m}$ da superfície do corpo da larva. O sistema excretor protonefridial, composto por células-flama (Figura 20g, h) direciona os produtos de excreção através de canais. A base das células-flama é vista na Figura 20g, a membrana celular da região basal apresenta projeções citoplasmáticas internas e externas e leptotríquios. Sendo, o núcleo da célula-flama localizado nesta região. A região do barril com os cílios foi observada na porção apical da célula-flama (Figura 20h).

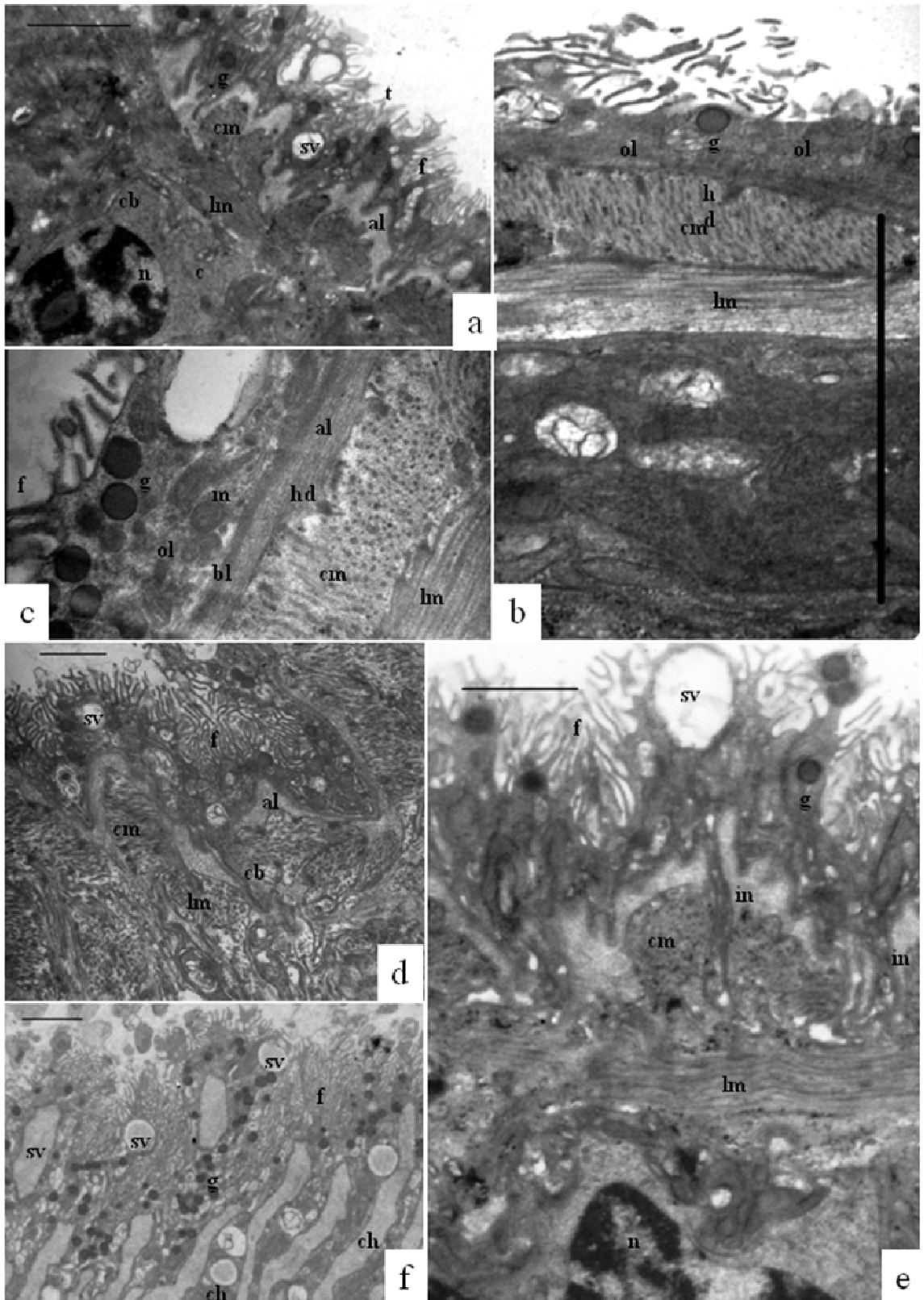
Pontes citoplasmáticas foram observadas nitidamente nos cortes longitudinais (Figura 21a). Também, foi possível identificar a presença de hemidesmossomos ligando a camada externa e a camada de músculos circulares e a camada de músculos circulares à camada de músculos longitudinais (Figura 21a). Esta camada exhibe muitos grânulos e perfis mitocondriais (Figura 21b, c). Nesta seção, a lâmina basal era evidente, assim como a camada amorfa abaixo dela (Figura 21c). Diferente do que foi visto nos cortes transversais, longitudinalmente na larva contraída a organização das camadas musculares foi mantida (Figura 21d). Muitos grânulos, vesículas secretoras e estruturas semelhantes a canais onde as vesículas secretoras emergem foram vistos (Figura 21e, f) indicando intensa atividade secretora. Estas vesículas se abrem na superfície externa do corpo da larva através da camada externa (Figura 21f).

Os esporocistos obtidos por dissecação foram observados em cortes longitudinais e transversais, apresentando um tegumento espesso e bem definido, com núcleo evidente. Quando observados por MET, foi possível definir as diferentes camadas da parede do corpo. A organização da parede do corpo dos estágios larvais dos trematódeos digenéticos pode apresentar variações de acordo com a espécie. Pinheiro et al. (1994; 1995) não observaram pontes citoplasmáticas conectando as camadas externa e interna do tegumento em miracídios e rédias de *E. paraensei*. No presente estudo, estas pontes foram claramente mostradas em ambos planos de corte. Como observado nos esporocistos de primeira geração, os esporocistos de segunda geração dissecados apresentaram a superfície do tegumento altamente dobrada para aumentar a superfície de absorção, assim como melhorar a adesão da larva aos tecidos do hospedeiro.

A camada de músculos circulares é responsável pelo movimento de contração que levam a variações no diâmetro da larva, e a camada longitudinal de músculos permite que a larva se contraia, esticando ou encolhendo. As observações destas camadas quando a larva está contraída mostraram a desorganização das mesmas, mas quando cortes longitudinais foram examinados, a organização e separação das camadas musculares permaneceram distintas. Estas observações mostraram que os movimentos de contração da musculatura transversal são menos intensos do que os movimentos da musculatura longitudinal que determinam variação do diâmetro da larva.

Em ambos, esporocistos de primeira e de segunda geração, a presença de muitos grânulos eletrondensos na camada externa do tegumento indica uma intensa atividade secretora. Portanto, a presença de muitos perfis mitocondriais nesta região indica uma intensa atividade metabólica, corroborando os processos de secreção que consomem grandes quantidades de energia. Nos esporocistos de segunda geração, além destes grânulos, também foram observadas vesículas secretoras sendo formadas no topo desta região. Estas vesículas podem carregar produtos de excreção/secreção para o exterior, como produtos nitrogenados de degradação e substâncias que modulam o sistema neuroendócrino do hospedeiro, causando as mudanças exaustivamente registradas nos moluscos hospedeiros (PINHEIRO & AMATO, 1994, 1995; LIRA et al., 2000, SOUZA et al., 2000; BRANDOLINI & AMATO, 2001; PINHEIRO et al., 2001).

Figura 21: MET da secção longitudinal de esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* obtido de dissecações de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada. **a.** Vista geral do tegumento com a camada externa com muitas dobras, grânulos e vesículas secretoras, seguida pela camada amorfa, as camadas de músculos circulares e longitudinais, o corpo celular (cítion) e o núcleo. Barra de escala = 2 μ m. **b.** Camada externa do tegumento, com muitos grânulos e perfis mitocondriais, ligada às camadas musculares por hemidesmosmosos. Barra de escala = 2 μ m. **c.** Detalhe das camadas externa, amorfa e musculares do tegumento. Barra de escala = 500nm. **d.** Observação do corpo de uma larva contraída. Barra de escala = 2 μ m. **e.** Liberação de vesícula secretora e uma invaginação cruzando a camada de músculos circulares. Barra de escala = 1 μ m. **f.** Formação e liberação de vesículas secretoras e grânulos. Barra de escala = 2 μ m. (t=tegumento; cb=ponte citoplasmática; m=perfis mitocondriais; c=cítion; n=núcleo; al=camada amorfa; cm=camada de músculos circulares, lm= camada de músculos longitudinais; g=grânulos; f=dobramentos; mf=fibras musculares; bl=lâmina basal; ol=camada externa; sv=vesícula secretora; hd=hemidesmosomo; ch=canal; in=invaginação).



A atividade secretora mais intensa nos esporocistos de segunda geração, quando comparados aos esporocistos de primeira geração, pode estar relacionada com a afirmação de Tang (1950) de que neste estágio, o desenvolvimento é muito lento. Isto é depois corroborado pelo fato de que os esporocistos analisados, no presente estudo, ainda estavam no início do seu desenvolvimento (30 dias). Os esporocistos de segunda geração mostram uma atividade metabólica mais intensa, a qual é evidenciada pela presença de vesículas secretoras e grande número de perfis mitocondriais, tal atividade aumentada pode estar relacionada com a alta taxa de divisão assexuada, mas também com a diferenciação para formar as cercárias nos esporocistos de segunda geração.

Tang (1950) descreveu o sistema excretor de *E. pancreaticum* sendo composto por uma abertura excretora em cada lado do corpo, conectadas a um tubo excretor que se divide em três túbulos terminados por uma célula-flama. No presente estudo, as células-flama foram observadas na camada interna, no citon, próximas à superfície corporal e uma parte do túbulo excretor. Aberturas excretoras não foram observadas.

Esporocistos de segunda geração expelidos

Os esporocistos de segunda geração expelidos apresentavam uma coloração esbranquiçada no centro do corpo e transparente nas extremidades (Figura 19f).

Como descrito para *E. pancreaticum* (Tang, 1950), esporocistos de *E. coelomaticum* também apresentam uma região transparente oval em forma de saco. A região média do corpo apresentava uma porção dilatada, com um formato arredondado ou oval e também dois filamentos, um anterior de tamanho reduzido e outro posterior mais alongado (Figura 19f). A região sacular apresentava em média $5,28 \pm 0,52\text{mm}$ (4,45 - 5,95mm) de comprimento e $0,91 \pm 0,25\text{mm}$ (0,70 - 1,40mm) de largura. O comprimento médio do filamento anterior foi de $0,0664\text{mm}$ de comprimento (0,0425 - 0,0950) e o filamento posterior muito maior do que o anterior, apresentando, em média, $0,3342\text{mm}$ de comprimento (0,2125 - 0,4125), como pode ser observado na Tabela 5. Os pontos de origem dos filamentos anterior e posterior são vistos na Figura 19h, i, respectivamente. O tegumento das larvas apresenta muitos dobramentos com diferentes orientações (Figura 19j).

Tabela 5: Medidas dos esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* expelidos por *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada. Média \pm desvio padrão (amplitude de variação).

Medidas dos esporocistos (mm)		
	Extremidade anterior	0.712 (0.475 – 0.925)
Comprimento	Extremidade posterior	3.250 (2.450 – 3.775)
	Região mediana (sacular)	1.287 (1.000 – 1.500)
Comprimento Total		5.280 (4.450 – 5.950)
Largura da região mediana (sacular)		0.095 (0.700 – 1.400)

Em sua redescritção de *Dicrocoelium coelomaticum*, com a proposta do novo gênero *Eurytrema*, Looss (1907) se baseou apenas em caracteres observados nos vermes adultos. Somente em 1977, Tang & Tang realizaram um estudo das características observadas em estágios larvais de *E. coelomaticum*, com uma breve descrição morfométrica do desenvolvimento larval intramolusco. Desde então, a morfologia das larvas intramolusco de *E. coelomaticum* foi esquecida. Dessa forma, a falta de informações determinou a comparação dos dados do presente estudo com aqueles obtidos por Tang (1950) para *E. pancreaticum*, uma vez que o autor dá informações detalhadas sobre a morfologia dos estágios larvais intramolusco dessa espécie de trematódeo. Em 1977, Tang & Tang relataram alguns aspectos biológicos e epidemiológicos das espécies pertencentes ao gênero *Eurytrema*, apresentando algumas características de *E. coelomaticum*. Porém, esses autores apresentaram apenas caracteres morfométricos e as imagens foram apresentadas em forma de desenhos ou esquemas.

Ao considerar a morfologia da *E. coelomaticum*, apresentada neste estudo, com observações de histologia, ML e MEV, os esporocistos de primeira geração são estruturas amorfas aderidos à parede celomática do intestino do primeiro hospedeiro intermediário, o caramujo. Quando estas larvas são medidas na sua posição arredondada, apresentam 0,096mm de diâmetro, sendo maior do que o tamanho apontado por Tang (1950) para *E. pancreaticum* (0,092mm de diâmetro), e, também, em relação às medidas apresentadas por Tang & Tang (1977). Os desenhos apresentados por estes autores mostram esporocistos de primeira geração de *E. coelomaticum* em diferentes estágios de desenvolvimento, com diâmetro variando entre 0,040 e 0,050mm. Um fator que influencia o tamanho da larva é a temperatura durante o desenvolvimento; larvas se desenvolvem mais rapidamente em altas temperaturas e, conseqüentemente, são menores. A diferença nas dimensões das larvas do presente estudo e as do trabalho de Tang & Tang (1977) pode estar relacionada às espécies de caramujo que atuam como primeiro hospedeiro intermediário do parasito, *B. similis* e *Cathaica ravidia sieboldiana* Pfeiffer, respectivamente. Porém, quando apresentaram os resultados morfométricos das larvas, os autores não fizeram referência à espécie de molusco da qual procediam.

Tang (1950) mostrou que os esporocistos de primeira geração de *E. pancreaticum* completamente desenvolvidos apresentam lobos e podiam atingir 4mm de diâmetro. No presente estudo, não foi possível observar lobos nos esporocistos de primeira geração de *E. coelomaticum*. Possivelmente, os lobos observados pelo autor, representassem diferentes esporocistos que se localizavam muito próximos, dando a impressão de serem uma única larva.

Os esporocistos de segunda geração de *E. coelomatium* expelidos pelos moluscos infectados experimentalmente, apresentaram morfologia variada. Porém, as medidas realizadas eram menores que as de *E. pancreaticum* observadas por Tang (1950), que tinham 6,9 - 7,9mm de comprimento total e 0,7 - 1,0mm de largura. Posteriormente, em 1977, Tang e Tang apresentaram medidas semelhantes às observadas por Tang (1950), porém para *E. coelomaticum* (Tabela 6).

Tabela 6: Morfometria comparativa dos esporocistos de primeira e segunda geração de *Eurytrema*. Medidas em mm.

	Esporocisto de primeira geração	Esporocisto de segunda geração (comprimento x largura)
Presente Estudo - <i>E. coelomaticum</i>	0,096	5,280x0,095
Looss (1907) - <i>Eurytrema</i>	-	-
Tang (1950) - <i>E. pancreaticum</i>	0,092	6,9-7,9x0,7-1,0
Jang (1969) - <i>E. pancreaticum</i>	-	Grupos de larvas
Tang & Tang (1977) - <i>E. coelomaticum</i>	0,040-0,050	Semelhantes à Tang (1950)

Jang (1969) mostrou esporocistos de *E. pancreaticum*, mas os esporocistos de segunda geração são mostrados de uma maneira geral, em grupos de larvas, quando foram expelidos pelo seu primeiro hospedeiro intermediário, *B. similaris*.

Pela primeira vez, no presente estudo, a morfometria dos esporocistos de *E. coelomaticum* e seus aspectos morfológicos foram estudados através de ML e MEV, incluindo esporocistos de primeira geração, de segunda geração em desenvolvimento e após serem expelidos pelo molusco hospedeiro. A topografia do tegumento dos esporocistos de *E. coelomaticum* tem, neste estudo, seu primeiro registro, apresentando várias dobras e estriações que aumentam a superfície de absorção. Uma característica importante, uma vez que os esporocistos não tem abertura oral e todos os nutrientes necessários são absorvidos através do tegumento, assim como os produtos de excreção e secreção que precisam ser eliminados do corpo da larva. A presença de uma cavidade de fundo cego, formando uma estrutura semelhante a uma ventosa, localizada anteriormente, também não havia sido descrita antes. Esta pode representar uma estrutura importante para a fixação da larva aos tecidos do hospedeiro durante seu desenvolvimento.

A presença de dois envelopes que compõem a parede dos esporocistos de segunda geração constitui um recurso importante para a proteção física das cercárias contidas em seu interior, evitando a dessecação excessiva da larva, quando esta deixa o hospedeiro molusco e fica exposta às condições ambientais externas.

O estágio de esporocisto de segunda geração representa uma etapa muito importante do desenvolvimento larval intramolusco. Visto que, nesta fase, ocorre multiplicação assexuada, determinando um aumento significativo da carga parasitária, permitindo a formação de centenas de cercárias a partir de um único miracídio. Dessa forma, o desenvolvimento intramolusco de *E. coelomaticum*, apresenta-se como uma etapa para o controle da euritrematose no gado bovino.

Os cortes semifinos, da região anterior dos esporocistos de segunda geração expelidos, mostraram um tegumento espesso e nenhuma larva em desenvolvimento (Figura 22a). Observados ao MET, os cortes ultrafinos mostraram o tegumento desta região com, uma superfície externa com dobras maiores do que aquelas observadas nos esporocistos obtidos por dissecação; as camadas musculares, circular e longitudinal, não foram distinguíveis (Figura 22b). A organização observada antes nos esporocistos dissecados foi perdida (Figura

22c); não foi observada diferenciação entre a camada externa, lâmina basal e camada amorfa e em alguns cortes as camadas musculares não foram observadas, o que indica que as mesmas não sejam contínuas nesta região (Figura 22c). Contudo, a atividade secretora foi mantida, como indicado pela formação de vesículas secretoras na região externa do tegumento (Figura 22d).

Os cortes semifinos da região média mostraram um tegumento muito fino e um grande espaço abaixo deste, onde estruturas celulares não foram identificadas. Nesta região, o endocisto foi observado com uma parede bem definida e com a presença de cercárias em seu interior (Figura 23a).

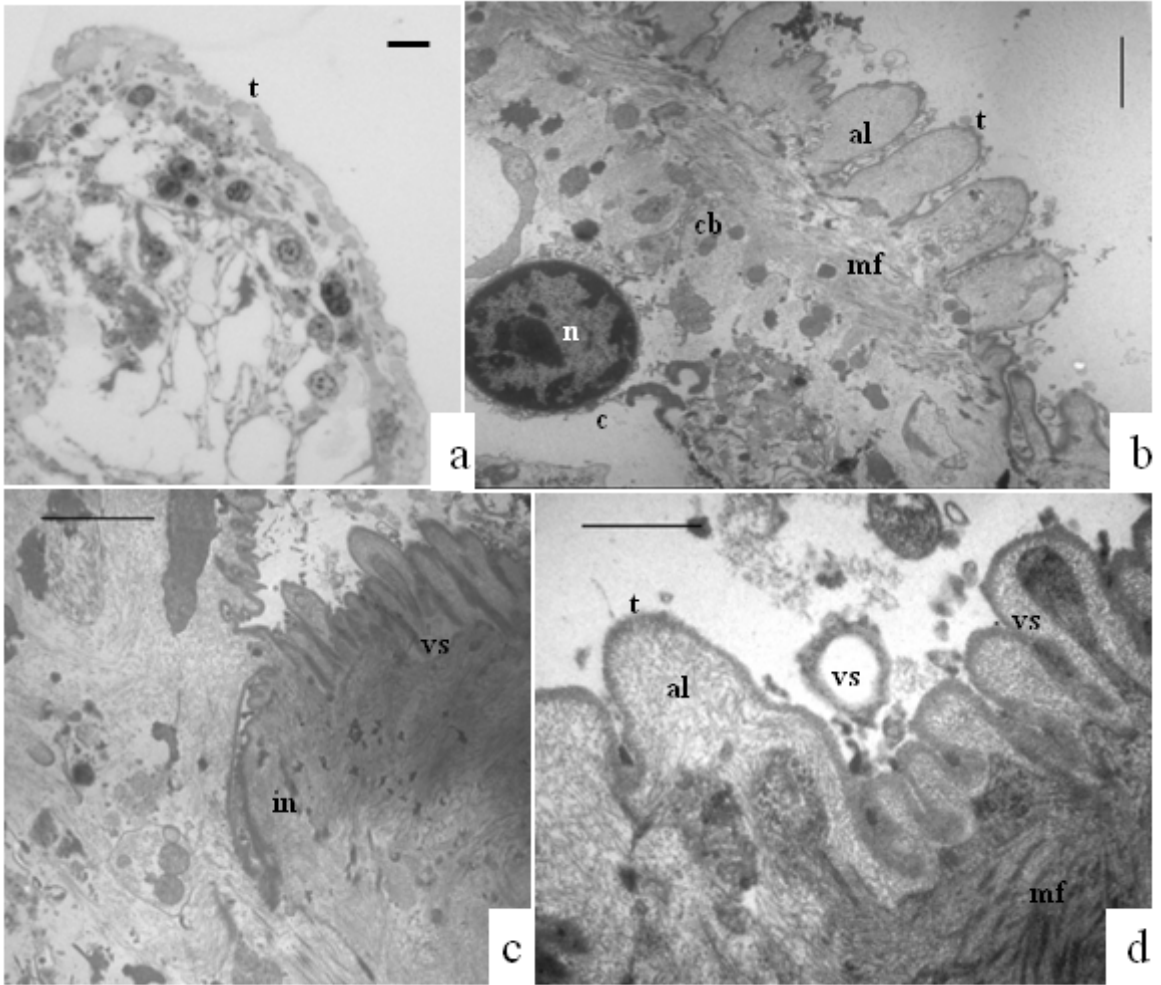
Quando secções ultrafinas foram observadas, a região do saco membranoso não apresentou estruturas celulares, e sua região interna apresentava muitas estruturas semelhantes a restos de membranas formando lamelas; figuras de mielina também foram observadas (Figura 23b). Estruturas vacuolares foram localizadas próximas ao endocisto (Figura 23c). Em algumas secções, as camadas musculares estavam localizadas adjacentes à superfície externa do tegumento (Figura 23d, e), mas em outros cortes estas camadas estavam localizadas muito distantes da superfície do tegumento (Figura 23b).

Apesar da perda da organização e mudanças estruturais no tegumento e na região do saco membranoso, a atividade secretora não foi perdida, com formação e liberação de vesículas secretoras em sua superfície externa (Figura 23d, e). Na região do saco membranoso foi observado o sistema excretor da larva, onde foi possível visualizar uma célula-flama (Figura 23f), mostrando que estas estruturas estão localizadas periféricamente no esporocisto.

Internamente, protegido pelo saco membranoso, estava o endocisto, no qual as cercárias se desenvolvem (Figura 23c, g). Quando observado em maiores aumentos, foi possível constatar que a parede externa do endocisto era composta por uma estrutura fibrilar, suportada por uma lâmina basal (Figura 23c, g). No endocisto, estruturas lamelares, material amorfo e figuras de mielina também foram observados (Figura 23c) e as cercárias parecem estar parcialmente envolvidas por este material amorfo.

As secções semifinas da região posterior mostraram uma região externa com algumas projeções. Abaixo desta região, uma camada contínua e menos eletrondensa foi observada e na cavidade do corpo não havia cercárias (Figura 24a). Quando observado por MET, o tegumento era altamente ramificado, com muitas figuras de mielina (Figura 24b-e). Um espaço entre esta camada externa e uma membrana altamente eletrondensa foi visto, sugerindo que esta se destaca do corpo da larva (Figura 24e). Esta membrana apresenta invaginações para as quais a camada externa se projeta (Figura 24b, c). Abaixo da membrana, há uma camada amorfa contínua, somente interrompida pelas invaginações, as quais cruzam as camadas de músculos, circular e longitudinal. As camadas de músculos foram observadas, mas sua integridade parece ter sido perdida (Figura 24b). Abaixo da camada muscular, as pontes citoplasmáticas e o cíton, com núcleo, estavam preservados (Figura 24b, d).

Figura 22: Secção transversal da região anterior do corpo de um esporocisto de segunda geração *Eurytrema coelomaticum* expelido. **a.** ML de corte semifino mostrando o tegumento e a cavidade corporal sem larvas em desenvolvimento. Barra de escala = 7 μ m. **b.** MET do tegumento com dobramentos que são maiores em tamanho e preenchidos pela camada amorfa. Destaque para a desorganização das camadas musculares unidas ao corpo celular (cítion) pela ponte citoplasmática. Barra de escala = 2 μ m. **c.** MET da região dobrada do tegumento e atividade secretora. Barra de escala = 2 μ m. **d.** MET do detalhe da formação e liberação das vesículas secretoras no topo das dobras tegumentares. Barra de escala = 500nm. (t=tegumento; cb=ponte citoplasmática; c=cítion; n=núcleo; al=camada amorfa; mf=fibras musculares; vs=vesícula secretora; in=invaginação).



22

Figura 23: Região inchada no meio do corpo de esporocisto de *Eurytrema coelomaticum* expelido. **a.** ML da secção semifina transversal mostrando a superfície do tegumento do saco membranoso preenchido por material amorfo e o endocisto com cercárias dentro. Barra de escala = 7 μ m. **b.** MET da região do saco membranoso com estruturas membranosas dentro formando lamelas e figuras de mielina, e camadas musculares degeneradas localizadas distantes da superfície do corpo. Barra de escala = 1 μ m. **c.** MET do detalhe das camadas musculares degeneradas localizadas próximas à superfície externa do corpo e vesículas secretoras na superfície. Barra de escala = 1 μ m. **d.** MET do detalhe de uma projeção na superfície externa do corpo e muitos grânulos. Barra de escala = 2 μ m. **e.** MET da célula-flama localizada na região do saco membranoso. Barra de escala = 2 μ m. **f.** MET da vista geral do corpo mostrando o endocisto, com uma cercária, preenchido por resíduos de membranas, material amorfo e grânulos. Barra de escala = 2 μ m. **g.** MET do detalhe mostrando a natureza fibrilar da parede do endocisto. Barra de escala = 500nm. (t=tegumento; ms=saco membranoso; en=endocisto; ce=cercária; lms=lamelas membranosas; mif=figura de mielina; mf=fibras musculares; ol=camada externa; n=núcleo; v=vesícula; g=grânulo; fc=célula-flama; ci=cílios; vc=vacúolos; vs=vesícula secretora; fr=região fibrilar; bm=lâmina basal).

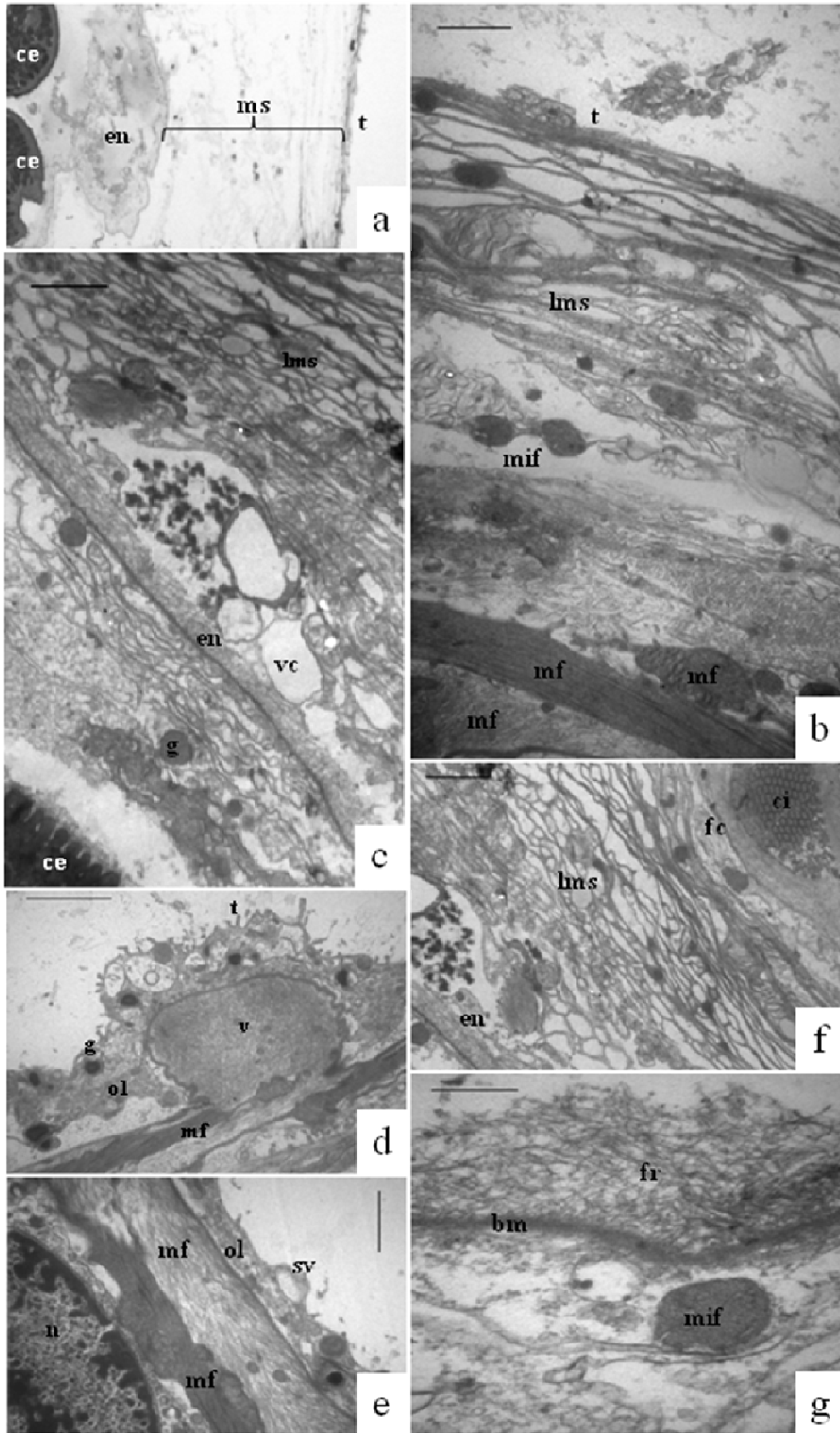
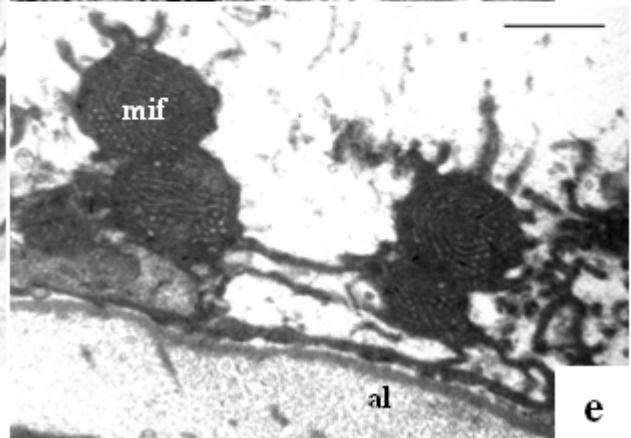
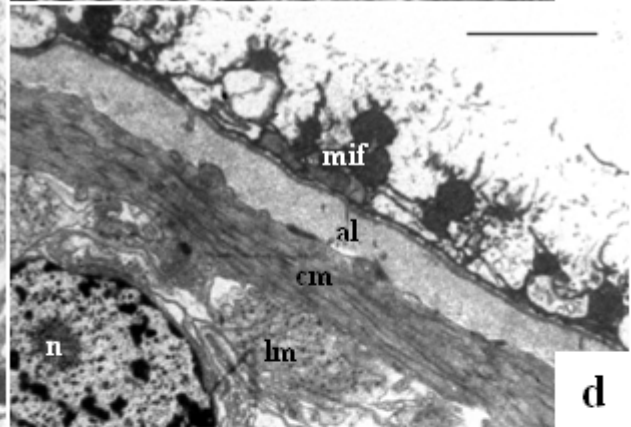
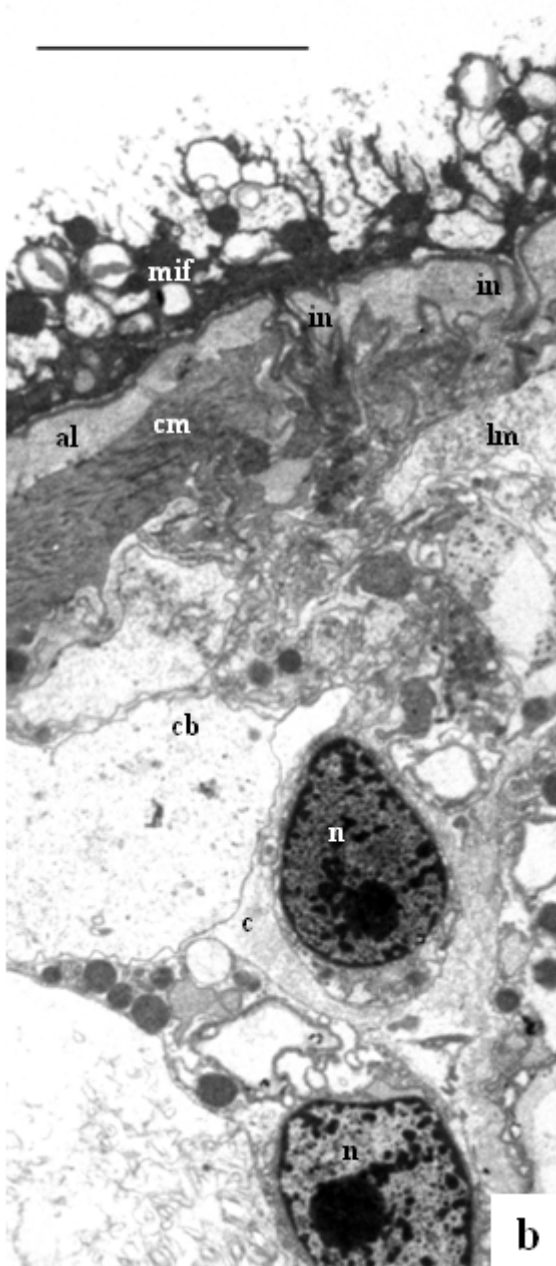
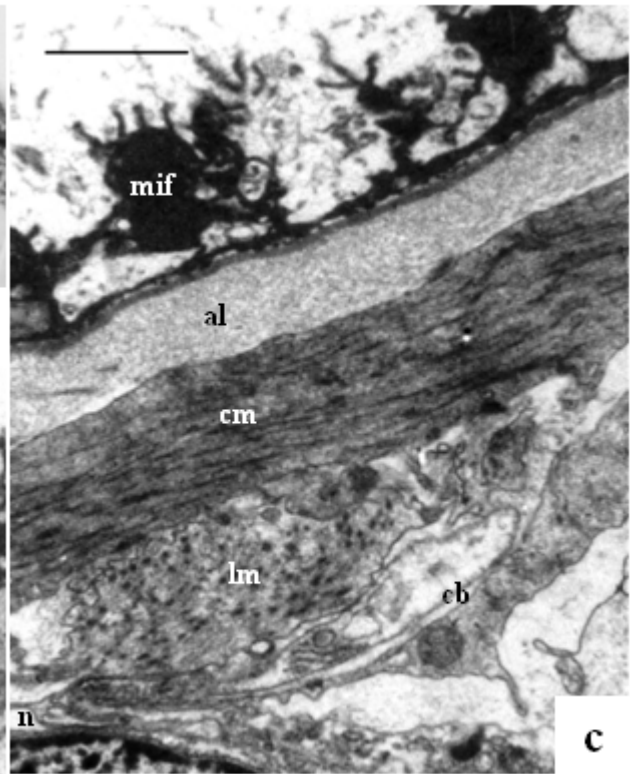
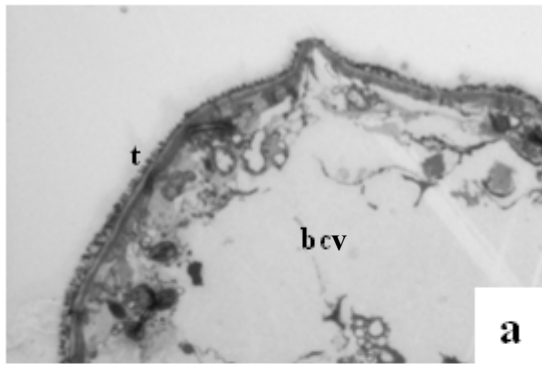


Figura 24: Região posterior do esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coleomaticum*. **a.** ML de corte semifino com um tegumento espesso e a cavidade do corpo sem larvas em desenvolvimento. Barra de escala = 7 μ m. **b.** MET da vista geral do corpo da larva mostrando a superfície externa com muitas dobras e figuras de mielina suportadas por uma nítida membrana trilaminar com invaginações cruzando as camadas amorfa e musculares e a presença de pontes citoplasmáticas e o corpo celular (cítion) com núcleo. Barra de escala = 2 μ m. **c** e **d.** MET do detalhe da camada externa com figuras de mielina, membrana, camadas amorfa, de músculos circulares e longitudinais e ponte citoplasmática conectando a camada externa com o corpo celular contendo um núcleo. Barra de escala = 1 μ m. **e.** MET do detalhe das figuras de mielina na superfície externa do tegumento. Barra de escala = 500nm. (t=tegumento; bcv=cavidade do corpo; al=camada amorfa; cm=camada de músculos circulares; lm= camada de músculos longitudinais; cb=ponte citoplasmática; mif=figura de mielina; in=invaginação; n=núcleo).



Os esporocistos expelidos foram todos observados em cortes transversais. A região anterior dos esporocistos de segunda geração mostrava características de degeneração de sua estrutura. As dobras na superfície externa do tegumento aumentaram em tamanho e as camadas musculares foram desorganizadas, sendo possível observar apenas as fibras musculares, mas sem diferenciá-las em circulares e longitudinais e organelas raramente foram vistas. As pontes citoplasmáticas e cíton, com núcleo, ainda estão presentes na camada interna do tegumento. Estas mudanças estruturais indicam uma redução, ou perda, da capacidade absorptiva nesta região do corpo da larva. Apesar disto, a atividade secretora foi mantida, a qual pode ser constatada pela presença de grânulos eletrondensos e formação de vesículas.

A região média do corpo do esporocisto estava dilatada e adquiriu uma coloração esbranquiçada quando os esporocistos expelidos eram expostos às condições atmosféricas. Esta região, denominada saco membranoso, é onde as cercárias estão concentradas. Jang (1969) atestou que quando os esporocistos são expelidos, a parede externa se destaca da parede interna e o endocisto se enovela e ocupa a região média, a qual fica com o seu diâmetro aumentado. Tang (1950) afirmou que quando o endocisto é formado, a parede externa do esporocisto morre, uma vez que nenhum movimento posterior foi observado. A região do saco membranoso observada no presente estudo mostrou um aspecto degenerado, com muitas estruturas membranosas sobrepostas formando lamelas e degeneração de membranas formando figuras de mielina. A estrutura lamelar do saco membranoso é, provavelmente, importante para reduzir a perda de água e desidratação da larva exposta às condições ambientais após sua emergência. A camada muscular estava degenerada e pode estar localizada próximo ou bem distante da superfície externa do saco membranoso. Atividades secretora e excretora parecem ainda ocorrer, uma vez que vesículas foram formadas na superfície do tegumento e a estrutura das células-flama estava mantida. A presença de organelas era rara e alguns vacúolos foram vistos próximos à região do endocisto, provavelmente originados do retículo endoplasmático.

O endocisto foi citado por Tang (1950) como uma parede interna do cisto. Pela primeira vez, foi possível observar que o endocisto não tem uma estrutura membranosa, mas é composta por um material fibrilar apoiado sobre uma espessa lâmina basal. Dentro do endocisto, estruturas membranosas e material amorfo foram observados. Estes componentes são provavelmente essenciais para prevenir danos mecânicos às cercárias empacotadas no endocisto quando expostas às condições externas e ingeridas pelo segundo hospedeiro intermediário.

A região posterior apresenta muitas figuras de mielina sobre a superfície externa do corpo da larva. De acordo com Tang (1950) a região posterior dos esporocistos expelidos se contrai empurrando as cercárias para o meio do corpo da larva. Provavelmente, quando esta região se contrai, a membrana se enovela, levando a formação das figuras de mielina. A observação de uma estrutura muscular bem preservada nesta região aponta para a manutenção da capacidade contrátil da região posterior do corpo do esporocisto. A atividade secretora não parece acontecer, mas a presença de invaginações indica a necessidade de processos absorptivos. Estas observações indicam que as regiões anterior e posterior dos esporocistos de segunda geração expelidos não morrem quando expostas ao ambiente externo diferentemente do que foi afirmado para *E. pancreaticum* por Tang (1950).

Pela primeira vez uma detalhada descrição da organização ultraestrutural dos esporocistos de primeira e de segunda geração de *E. coelomaticum* e as alterações que ocorreram ao longo de seu desenvolvimento larval foi feita. Segundo Ehlers (1985), novas informações sobre morfologia comparada baseada em microscopia de luz e eletrônica fornecem valiosas informações para a elucidação de relacionamentos filogenéticos. A

caracterização dos componentes do tegumento é uma ferramenta muito importante para estudos taxonômicos, uma vez que com a penetração no molusco hospedeiro, o miracídio elimina as placas epidérmicas ciliadas e um novo tegumento é formado, denominado **neoderme**. A presença de uma neoderme define o Grupo Neodermata, sendo uma auto-apomorfia do táxon que é passada aos seus descendentes para formar uma sinapomorfia dos Trematoda e Cercomeromorpha.

As características ultraestruturais da neoderme são uma ferramenta para o estudo dos Trematoda, sendo conservada nos estágios larvais intra-molusco. Além disto, a elucidação destes pontos da morfologia e ultraestrutura podem elucidar detalhes da interface larva de trematódeo/molusco hospedeiro e estar relacionados às mudanças fisiológicas que surgem no molusco parasitado. Dessa forma, o presente estudo abre novas perspectivas para o estudo de *E. coelomaticum* e outros Dicrocoeliidae amplamente distribuídos no mundo e com grande importância econômica e ecológica.

4.1.4 Cercárias

As cercárias foram divididas em dois grupos compostos por: (I) cercárias obtidas de esporocistos de segunda geração retirados de moluscos dissecados aos 82 aos 100 dias de infecção e (II) cercárias obtidas de esporocistos expelidos dos 79 aos 120 dias pós-exposição aos ovos de *E. coelomaticum* pelos moluscos *B. similaris* infectados.

As cercárias medidas foram obtidas de esporocistos de segunda geração obtidos de dissecações de moluscos aos 82 dias de infecção e cercárias obtidas de esporocistos expelidos pelos hospedeiros infectados. As medidas de dois grupos de cercárias foram apresentadas na Tabela 7. As medidas das cercárias obtidas de esporocistos oriundos de dissecações foram significativamente diferentes das medidas das cercárias obtidas de esporocistos expelidos. Os valores obtidos no segundo grupo de cercárias foram maiores do que os observados para o primeiro, mostrando que as cercárias crescem após sua expulsão pelo molusco hospedeiro. Somente a distância entre as ventosas, oral e ventral, foi reduzida nas cercárias dos esporocistos expelidos. No primeiro grupo a maior variação foi observada no comprimento da cauda (134,62%) e no segundo grupo a variação na distância entre as ventosas oral e ventral (153,91%) foi maior do que nos outros parâmetros.

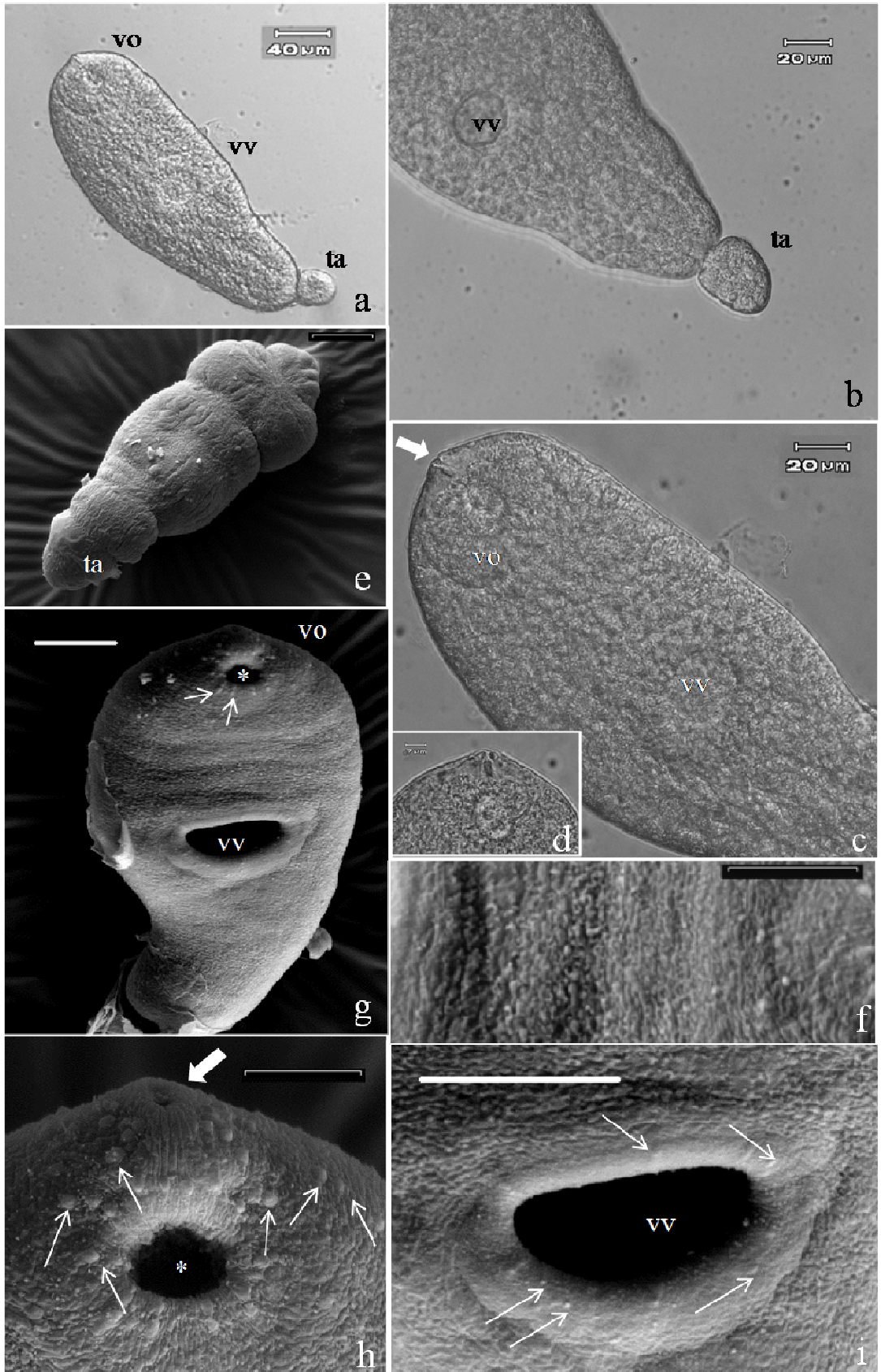
Sob ML, as cercárias apresentaram forma foliácea, dorsoventralmente achatada (Figura 25a) e uma pequena cauda não bifurcada, a qual representava a décima quinta parte do comprimento do corpo nas cercárias de esporocistos dissecados e a nona parte do comprimento do corpo nas cercárias de esporocistos expelidos, sendo mais larga do que longa e não exibem espinhos ou dobras tegumentares (*fin folds*) (Figura 25b). Esta característica morfológica define a cercária de *E. coelomaticum* como sendo do **tipo microcerca**.

Tabela 7: Medidas de cercárias de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de esporocistos de segunda geração dissecados e de esporocistos expelidos por *Bradybaena similaris* experimentalmente infectadas.

Medidas (μm)	Cercárias de esporocistos de segunda geração dissecados			Cercárias de esporocistos de segunda geração expelidos			Variação percentual (%)
	$X \pm SD$		N	$X \pm SD$		N	
Comprimento do corpo	250.17 ± 14.66^a	(230.03-274.41)	14	281.86 ± 16.05^b	(260.96-316.75)	34	+12.67
Largura do corpo	69.26 ± 4.37^a	(58.67-73.92)	14	154.83 ± 10.80^b	(104.72-165.62)	42	+123.55
OS diâmetro	44.72 ± 9.02^a	(36.82-73.17)	13	76.02 ± 10.16^b	(46.27-88.60)	35	+69.99
VS diâmetro	47.70 ± 6.48^a	(33.87-56.76)	12	92.75 ± 6.97^b	(77.84-116.32)	58	+94.44
OS-VS distância	63.61 ± 12.47^a	(38.08-79.52)	14	26.80 ± 7.67^b	(16.86-42.81)	27	-57.87
Diâmetro da cauda	16.00 ± 3.34^a	(9.56-22.43)	15	30.89 ± 3.96^b	(23.67-41.05)	55	+93.06

OS=ventosa oral; VS=ventosa ventral. () Números entre parênteses representam os valores mínimo e máximo observados. $X \pm SD$ =média \pm desvio-padrão. N=número de cercárias medidas. ^{a,b}=Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha foram comparadas e diferem entre si significativamente ($\alpha=5\%$).

Figura 25: Cercária de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Vista geral de uma cercária mostrando o corpo com a ventosa oral (vo) na extremidade anterior e uma ventosa ventral (vv) na região média do corpo, e a cauda (ta) na extremidade posterior (ML). **b.** Detalhe da cauda (ta), mostrando a ausência de dobras tegumentares ou espinhos (ML). **c.** ML de uma cercária mostrando a abertura da pequena cavidade (seta larga) anterior das glândulas de penetração, e as ventosas oral (vo) e ventral (vv). **d.** Detalhe da abertura da pequena cavidade das glândulas de penetração (ML). Barra de escala = 7 μ m. **e.** Vista dorsal de uma cercária mostrando o tegumento irregular com dobras e a cauda (ta) na extremidade posterior. Barra de escala=20 μ m (MEV). **f.** Detalhe da superfície externa do tegumento na região entre as ventosas (MEV). Barra de escala=10 μ m. **g.** MEV de uma região ventral de uma cercária, mostrando a ventosa oral (vo) com a abertura oral no centro (asterístico) e papilas (setas estreitas), e ventosa ventral (vv). Barra de escala=20 μ m. **h.** Detalhe da extremidade anterior com a ventosa oral (vo), e a abertura oral (asterístico), rodeadas por papilas (setas estreitas), e a abertura da pequena cavidade das glândulas de penetração (seta larga) (MEV). Barra de escala=10 μ m. **i.** MEV da ventosa ventral (vv) mostrando as poucas papilas. Barra de escala=20 μ m.

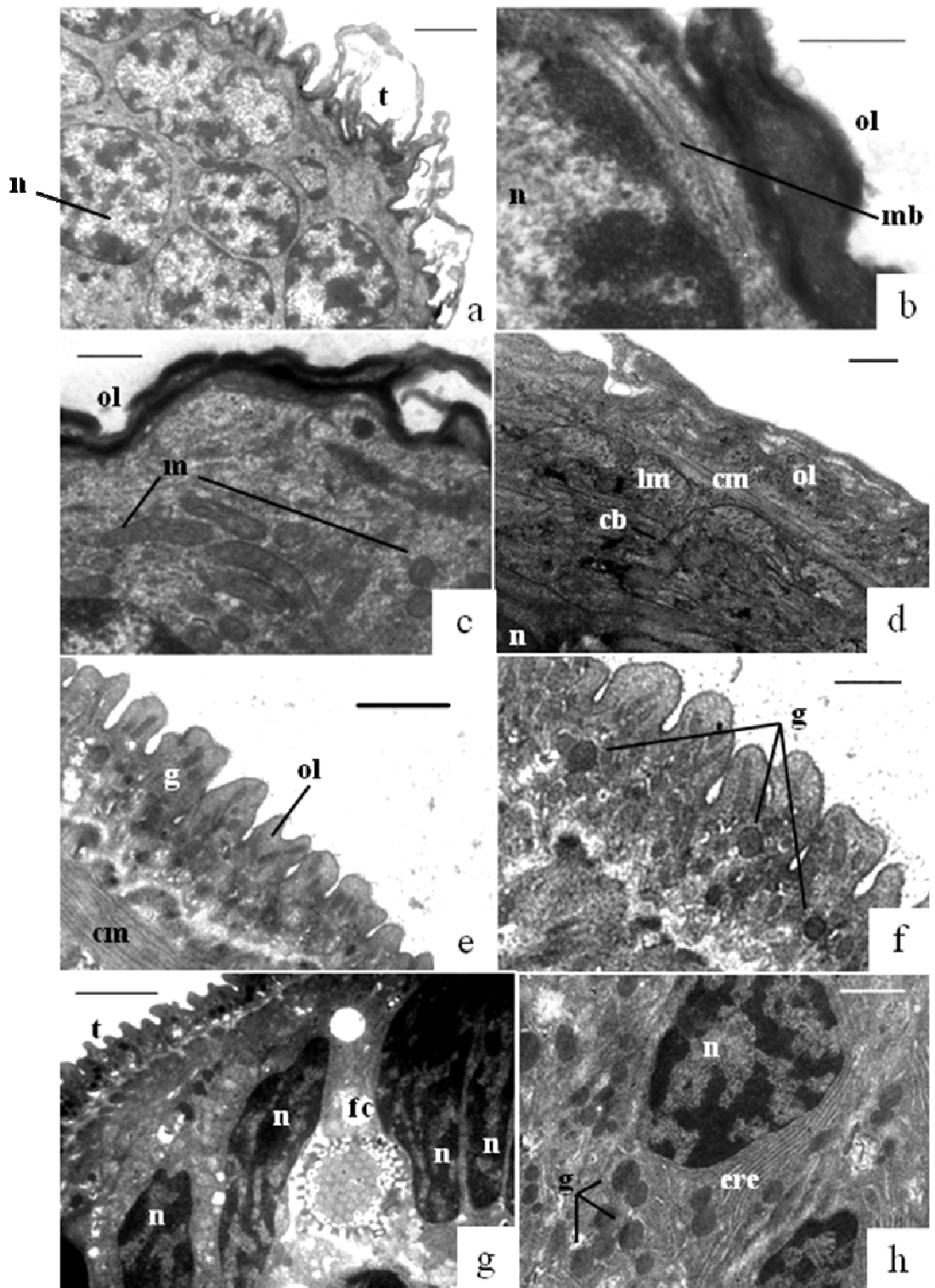


O tegumento era irregular, apresentando muitas dobras na região dorsal com um aspecto corrugado (Figura 25e). Na face ventral, o tegumento era mais irregular com muitas dobras arrançadas longitudinal e transversalmente, formando pequenas estruturas semelhantes a nós na região entre as ventosas (Figura 25f), e estas estruturas eram esparsamente distribuídas da ventosa ventral até a extremidade posterior do corpo (Figura 25g). Na região anterior do corpo havia uma abertura oral no centro de uma ventosa oral muscular em posição sub-terminal com muitas papilas (Figura 25h), mas na borda da ventosa ventral há discretas papilas (Figura 25i). Acima e atrás da ventosa oral há uma abertura de uma pequena cavidade onde se abrem as glândulas de penetração (Figura 25c, d). Os dutos das glândulas de penetração correm na metade anterior do corpo lateralmente e a região celular destas glândulas foi localizada próximo à ventosa ventral (Figura 26a). Foi possível distinguir outro grupo de dutos de glândulas de penetração, denominadas glândulas pré-acetabulares, os quais correm na metade anterior central do corpo, estando a região celular situada acima da ventosa ventral (Figura 26b). Exatamente abaixo da ventosa oral, localiza-se uma pequena faringe muscular (Figura 26c) a qual media $15,6 \pm 1,0\mu\text{m}$ de comprimento e $13,3 \pm 1,1\mu\text{m}$ de largura. A vesícula excretora era de forma tubular com paredes espessas medindo $45,0 \pm 7,81\mu\text{m}$ ($36-50\mu\text{m}$) no comprimento e $21,9 \pm 2,01\mu\text{m}$ ($20-24\mu\text{m}$) de largura e recebe de cada lado, um duto coletor em sua região anterior (Figura 26d, e). Os túbulos excretores se dividem em ramificações, as quais terminam em uma célula-flama (Figura 26f). Na extremidade posterior da vesícula excretora há um canal excretor (Figura 26g).

O tegumento da cercária de *E. coelomaticum* apresentou uma superfície frouxamente aderida ao corpo da larva através de uma membrana muito eletrondensa, sendo destacada da parede do corpo em algumas regiões (Figura 27a, b), resultando em uma superfície irregular, não lisa, como observada por MEV e MET. Abaixo da superfície externa do corpo da cercária há muitos perfis mitocondriais (Figura 27c), seguidas pelos núcleos (Figura 27a). Na região externa, foi possível observar uma camada de músculos circulares, seguida por uma camada de músculos longitudinais; as pontes citoplasmáticas através das camadas musculares foram vistas de forma discreta (Figura 27d). A superfície do corpo das cercárias apresentou muitas dobras no tegumento com grânulos secretores nestas dobras e nas regiões mais internas (Figura 27e, f). As células-flama, as quais compõem o sistema excretor protonefridial, foram vistas na periferia do corpo a $3,96\mu\text{m}$ da superfície externa, com as projeções citoplasmáticas internas e externas e os cílios na região central (Figura 27g). As células somáticas dentro das cercárias, localizadas mais internamente, tinham núcleos evidentes, citoplasma com aspecto granular, retículo endoplasmático bem desenvolvido e grânulos secretores (Figura 27h).

Figura 26: Microscopia de luz de cercária de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Corpo da cercária, mostrando os ductos laterais (ld) das glândulas de penetração (gp). **b.** Região anterior de uma cercária mostrando os ductos centrais (cd) das glândulas pré-actabulares (pg) e os ductos laterais (ld) das glândulas de penetração. **c.** Região anterior do corpo da cercária mostrando a abertura oral (asterístico) no centro da ventosa oral (vo) seguida pela faringe muscular (pm). **d.** Cercária mostrando na região posterior do corpo, a vesícula secretora (sv) e o tubo coletor lateral (et). **e.** Detalhe da vesícula secretora (sv). **f.** Detalhe da vesícula secretora (sv) com duas células-flama (fc). **g.** Cercária com vesícula excretora e um canal excretor terminal (ec).

Figura 27: MET de cercária de *Eurytrema coelomaticum*. **a.** Vista geral de uma região do tegumento (t) frouxamente aderida ao corpo da cercária e o núcleo (n) dentro do corpo. Barra de escala=2 μ m. **b.** Detalhe da camada externa do tegumento mostrando uma membrana celular (mb) e núcleo (n) de uma célula somática. Barra de escala=500nm. **c.** Detalhe da camada sincicial externa (ol) do tegumento com muitos perfis mitocondriais (m). Barra de escala=500nm. **d.** Corte ultra-fino de uma outra região do corpo cercarial mostrando a camada externa (ol), seguida por uma camada de músculos circulares (cm) e uma camada de músculos longitudinais (lm); uma discreta ponte citoplasmática (cb) está conectando a camada externa ao corpo celular onde o núcleo (n) está localizado. Barra de escala=500nm. **e.** Camada externa do tegumento (ol) com intensa atividade mostrando a formação e liberação de grânulos (g). cm=músculos circulares. Barra de escala=1 μ m. **f.** Detalhe da formação e liberação de grânulos (g) na camada externa do tegumento. Barra de escala=500nm. **g.** Secção da periferia do corpo da cercária mostrando uma célula-flama (fc) com os cílios centrais, e as projeções citoplasmáticas internas e externas. Barra de escala=2 μ m. **h.** Região interna com as células somáticas, com seus núcleos (n), um retículo endoplasmático (ere) bem desenvolvido e muitos grânulos (g). Barra de escala=1 μ m.



Apesar da formação do saco membranoso na região central dos esporocistos expelidos, causando o enovelamento do endocisto, as cercárias obtidas destes esporocistos são maiores do que aquelas dos esporocistos dissecados. Todos os parâmetros medidos foram maiores do que no primeiro grupo de cercárias, exceto a distância entre as ventosas. Isto pode ser explicado pelo maior crescimento das ventosas do que do comprimento do corpo. Enquanto as ventosas oral e ventral aumentaram 69,99% e 94,44%, respectivamente, o comprimento do corpo aumentou apenas 12,67%. Tang & Tang (1977) registraram dados morfométricos de cercárias de *E. coelomaticum* na China com 230-370µm em comprimento e 112-140µm de largura. As cercárias medidas no presente estudo apresentaram maior largura do que aquelas medidas por Tang & Tang (1977); estes autores estudaram larvas obtidas de *B. similis* e *C. ravidia sieboldiana*, mas quando apresentaram seus resultados, eles não separaram os resultados por espécie de molusco hospedeiro. Então, não foi possível saber se as medidas de cercárias apresentadas pelos autores vieram do mesmo hospedeiro utilizado no presente estudo. A mesma diferença foi observada no diâmetro das ventosas oral e ventral, as quais foram maiores nas larvas do presente estudo do que aquelas de Tang & Tang (1977). Não sendo possível qualquer inferência sobre a influência do hospedeiro sobre as medidas apresentadas.

Apesar da cauda não ter sido mencionada na breve descrição das cercárias de *E. coelomaticum* por Tang & Tang (1977), quando o compara-se o desenho do artigo destes autores com o demonstrado por Tang (1950) para *E. pancreaticum* fica claro a semelhança morfológica desta estrutura, onde em ambas espécies a cauda é mostrada como uma estrutura espinhosa. Também, Tang (1950) atestou a presença de uma “pequena bolsa anterior contendo um estilete” em cercárias de *E. pancreaticum*. Outra vez, Tang & Tang (1977) não citaram esta estrutura, mas ela é representada em desenhos de cercárias de *E. coelomaticum*. No presente estudo, esta pequena bolsa foi observada por ML na extremidade anterior, acima e atrás da ventosa oral, e sua abertura foi vista por MEV, mas nenhum estilete foi visualizado. Tal bolsa corresponde a região de abertura dos ductos das glândulas de penetração.

Dois grupos de glândulas de penetração foram observados no presente estudo e estas características e localização estão de acordo com aquelas apresentadas por Tang & Tang (1977). Cavalcanti et al. (2009), usando MET, observaram lipídios insaturados de forma globular e proteínas básicas nas glândulas de penetração das cercárias de *S. mansoni*.

Cousin et al. (1995) e Zdárská (1991) observaram papilas uniciliadas desembainhadas e uma estrutura tegumentar encapsulada na ventosa ventral de cercárias de *S. mansoni*. Pela primeira vez, as papilas da ventosa oral foram observadas. Em estudos prévios sobre morfologia de espécies de *Eurytrema* sp. não havia informações sobre papilas na região da ventosa oral. De forma contrária, o acetábulo apresenta poucas e discretas papilas nunca citadas antes.

Tang (1950) observou um tegumento espinhoso na região anterior ventral da cercária de *E. pancreaticum*. Todas as nossas observações não revelaram a presença de espinhos no tegumento de cercárias de *E. coelomaticum*. Ao invés disso, o tegumento apresentou dobras, as quais se tornaram menos conspícuas na metade posterior do corpo.

A vesícula excretora era similar àquela citada por Tang & Tang (1977) para cercárias de *E. coelomaticum*, mas a posição da larva não permitiu observar a estrutura completa do sistema. Foi possível observar a forma tubular da vesícula, um duto coletor e duas células-flama posteriores em uma ramificação. Desta vez, a morfologia do sistema excretor observada é semelhante àquela mostrada por Tang & Tang (1977) para *E. coelomaticum* e difere dos desenhos de Tang (1950) para cercária de *E. pancreaticum*.

A superfície da cercária apresentou características ultraestruturais variadas dependendo da região observada. O tegumento tinha uma camada externa muito eletrondensa frouxamente presa ao corpo da larva que é visto destacado em algumas regiões, abaixo desta região há uma camada amorfa com perfis mitocondriais, grânulos e os núcleos. Mas nas observações de outros cortes, é possível observar a camada sincicial externa, as camadas de músculos circulares e longitudinais conectadas ao corpo celular por pontes citoplasmáticas. Dorsey & Cousin (1995) encontraram em cercárias de *S. mansoni*, um agregado de células subtegumentares em uma pequena área dorsoanterior do corpo, designada cíton II. As observações destes autores corroboram a variação na organização ultraestrutural, quando secções ultrafinas de diferentes regiões do corpo da cercária foram observadas no presente estudo.

A organização da parede do corpo de cercárias de *E. coelomaticum* segue o modelo conhecido para outras espécies de trematódeos, larvas e adultos (CAVALCANTI et al., 2009; PINHEIRO et al., 2005; 2004a e b; DORSEY et al., 2002; MOHAMED, 1992; MUELEMAN et al., 1980).

A presença de perfis mitocondriais e grande quantidade de grânulos secretores na camada sincicial externa do tegumento de cercárias de *E. coelomaticum* permitem sugerir que ela é fisiologicamente ativa. As regiões com a separação da camada externa do tegumento e grânulos secretores na camada sincicial podem refletir uma preparação para o processo de encistamento e formação da metacercária. De acordo com Ueta (1980), as cercárias de *F. hepatica* estão viáveis quando as glândulas cistogênicas estão pareadas mostrando a ocorrência de um processo prévio de preparação para o encistamento e formação da metacercária, corroborando com os resultados apresentados.

Diferente de outros estágios larvais anteriores no ciclo de vida, nas cercárias a multiplicação assexuada não ocorre. Dessa forma, as células germinativas não estão presentes nesta larva; as células somáticas observadas exibem uma intensa atividade metabólica, a qual é comprovada pela observação de um retículo endoplasmático bem desenvolvido, envolvido nos processos plásticos responsáveis pelo crescimento e maturação das cercárias e formação do estágio adulto.

O presente estudo apresenta novas informações sobre a morfologia de cercárias de *E. coelomaticum* em dois momentos diferentes de seu desenvolvimento, e pela primeira vez detalhes deste estágio larval foram mostrados utilizando ML, MEV e MET. O trabalho também elucida algumas das confusões existentes na taxonomia de *E. coelomaticum*, sendo uma importante ferramenta para a correta classificação deste trematódeo digenético, usando técnicas simples, e abre novas possibilidades para estudos mais detalhados deste e de outros estágios do desenvolvimento larval intra-molusco de *E. coelomaticum*.

4.2 Alterações fisiológicas em *Bradybaena similaris* infectada com *Eurytrema coelomaticum*

4.2.1 Determinação do conteúdo de proteínas totais e produtos nitrogenados de excreção – Amônio (NH₄) - na hemolinfa de *Bradybaena similaris* infectada com *Eurytrema coelomaticum*

Aos 30 dias de infecção, o conteúdo de proteínas totais de *B. similaris* variou de 61,7 ± 3,07mg/dl para 87,6 ± 5,66 mg/dl, quando comparado ao grupo controle, correspondendo a um aumento de 42% (Tabela 8). Aos 60 dias de infecção, houve um aumento expressivo, passando de 55,45 ± 2,24mg/dl para 108,23 ± 14,25mg/dl, ou seja, um acréscimo de 95%. O

conteúdo de proteínas totais continuou a aumentar aos 82 dias de infecção, correspondendo a +543% a/em relação ao grupo controle do mesmo período, porém esses valores tiveram uma queda substancial aos 100 dias de infecção, passando de $123,35 \pm 13,36$ mg/dl para $25,48 \pm 1,31$ mg/dl, quando comparados os grupos controle e infectado.

A média do conteúdo de proteínas totais na hemolinfa do grupo controle de *B. similaris*, durante todo o período de realização do estudo, foi de $66,66 \pm 40,85$ mg/dl. Somente entre os 30 e 60 dias de infecção não houve diferença significativa entre os valores obtidos para os grupos, controle e infectado. A comparação entre os outros períodos apresentou valores que variaram em relação à média obtida para o grupo controle, como também entre si, como pode ser observado na Figura 28.

Tabela 8: Variação no conteúdo de proteínas totais, expresso em mg/dl, na hemolinfa de *Bradybaena similaris* em função do tempo de infecção, em dias, com *Eurytrema coelomaticum*. (X \pm SD) média \pm desvio padrão.

Tempo (dias)	Conteúdo de Proteínas Totais (mg/dl)	
	Grupo Controle	Grupo Infectado
	X \pm SD	X \pm SD
30	$61,7 \pm 3,07^{A**a*}$	$87,6 \pm 5,66^b$
60	$55,45 \pm 2,24^A a$	$108,23 \pm 14,25^b$
82	$26,15 \pm 5,3^B a$	$141,9 \pm 3,81^b$
100	$123,35 \pm 13,36^{B,C a}$	$25,48 \pm 1,31^b$

*Médias da mesma linha seguidas por letras distintas diferem entre si ($\alpha = 5\%$).

**Médias da mesma coluna seguidas por letras distintas diferem entre si ($\alpha = 5\%$).

Em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*, Becker (1980) observou uma significativa redução no conteúdo de proteínas na hemolinfa do molusco hospedeiro, demonstrando a influência da infecção pelos estágios larvais do trematódeo sobre o conteúdo de proteínas na hemolinfa. Porém, Anteson & Williams (1975) demonstraram que essa depleção das proteínas é seletiva. Stanislawsky & Becker (1979) observaram que a taxa de produção de parasitos é mais elevada em moluscos alimentados com uma dieta rica em proteínas. Neste mesmo modelo de estudo, Lee & Cheng (1972) observaram uma redução de 1,42 para 0,96 mg/dl de proteínas totais na hemolinfa dos moluscos infectados. Gress & Cheng (1973) observaram uma concentração de proteínas totais na hemolinfa de *B. glabrata* igual a 2,71 mg/dl, o qual se manteve nesta faixa até os 15 dias de infecção com *S. mansoni*, decrescendo daí em diante.

Loker & Hertel (1987), realizaram estudos sobre as alterações induzidas por equistossomatídeos no conteúdo de proteínas em seu molusco hospedeiro. Segundo estes autores, a infecção de *B. glabrata* das linhagens, M line e 10R2, responderam de forma diferente à infecção com *E. paraensei*. Na primeira linhagem, o conteúdo de proteínas na hemolinfa do molusco aumentou a partir do segundo dia de infecção, enquanto que na linhagem 10R2, o conteúdo de proteínas foi reduzido significativamente a partir do oitavo dia de infecção.

Segundo Pinheiro et al. (1996), em *B. similaris*, o jejum pode provocar um esgotamento das reservas glicocídicas e de galactogênio. Lira et al. (2000) observaram um aumento na concentração da proteína total na hemolinfa de *B. similaris* aos 10 dias de jejum, observando um valor 198% superior ao observado nos moluscos alimentados e alternando para valores próximos ao do grupo controle ao final do período de jejum analisado (30 dias). Esses autores propuseram que o conteúdo de proteína total na hemolinfa de *B. similaris* apresentados aos 10 dias de jejum seria uma resposta às alterações fisiológicas do molusco decorrentes das lesões nos seus tecidos causadas pela inanição.

Pinheiro et al. (2009) observaram que o conteúdo de proteínas totais na hemolinfa de *L. columella* variou de forma muito significativa ao longo do período de infecção com *E. paraensei* estudado, obtendo variações significativas aos 20 dias de infecção, quando foram observados valores 53,22% abaixo daquele obtido com os moluscos não infectados (grupo controle). Porém, a maior alteração foi encontrada ao final dos 30 dias de infecção, quando o conteúdo de proteínas totais na hemolinfa foi de 24,38mg/dl, o que representou uma redução de 80,01% em relação ao grupo controle. Demonstrando haver uma forte relação negativa entre o conteúdo de proteínas totais na hemolinfa de *L. columella* e o tempo de infecção com *E. paraensei* ($r^3=0,98$).

O conteúdo de proteínas totais de *B. similaris* infectada por *E. coelomaticum*, verificado no presente estudo, também demonstrou uma variação muito significativa, especialmente no início do período de infecção, porém não mostrou-se constante com tendência a decrescer ao longo do período analisado, conforme a maioria dos estudos supracitados. Pelo contrário, demonstrou uma tendência ao aumento no conteúdo das proteínas totais quando analisada a relação entre esses níveis e o tempo de infecção, corroborando apenas com o trabalho de Loker & Hertel (1987), que também registraram aumento nesses níveis para *B. glabrata* infectada por *E. paraensei*. Porém, quando analisado o final do período pré-patente, onde a redução ocorre de forma mais acentuada, assemelha-se à maioria dos estudos já realizados.

O intenso processo de multiplicação observado ao longo do seu desenvolvimento larval intra-molusco dos trematódeos digenéticos requer o fornecimento de grande quantidade de energia, a qual pode ser obtida dos carboidratos ou de outros substratos, como os aminoácidos. Além disso, este processo requer os blocos de construção para a síntese das estruturas larvais em formação, principalmente as proteínas necessárias devido à intensa síntese de membranas que ocorre. Desta forma, é de se esperar que o conteúdo de proteínas do hospedeiro seja reduzido devido a retirada feita pelas larvas em desenvolvimento. Lira et al. (2000) observaram que naqueles modelos onde uma elevação na concentração de proteínas ocorre como foi o observado no presente estudo, deve haver a lise dos tecidos e a liberação do seu conteúdo protéico da célula na hemolinfa do molusco. Porém, nas observações histológicas realizadas por Pinheiro (2003) não foram observados sinais de lise celular na glândula digestiva de *L. columella* infectada com *E. paraensei*.

A concentração de amônio aos 30 dias de infecção foi de $0,74 \pm 0,06$ mM para o grupo controle, passando para $4,75 \pm 0,07$ mM para o grupo infectado, o que correspondeu a um aumento de 541,89% (Tabela 9). Aos 60 dias não houve uma diferença significativa entre o conteúdo de amônio dos grupos controle e infectado. Porém, nos períodos seguintes, houve uma tendência a decrescer, apresentando valores de redução de 95,6% e 85,6%, aos 82 e 100 dias de infecção, quando comparados os dois grupos.

Ao longo do período de infecção estudado, a média do conteúdo de amônio na hemolinfa dos moluscos pertencentes ao grupo controle foi de $3,68 \pm 4,22$ mM de NH_4^+ . Esse conteúdo apresentou uma variação bastante significativa ao longo do período de estudo,

exceto para o período dos 60 dias de infecção, quando comparados os grupos controle e infectado (Figura 29).

Tabela 9: Variação na concentração de amônio (NH_4^+) na hemolinfa de *Bradybaena similaris* em função do tempo de infecção, em dias, com *Eurytrema coelomaticum*. $X \pm \text{SD}$ =média \pm desvio padrão.

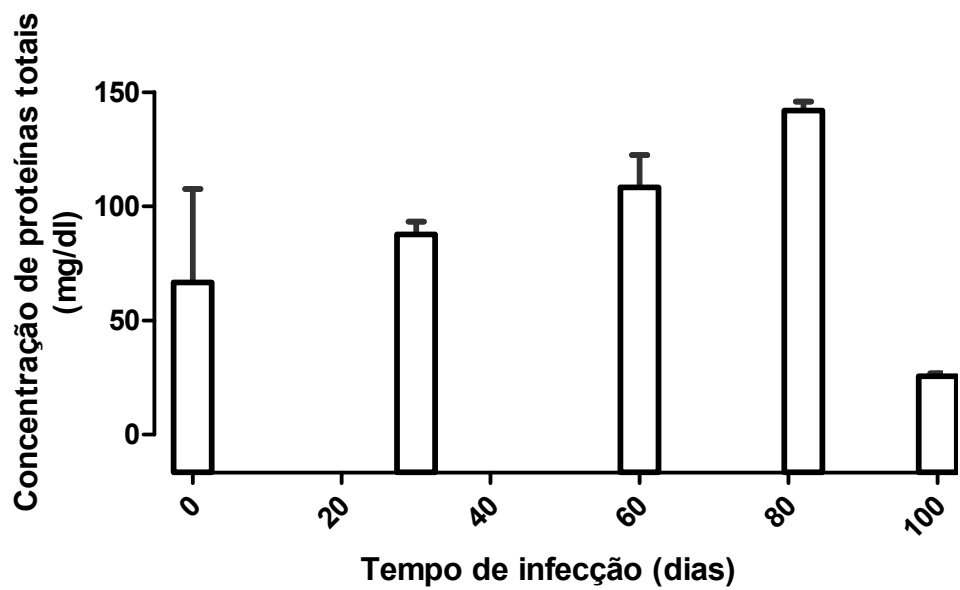
Tempo (dias)	Concentração de Amônio (mM)	
	Grupo Controle $X \pm \text{SD}$	Grupo Infectado $X \pm \text{SD}$
30	$0,74 \pm 0,06^{\text{aA}}$	$4,75 \pm 0,07^{\text{b}}$
60	$3,84 \pm 0,32^{\text{cB}}$	$2,15 \pm 0,85^{\text{c}}$
82	$9,55 \pm 0,07^{\text{aC}}$	$0,42 \pm 0,03^{\text{b}}$
100	$1,25 \pm 0,07^{\text{aA}}$	$0,18 \pm 0,04^{\text{b}}$
Média	3,68	1,87

*Médias da mesma linha seguidas por letras distintas diferem entre si ($\alpha = 5\%$).

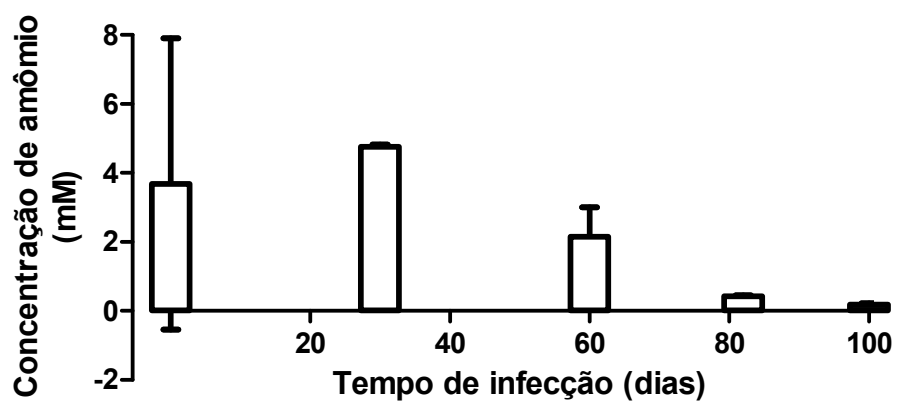
**Médias da mesma coluna seguidas por letras distintas diferem entre si ($\alpha = 5\%$).

Figura 28: Variação no conteúdo de proteínas totais (mg/dl) na hemolinfa de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada com *Eurytrema coelomaticum* em função do tempo de infecção (dias).

Figura 29: Variação no conteúdo de amônio (NH_4^+) (mM) na hemolinfa de *Bradybaena similaris* experimentalmente infectada com *Eurytrema coelomaticum* em função do tempo de infecção (dias).



28



29

Pinheiro et al. (2009) realizaram estudo sobre o conteúdo de amônio na hemolinfa e na glândula digestiva de *L. columella* infectada com *E. paraensei*, porém os autores não detectaram a presença de amônia (N-NH₄) em nenhum dos dois sítios que analisados.

No presente estudo foi detectado a presença de amônio na hemolinfa de *B. similaris* infectada experimentalmente com *E. coelomaticum*. Contudo, estes valores obtidos foram muito baixos quando comparados aos registrados por Lira et al. (2000) para o mesmo molusco, mas sob condições de jejum que causa danos muito mais severos/agressivos e a curto prazo à fisiologia do molusco. Mesmo sendo baixos os valores revelam uma relação extremamente significativa entre o grupo controle e infectado nos períodos de 30 e 82 dias, quando houve primeiramente um aumento e posteriormente um decréscimo no conteúdo de amônio na hemolinfa dos moluscos infectados, apresentando uma tendência ao decréscimo após o período de aumento. A redução no conteúdo desse produto de degradação também foi registrada por Lira et al. (2000) ao final do período estudado pelos autores que corresponderia, possivelmente, ao final do período infectivo do presente estudo.

Segundo Becker & Schmale (1975), a quantidade de produtos nitrogenados de degradação é uma indicação da atividade do metabolismo de proteínas e de ácidos nucleicos do animal. Uma situação de estresse, como o aumento da taxa reprodutiva do molusco, o parasitismo, a dessecação e a inanição, pode levar a uma aceleração do metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos. Becker & Schmale (1978) observaram que em *B. glabrata*, submetida à inanição e à dessecação, a concentração de amônia não sofreu alteração, enquanto a concentração de uréia aumentou significativamente. Becker (1983) observou um aumento de até 218,96% na concentração de ácido úrico em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni* e sob inanição, porém este só pode ser detectado na região do rim. Estes resultados sugerem que um mecanismo de detoxificação do molusco através da aceleração da atividade catalítica das enzimas do ciclo da uréia ocorra nestas situações de estresse.

Os resultados obtidos com a avaliação do conteúdo de amônio na hemolinfa de *B. similaris*, em diferentes períodos de infecção, demonstram que há uma influência do tempo de infecção sobre o conteúdo deste produto nitrogenado na hemolinfa do molusco, demonstrando uma diminuição do mesmo, levando à conclusão de que o molusco infectado realiza a eliminação de amônia, diferente do que foi observado em registros anteriores.

Os valores obtidos, no presente estudo, tanto para dosagem do conteúdo de proteínas totais, quanto de amônio na hemolinfa de *B. similaris* infectada por *E. coelomaticum* e do grupo controle, podem ter sido influenciados pelo fato de que os moluscos utilizados no experimento foram coletados em épocas diferentes do ano (estações variadas), o que poderia acarretar em alterações fisiológicas que contribuiriam na variação dos resultados obtidos em comparação aos estudos anteriores.

É importante destacar que, o presente estudo constitui o primeiro registro do conteúdo de proteínas totais e amônio na hemolinfa de *B. similaris* experimentalmente infectada com *E. coelomaticum*, constituindo importante subsídio para estudos da fisiologia do hospedeiro, servindo como base, inclusive para medidas de controle da euritrematose bovina.

4.2.2 Atividade de aminotransferases na hemolinfa de *Bradybaena similaris* infectada com *Eurytrema coelomaticum*

As alterações das aminotransferases, também chamadas de transaminases, foram observadas através da dosagem da AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e gama GT (gama glutamiltransferase).

A média da atividade da AST no grupo controle foi de $40,833 \pm 4,963$ URF/mL (Tabela 10). Em comparação ao grupo controle, a atividade demonstrou uma redução de 70,61% aos 30 dias de infecção, passando para $12,000 \pm 0,577$ URF/mL. Aos 60 dias e 90 dias, houve uma redução 61,43% e 16,12%, respectivamente. Porém, os valores somente foram significativamente diferentes, quando os grupos, controle e infectado, foram comparados aos 30 e 60 dias de infecção. Não sendo observada diferença significativa na atividade da AST aos 90 dias de infecção e nem quando os períodos de infecção foram comparados entre si.

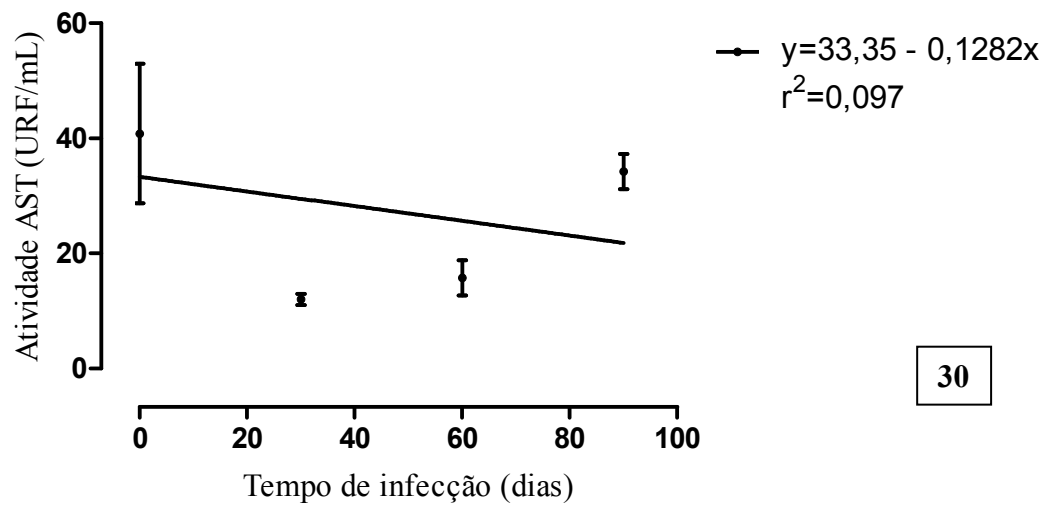
O teste de regressão polinomial mostrou uma relação negativa pouco significativa ($r^2=0,097$) entre o tempo de infecção por *E. coelomaticum* e a atividade da AST na hemolinfa de *B. similaris* (Figuras 30 e 31).

Tabela 10: Variação na atividade AST (aspartato aminotransferase) na hemolinfa de *Bradybaena similaris* em função do tempo de infecção, em dias, com *Eurytrema coelomaticum*. N=Número de repetições feitas em cada dosagem; $X \pm SD$ =média e desvio padrão.

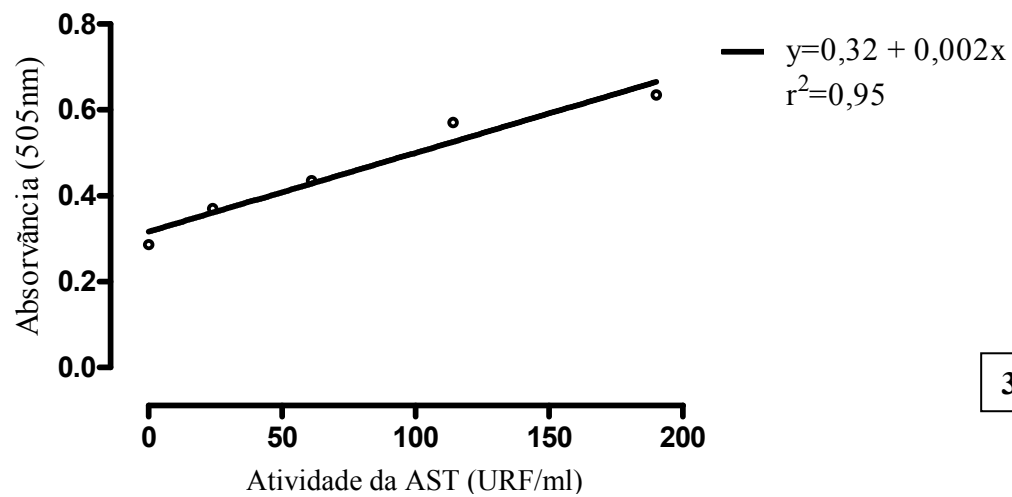
Período de Infecção (dias)	N	Atividade AST (URF/mL) X \pm SD
0	6	$40,833 \pm 4,963^a$
30	3	$12,000 \pm 0,577^{b,c}$
60	3	$15,750 \pm 1,750^{b,c}$
90	3	$34,250 \pm 1,750^{a,c}$

*Médias da mesma coluna seguidas por letras distintas diferem entre si ($\alpha = 5\%$).

Figuras 30 e 31: Relação entre o tempo de infecção (dias) com *Eurytrema coelomaticum* e a atividade da AST (aspartato aminotransferase) (URF/ml) na hemolinfa de *Bradybaena similaris*.



30



31

A atividade da ALT foi, em média, $37,213 \pm 3,786$ URF/mL na hemolinfa de *B. similaris* do grupo controle e de $37,950 \pm 6,750$ URF/mL aos 30 dias de infecção; $24,000 \pm 2,309$ URF/mL e $17,033 \pm 1,424$ URF/mL, aos 60 e 90 dias de infecção, respectivamente (Tabela 11). Foi possível observar uma redução na atividade ALT, de 54,23%, quando se comparou a média do grupo controle com os 90 dias de infecção. Não houve diferença significativa na atividade da ALT entre a média do grupo controle e os grupos com 30 e 60 dias de infecção, porém o valor observado foi significativamente diferente aos 90 dias de infecção. Quando os períodos de infecção foram comparados entre si, não houve diferença significativa nos valores da atividade ALT.

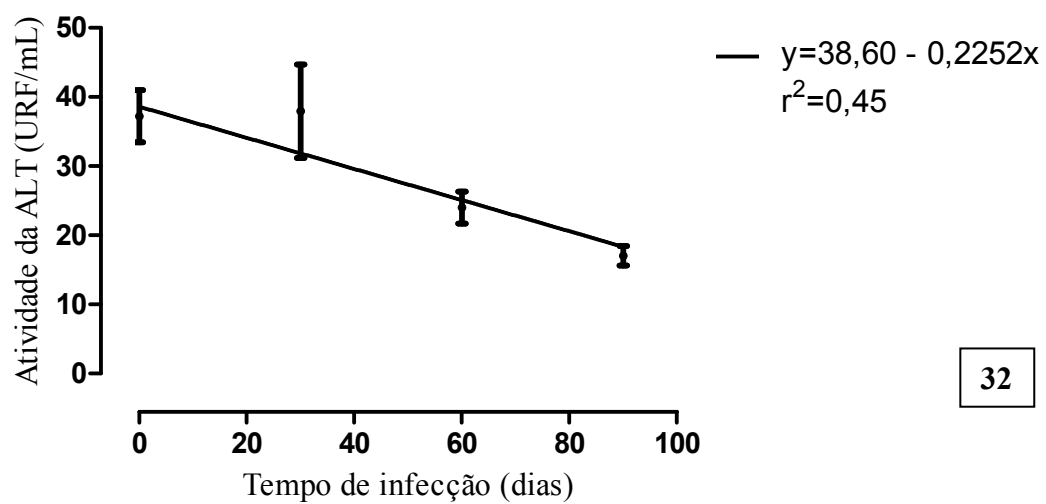
O teste de regressão polinomial mostrou uma relação negativa entre o tempo de infecção por *E. coelomaticum* e a atividade da ALT na hemolinfa de *B. similaris*, mas essa relação não foi muito significativa ($r^2=0,45$), como pode ser observado na Figuras 32 e 33.

Tabela 11: Variação na atividade ALT (alanina aminotransferase) na hemolinfa de *Bradybaena similaris* em função do tempo de infecção em dias, com *Eurytrema coelomaticum*. N=Número de repetições feitas em cada dosagem; $X \pm SD$ =média e desvio padrão.

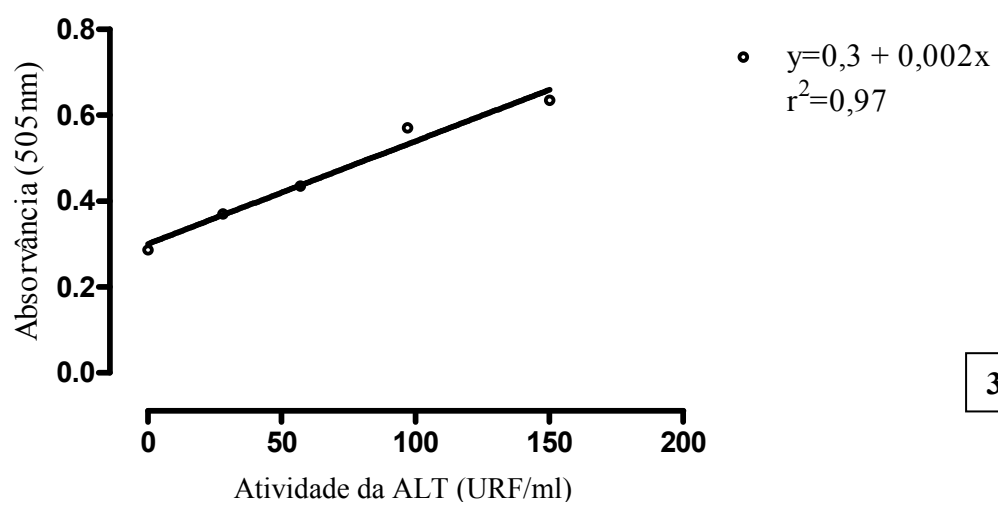
Período de Infecção (dias)	N	Atividade ALT (URF/mL)
		$X \pm SD$
0	8	$37,213 \pm 3,786^a$
30	3	$37,950 \pm 6,750^{a,c}$
60	3	$24,000 \pm 2,309^{a,c}$
90	3	$17,033 \pm 1,424^{b,c}$

*Médias da mesma coluna seguidas por letras distintas diferem entre si ($\alpha = 5\%$).

Figuras 32 e 33: Relação entre o tempo de infecção (dias) com *Eurytrema coelomaticum* e a atividade da ALT (alanina aminotransferase) (URF/ml) na hemolinfa de *Bradybaena similaris*.



32



33

A Tabela 12 apresenta os valores obtidos para atividade γ GT. O valor médio do grupo controle foi de $11,120 \pm 2,998$ UI/L. E, como pode ser observado, esse valor foi reduzido, quando comparado aos períodos de infecção, atingindo $7,2975 \pm 1,043$ UI/L, $3,1275 \pm 1,433$ UI/L e $5,9075 \pm 1,828$ UI/L, aos 30, 60 e 90 dias de infecção, respectivamente. Os valores obtidos demonstraram não haver diferença significativa entre a média do grupo controle e os diferentes períodos de infecção considerados, tão pouco, entre estes períodos.

O teste de regressão polinomial mostrou uma relação negativa pouco significativa ($r^2=0,11$) entre o tempo de infecção por *E. coelomaticum* e a atividade da γ GT na hemolinfa de *B. similis* (Figura 34).

Tabela 12: Variação na atividade Gama GT (gama glutamil transpeptidase) na hemolinfa de *Bradybaena similis* em função do tempo de infecção. N=Número de repetições feitas em cada dosagem; $X \pm SD$ =média e desvio padrão.

Período de Infecção (dias)	N	Atividade γ GT (URF/mL) $X \pm SD$
0	12	$11,1200 \pm 2,998^a$
30	4	$7,2975 \pm 1,043^a$
60	4	$3,1275 \pm 1,433^a$
90	4	$5,9075 \pm 1,828^a$

*Médias da mesma coluna seguidas por letras distintas diferem entre si ($\alpha = 5\%$).

Os caramujos tem nos carboidratos sua principal fonte de energia para manutenção dos processos metabólicos e de reprodução, sendo estas substâncias armazenadas na forma de polissacarídeos, como glicogênio e galactogênio, localizados nos tecidos da glândula digestiva, massa cefalopodia e glândula de albúmen. Quando expostos a condições de estresse, tais como parasitismo por larvas de trematódeos ou jejum, os caramujos podem utilizar outros substratos para o mesmo fim (JOOSSE & VAN ELK, 1986).

Pinheiro et al. (2001) registraram um aumento na atividade de AST na hemolinfa de *B. similis* ao 10º dia de jejum e concluíram que este aumento teria ocorrido devido a lesões nos tecidos de *B. similis*, principalmente na glândula digestiva (diminuindo logo após este período). Esse resultado corrobora as observações de Lira et al. (2000). Douglas & Haskin (1976) observaram que em *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 infectados com *Minchinia nelsoni* Haskin, Stauber & Mackin, 1966, o aumento da atividade da AST estava associado à destruição dos tecidos das brânquias.

Mohamed e Ishak (1982) observaram que em suspensões mitocondriais de *Biomphalaria alexandrina* e *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) mantidas em condições de jejum, o consumo de oxigênio foi diminuído. Os autores sugeriram que o jejum exercia uma influência direta sobre a energia armazenada no molusco para sustentar seus processos metabólicos normais. Essas mudanças revelaram que o jejum é responsável pela inibição da taxa respiratória mitocondrial. A adição de glutamato e α -cetoglutarato não foi capaz de gerar ALT, que promove a conversão de oxalacetato para fosfoenolpiruvato. Conseqüentemente, os

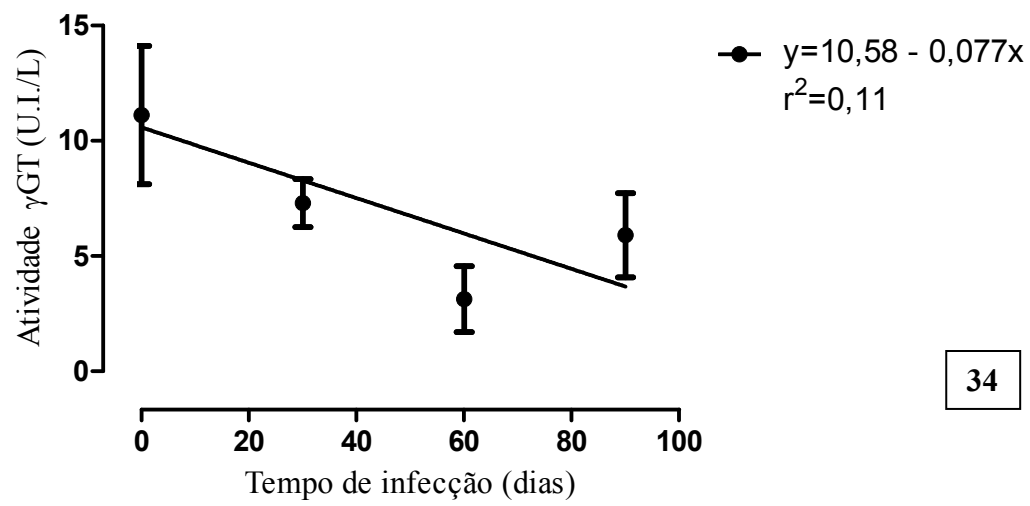
autores propuseram que deveria haver um acúmulo de oxalacetato, inibindo a atividade de AST e limitando a importância desta enzima na via da gliconeogênese.

Pinheiro et al. (2001) também esclarecem que, em seu estudo, a variação da atividade da ALT parece não estar relacionada com as alterações decorrentes do jejum, variando de uma forma menos significativa que a atividade da AST.

Quanto à atividade da γ GT, não há registros sobre a atividade em moluscos infectados com larvas de trematódeos, na interface considerada no presente estudo, tão pouco em outras, ou que considere o papel do jejum, como nos trabalhos mencionados para AST e ALT.

Diferentemente dos registros anteriores para essa atividade, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que houve uma redução, e não aumento, nas taxas das transaminases estudadas (AST, ALT e γ GT) durante o período de infecção de *B. similaris* com *E. coelomaticum*. Assim, pode-se afirmar que os parâmetros não são bons indicadores de lesão nos tecidos do hospedeiro, uma vez que os resultados obtidos diferiram do esperado, quando as análises anteriores, especialmente sobre o jejum, foram consideradas.

Figura 34: Relação entre o tempo de infecção (dias) com *Eurytrema coelomaticum* e a atividade da γ GT (gama glutamil transpeptidase) (UI/l) na hemolinfa de *Bradybaena similaris*.



34

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

1. A cavidade de fundo cego, formando uma estrutura semelhante à ventosa, localizada anteriormente, nos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* pode representar uma estrutura importante para a fixação da larva aos tecidos do hospedeiro durante seu desenvolvimento.
2. Em ambos esporocistos, de primeira e de segunda geração de *E. coelomaticum* dissecados, a presença de muitos grânulos eletrondensos na camada externa do tegumento indica uma intensa atividade secretora. Portanto, a presença de muitos perfis mitocondriais nesta região indica uma intensa atividade metabólica, corroborando os processos de secreção que consomem grandes quantidades de energia.
3. A presença de dois envelopes, o saco membranoso e o endocisto, que compõem a parede dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* constitui um recurso importante para a proteção física das cercárias contidas em seu interior quando estes esporocistos deixam o hospedeiro molusco e ficam expostos às condições ambientais externas.
4. O material fibrilar apoiado sobre uma espessa lâmina basal formando o endocisto dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* somado às estruturas membranosas e material amorfo encontrados no interior do endocisto são, provavelmente, essenciais para prevenção de danos mecânicos às cercárias quando ingeridas pelo segundo hospedeiro intermediário.
5. A diferença nas dimensões das cercárias de *E. coelomaticum* obtidas de esporocistos dissecados dos moluscos e de esporocistos expelidos, demonstra que há um crescimento destas cercárias após sua expulsão pelo molusco hospedeiro. Entretanto, a distância entre as ventosas, oral e ventral, foi reduzida nas cercárias de esporocistos expelidos, sugerindo que ocorra um maior crescimento das ventosas do que do corpo das cercárias.
6. A presença de perfis mitocondriais e grande quantidade de grânulos secretores na camada sincicial externa do tegumento de cercárias de *E. coelomaticum* suportam o fato de que ela é fisiologicamente ativa, sugerindo que ocorra uma preparação para o processo de encistamento e formação da metacercária.
7. O conteúdo de proteínas totais na hemolinfa de *B. similaris* infectada com *E. coelomaticum* apresentou uma variação muito significativa e, diferentemente do que ocorre com a maioria dos trematódeos, este conteúdo aumentou ao longo do período de infecção, somente reduzindo ao final do mesmo.

8. A diminuição significativa no conteúdo de amônio na hemolinfa de *B. similaris* infectada com *E. coelomaticum* demonstra que há uma influência do tempo de infecção sobre o conteúdo deste produto nitrogenado na hemolinfa do molusco.
9. Os resultados obtidos com as transaminases indicam que estes parâmetros não são bons indicadores de lesão nos tecidos do hospedeiro.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, no presente estudo, é possível concluir que:

10. Pela primeira vez foram analisados cortes de ovos de *E. coelomaticum*, assim como detalhes de sua topografia, sendo a casca do ovo mais espessa nas extremidades que nas laterais e dividida em três camadas distintas: as camadas interna e externa mais eletrondensas e finas e a camada intermediária menos eletrondensa que constitui praticamente todo material que compõe a casca do ovo, e a superfície externa da casca do ovo é praticamente lisa, sem especializações.
11. Foi realizado o primeiro registro de imagens por microscopia de luz do miracídio de *E. coelomaticum*, sendo observadas duas faixas de células epidérmicas ciliadas, uma anterior e outra posterior, sendo cada faixa composta por duas células (ou placas) epidérmicas ciliadas em posição ventrodorsolateral de acordo com a seguinte fórmula:
$$E=2E_1 + 2E_2 \quad E_1=1 + 1E_1VDL$$
$$E_2=1 + 1E_2VDL$$
12. Pela primeira vez a morfometria dos esporocistos de *E. coelomaticum* e seus aspectos morfológicos foram estudados através de microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão, incluindo esporocistos de primeira geração, de segunda geração em desenvolvimento e após serem expelidos pelo molusco hospedeiro.
13. A topografia do tegumento dos esporocistos de *E. coelomaticum* tem, neste estudo, seu primeiro registro. O tegumento dos de primeira geração apresenta muitas projeções, dobras e estriações, porém nos esporocistos de segunda geração, o tegumento era mais espesso do que nos esporocistos de primeira geração, apresentando regiões altamente dobradas.

14. A presença de uma cavidade de fundo cego, formando uma estrutura semelhante a uma ventosa, localizada anteriormente, também não havia sido descrita antes. Esta pode representar uma estrutura importante para a fixação da larva aos tecidos do hospedeiro durante seu desenvolvimento.
15. A presença de dois envelopes que compõem a parede dos esporocistos de segunda geração constitui um recurso importante para a proteção física das cercárias contidas em seu interior, evitando a dessecação excessiva da larva, quando esta deixa o hospedeiro molusco e fica exposta às condições ambientais externas.
16. O estágio de esporocisto de segunda geração representa uma etapa muito importante do desenvolvimento larval intramolusco. Visto que, nesta fase, ocorre multiplicação assexuada, determinando um aumento significativo da carga parasitária, permitindo a formação de centenas de cercárias a partir de um único miracídio. Dessa forma, o desenvolvimento intramolusco de *E. coelomaticum*, apresenta-se como uma etapa para o controle da euritrematose no gado bovino.
17. Pela primeira vez uma detalhada descrição da organização ultraestrutural dos esporocistos de primeira e de segunda geração de *E. coelomaticum* e as alterações que ocorreram ao longo de seu desenvolvimento larval foi feita.
18. O presente estudo apresenta novas informações sobre a morfologia de cercárias de *E. coelomaticum* em dois momentos diferentes de seu desenvolvimento e, pela primeira vez, detalhes deste estágio larval foram mostrados utilizando microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão. A ausência de estilete na extremidade anterior do corpo desta larva, assim como a ausência de espinhos na cauda da cercária foram registrados pela primeira vez em contraponto à literatura pertinente.
19. No presente estudos foram complementadas informações acerca das alterações fisiológicas em *B. similaris* decorrentes da infecção com *E. coelomaticum*, preenchendo uma lacuna existente na literatura, evidenciando o conteúdo de proteínas totais e amônio na hemolinfa de *B. similaris* experimentalmente infectada com *E.*

coelomaticum, constituindo importante subsídio para estudos da fisiologia do hospedeiro, servindo como base, inclusive para medidas de controle da euritrematose bovina. Primeiro registro da atividade da γ GT na hemolinfa de *B. similaris* infectada com *E. coelomaticum*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICATA, J. E. Life history of the cecal fluke, *Postharmostomum gallinum*, of poultry. **Journal of Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 135-143. 1938.
- ALMEIDA, M. N; BESSA, E. C. A. Efeito da densidade populacional sobre o crescimento e a reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Subulinæ). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 2, n. 1, p. 97-104. 2000.
- AMATO, J. F. R. **Platelmintos (Temnocefálicos, Trematódeos, Cestóides, Cestodários) e Acantocéfalos. Manual de Técnicas para a Preparação de Coleções Zoológicas.** Editado por N. Papavero. Sociedade Brasileira de Zoologia, São Paulo, SP, Brasil. 1985. 11p.
- AMATO, S. B; BEZERRA, J. C. B. Parasitismo natural de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) por *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 75-79. 1989.
- AMATO, J. F. R; AMATO, S. B; SANTOS, V. G. T; SANTOS, V. G. T. Protocolos para Laboratório - Coleta e Processamento de Parasitos do Pescado. Seropédica, RJ: EDUR-, 1991. 81 p.
- ANTESON, R. K; WILLIAMS, J. F. Selective depletion of hemolymph proteins of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 61, p. 149. 1975.
- ARAÚJO, J. L. de B. Moluscos de importância econômica no Brasil. I. Xanthonychidae: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 6, n. 1, p. 583-592. 1989.
- ARAÚJO, J. V; BELÉM, P. A. D. Efeito anti-helmíntico do albendazole sobre a contagem de ovos de *Eurytrema* sp (Trematoda) em fezes de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 1, p. 111-114. 1993.
- ATAEV, G. L; DOBROVOLKIJ, A. A; FOURNIER, A; JOURDANE, J. Migration and development of mother sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae). **Journal for Parasitology**, v. 83, p. 444-453. 1997.
- ATAEV, G. L.; FOURNIER, A; COUSTAU, C. Comparison of *Echinostoma caproni* mother sporocysts development *in vivo* and *in vitro* using *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. **Journal for Parasitology**, v. 84, p. 227-235. 1998.
- AZEVEDO, V. P. B; PINHEIRO, J; GOMES, E. M; CHAGAS, G. M. Determinação do conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen de *Bradybaena similaris* (Férussac,

- 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, v. 18, n. 1-2, p. 95-99. 1996.
- AZEVEDO, J. R.; MANNIGEL, R. C.; AGULHON, A. Z.; BORBA, T. R.; BARBIERI, A. W.; OLIVEIRA, D. C. L.; HEADLEY, S. A.; JANEIRO, V. Prevalence and geographical distribution of bovine eurytrematosis in cattle slaughtered in northern Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 23-26. 2000.
- BALAN, D. S. L.; MAGALHÃES, L. A.; PIEDRABUENA, A. E. Aspectos imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros Digenea. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 6, p. 421-429. 1993.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos de Malacologia Médica**. 20e. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. p. 15-17.
- BASCH, P. F.; DICONZA, J. J. The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni*: surface changes *in vitro* with ultrastructural correlation. **Journal for Parasitology**, v. 60, p. 935-941. 1974.
- BASCH, P. F.; BASCH, N. *Schistosoma mansoni*: scanning electron microscopy of schistosomula, adults and eggs grown *in vitro*. **Parasitology**, v. 85, p. 333-338. 1982.
- BASSANI, C. A.; SANGIONI, L. A.; SAUT, J. P. E.; YAMAMURA, M. H.; HEADLEY, S. A. Epidemiology of eurytrematosis (*Eurytrema* spp. Trematoda: Dicrocoeliidae) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the State of Parana, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 356-361. 2006.
- BASSANI, C. A.; SANGIONI, L. A.; SAUT, J. P. E.; HEADLEY, S. A.; YAMAMURA, M. H. Eurytrematose bovina. **Semino: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 299-316. 2007.
- BECKER, W.; SCHMALE, H. The nitrogenous products of degradation – ammonia, urea and uric acid – in the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Zoo Parasitenkd**, v. 51A, p. 407-411. 1975.
- BECKER, W. SCHMALE, H. The ammonia and urea excretion of *Biomphalaria glabrata* under different physiological conditions: starvation, infect with *Schistosoma mansoni*, dry keeping. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 59B, p. 75-79. 1978.
- BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zoo Parasitenkd**, v. 63, p. 101-111. 1980.
- BECKER, W. Purine metabolism in *Biomphalaria glabrata* under starvation and infection with *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76B, p. 215-219. 1983.
- BELÉM, P. A. D.; OLIVEIRA, M. R.; PADOVANI, C. R. Alterações pancreáticas em bovinos naturalmente infectados por *Eurytrema* sp e sua associação com a carga parasitária e o

número de ovos por grama de fezes (OPG). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 31, n. 3-4, p. 273-281. 1994.

BEZERRA, J. C. **Inter-relacionamento entre o trematódeo digenético *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923 e o hospedeiro intermediário *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821)**. 1989. 65f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de concentração: Parasitologia Veterinária) – Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro.

BORAY, J. C; Fraser, G. C; Williams, J. D; Wilson, J. M. The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p. 4-6. 1985.

BRAGA, F. R; ARAÚJO, J. V; CARVALHO, R. O; SILVA, A. R; ARAUJO, J. M; TAVELA, A. O. Observação in vitro da ação dos fungos nematófagos *Dudingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 63, p. 40-45. 2008.

BRANDOLINI, S. V. P. B; AMATO, S. B. Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoellidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 2, p. 499-510. 2001.

BRANT, P. C. Frequência de algumas parasitoses em carcaças e vísceras de bovinos abatidos em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 14, p. 127-132. 1962.

BRITO, D. B; FRANCIS, M; CARVALHO, E. C. R. Patogenicidade do *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892, Looss, 1907). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 4, p. 17. 1981.

BROOKS, D. R; O'GRADY, R. T; GLEN, D. R. Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation. **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, p. 411-443. 1985.

BROOKS, D. R; BANDONI, S. M; McDONALD, S. M. Aspects of the phylogeny of the Trematoda Rudolphi, 1808 (Platyhelminthes: Cercomeria). **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 2609-2624. 1989.

BRUSCA, R. C; BRUSCA, G. C. **Invertebrados**. 2e. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 968p.

BURCH, J. B. Taxonomic and nomenclature changes since 1960 in snails and slugs of quarantine significance to the United States. **Malacological Review**, v. 15, n. 1-2, p. 141-142. 1982.

- BUSETTI, E. T; PASKE, A; RUIS, M. C. E; TOMAZ, V; GOLINELLI, A. Helintos parasitos de *Bubalus bubalis* no Estado do Paraná, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 399-404. 1983.
- BUZZEL, G. R. Composition, secretion and fate of the glands in the miracidium and sporocyst of *Fasciola hepatica* L. **Journal of Helminthology**, v. 57, p. 79-84. 1983.
- CABLE, R. M. Parthenogenesis in parasitic helminths. **American Zoologist**, v. 11, p. 267-272. 1971.
- CABLE, R. M. **Phylogeny and taxonomy of trematodes with reference to marine species.** In: Symbiosis in the sea. W. B. Vernberg (ed.) University Of South Carolina Press, Charleston, South Carolina, USA, 1974. p. 173-193.
- CALDEIRA, R. L; et al. Moluscos terrestres naturalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis* no Brasil. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 20, 2007, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos/ XX Encontro Brasileiro do Malacologia.** Rio de Janeiro: SBMa/UERJ, 2007. p. 369.
- CAMPOS, M. S; RAGUSA, A. L; MIGUEL, O; ISHIZUKA, M. M. Correlação entre o número de parasitas e peso de pâncreas em bovinos naturalmente infestados por *Eurytrema pancreaticum*, Janson 1889 (Trematoda, Dicrocoeliidae); diferença de peso entre pâncreas parasitados e não parasitados. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, p. 295-299, 1974.
- CAVALCANTI, M. G. S; ARAÚJO, H. R. C; PAIVA, M. H. S; SILVA, G. M; BARBOSA, C. C. G. S; SILVA, L. F; BRAYNER, F. A; ALVES, L. C. Ultrastructural and cytochemical aspects of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Micron**, v. 40, p. 394-400. 2009.
- CHINONE, S; ITAGAKI, H. Development of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda). II – Development in definitive host. **Bulletin of the Azabu Veterinary College**, v. 1, n. 2, p. 73-81. 1976.
- CHINONE, S; FUKASE, T; ITAGAKI, H. Experimental infection of domestic cats with *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae). **Japanese Journal of Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 29-39. 1984.
- CHRISTIE, J. D; MICHELSON, E. H. Transaminase levels in the digestive gland-gonad of *Schistosoma mansoni*-infect *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 50B, p. 233-236. 1975.
- COOK, A. Behavioral ecology. In: **The biology of terrestrial mollusks** (G. M. Barker, ed.). New Zeland: CABI Publishing, 1977. p. 447-488.
- COOK, A. Behavioural ecology: on doing the right thing, in the right place at the right time. pp.445–488. In: BARKER, G.M.(ed.). **The biology of terrestrial molluscs.** New Zeland, CABI publishing, 2001. 558p.

- CORREA, W. M; CORREA, C. N. M; FERREIRA, A. C; PAES, A. C. et al. *Eurytrema pancreaticum*: clínica e diagnóstico em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 4, n. 19, p.31-34. 1984.
- COUSIN, C; DORSEY, C; KENNEDY, V; OFORI, K. Ultrastructure of the ventral sucker of *Schistosoma mansoni* cercaria. **Journal of Morphology**, v. 223, p. 215-223. 1995.
- CRIBB, T. H; BRAY, R. A; LITTLEWOOD, D. T. J; PICHELIN, S. P; HERNIOU, E. A. **The Digenea**. In: Littlewood, D. T. J, Bray, R. A. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London. p. 168-185. 2001.
- DE SOUZA, W. (Ed.). **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas as Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia. Rio de Janeiro, 2007. 357p.
- DEGAFFÈ, G; LOKER, E. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: Correlation with effect of parasite secretory-excretory products on host hemocyte spreading. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 64-72. 1998.
- DIMITROV, V; KANEV, I; FIRED, B; RADEV, V. Argentophilic structures of the miracidium of *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 306-307. 1995.
- DIMITROV, V; KANEV, I; BEZPROZVANICH, V; RADEV, V. Argentophilic structures of the miracidium of *Echinochasmus perfoliatus* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasite**, v. 5, p. 185-188. 1998.
- DORSEY, C; COUSIN, C. Cyton II: a subtegumental cell type in the cercaria of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Morphology**, v. 224, p. 233-240. 1995.
- DORSEY, C. H; COUSIN, C. E; LEWIS, F. A; STIREWALT, M. A. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**, v. 33, p. 279-323. 2002.
- DOUGLAS, W. R; HASKIN, H. H. Oyster-MSX interactions: alterations in hemolymph enzyme activities in *Crassostrea virginica* during the course of *Minchinia nelsoni* disease development. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 27, p. 317-323. 1976.
- DUNDEE, D. S; CANCIENNE, E. A. Louisiana citrus being damaged by snails. **Nautilus**, v. 92, n. 1, p. 55-56. 1978.
- EDUARDO, S. L; MANUEL, M. F; TONGSON, M. S. *Eurytrema escuderoi*, a new species and two other previously known species of the genus *Eurytrema*. **Philippine Journal of Science**, v. 15, n. 1-2, p. 104-116, 1976.
- EHLERS, U. Phylogenetic relationship within Platyhelminthes. In: MORRIS, S. C; GEORGE, J. D; GIBSON, R; PLATT, H. M. (Eds.). **The origins and relationships of lower invertebrates**. Oxford, USA: Oxford University Press, 1985. p. 143-158.

- EL-EMAN, M. A; EBEID, F. A. Effect of *Schistosoma mansoni* infection, starvation and molluscicides on acid phosphatase, transaminases and total protein and hemolymph of *Biomphalaria alexandrina*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 62, p. 1-13. 1989.
- EMURA, S. Life history of *Bradybaena similaris stimpsoni* (Pfeiffer). A preliminary Report. **Venus**, v. 3, n. 72-91, p. 133-143. 1932.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v. 49, p. 1080. 1977.
- FOX, N. J. et al. Pancreatic function in domestic cats with pancreatic fluke infections. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.178, n.1, p.58-60, 1981.
- FREIRE, J. J. Fauna parasitária riograndense. I – Introdução, boi, ovelha e cabra. **Revista de Medicina Veterinária**, São Paulo, v.3, n.1, p.40-55, 1967.
- FRIED, B.; FUJINO, J. Argentophilic and scanning electron microscopic observations of the tegumentary papillae of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) cercariae. **Journal of Parasitology**, v. 73, p. 1169-1174. 1987.
- FULLINGTON, R. W. Asiatic land snail new to Texas, *Bradynaena similaris* Ferussac. **Southwestern Naturalist**, v. 20, n. 2, p. 287. 1975.
- FURTADO, M. C. V; BESSA, E. C. A; CASTANON, M. C. M. Histological characterization of ovotestis of *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) in different developmental phases, kept isolated or in groups, under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 4, n. 2, p. 229-300. 2002.
- GASTE, L. **Avaliações laboratoriais em bovinos infectados e não infectados pelo *Eurytrema coelomaticum***. 1991. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária- Área: Clínica) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.
- GERMAIN, L. Los Helicidae de la faune française. **Archives Du Muséum National d’Histoire Lyon**, v. 13, p. 1-484. 1929.
- GIBSON, D. I; BRAY, R. A. The evolutionary expansion of host-parasite relationships of the Digenea. **International Journal of Parasitology**, v. 24, p. 1213-1226. 1994.
- GIBSON, D. I. **Trematoda**. In: Guide to the Parasites of Fishes of Canada. Part IV. L. Margolis, Z. Kabata (eds.). Candian special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences No. 124, NRC Press. 1996. 373p.
- GIBSON, D. I. **Keys to Trematoda, Vol. 1**. D. I. Gibson, A. Jones and R. A. Bray (eds), The Natural History Museum, London, UK. 2002. 544p.

- GRAEFF-TEIXEIRA, C; THIENGO, S. C; THOMÉ, J. W; MEDEIROS, A. B; CAMILLO-COURA, L; AGOSTINI, A. A. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Céspedes, 1971) in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 487-489. 1993.
- GRESS, F. M; CHENG, T. C. Alterations in total serum proteins and protein fractions in *Biomphalaria alexandrina* parasitized by *Schistosoma mansoni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 22, p. 382-390. 1973.
- HANELT, B; LUN, C. M; ADEMA, C. M. Comparative ORESTES-sampling of transcriptomes of immune-challenged *Biomphalaria glabrata* snails. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, p. 192-203. 2008.
- HASS, F. Kleine Bemerkungen IV. **Archiv für Molluskenkunde**, v. 67, n. 1, p. 45-47. 1935.
- HEADLLEY, S. A; SAUT, J. P. E; BASSANI, C. A; SANGIONI, L. A; BIRGEL JR., E. H; YAMAMURA, M. H. Histopathologic patterns of pancreatic lesions induced by *Eurytrema coelomaticum* in cattle from the central-west region of the State of Parana, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, n. 1, p. 3-7. 2009.
- HODASI, J. K. M. Life story studies of *Achatina* (*Achatina*) *achatina* (Linnè). **Journal of Molluscan Studies**, v. 45, p. 328-339. 1979
- HODASI, J. K. M. The effects of different light regimes on the behavior and biology of *Achatina* (*Achatina*) *achatina* (Linnè). **Journal of Molluscan Studies**, v. 48, p. 283-293. 1982.
- HORTA, P. P. Distomatose pancreática e glicosúria em bovinos. **A Lavoura**, v.22, n. 3,4, p.157-158. 1918.
- HUBRICHT, L. New localities for *Bradybaena simlaris*. **Nautilus**, v. 76, n. 152. 1963.
- HUMANSON, G. L. **Animal Tissue Techniques**. San Francisco: W. H. Freeman and Company. 641p. 1972.
- ILHA, M. R. S; LORETTI, A. P; REIS, A. C. F. Wasting and mortality in beef cattle parasitized by *Eurytrema coelomaticum* in the State of Paraná, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 133, p. 49-60. 2005.
- ITAGAKI, H; CHINONE, S. Histories of rumen flukes and pancreas of ruminants. In: JAPAN-BRASIL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND TECHNOLOGY, 3, 1982, Tokyo. *Proceeding...* Tokyo: Agency of Industrial Science and Technology., out. p. 25-27. 1982.
- JANG, H. Studies on the *Eurytrema coelomaticum*. II. Life cycle. Korean. **Journal of Parasitology**, v. 7, p. 178-200. 1969.

- JAUME, M. L; PUGA, G. P; AGUIAR, P. H. *Bradybaena similaris*: *Angiostrongylus cantonensis* intermediate host in Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 207-209. 1981.
- JEYARASASINGAM, U; HEYNEMAN, D; LIM, H. K; MANSOUR, N. Life cycle of a new echinostome from Egypt *Echinostoma liei* sp. nov. (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology**, v. 65, p. 203-222. 1972.
- JOOSSE, J; VAN ELK, R. *Trichobilharzia ocellata*: physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproductive activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v. 62, p. 1-13. 1986.
- KANEV, I; FRIED, B. Further studies on cercaria *Echinostoma revolutum* of Beaver (1937) (Trematoda: Echinostomatidae). **Khelintol** (Sofia), v. 16, p. 44-52. 1982.
- KANEV, I; EISENHUT, U; OSTROWSKI DE NUNEZ, U; MANGA GONZALEZ, M. U; TZOLOV, D; DIMITROV, V; RADEV, V. Redescription of the tail and fin folds of *Echinostoma revolutum* cercariae from its type locality (Trematoda: Echinostomatidae). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, p. 125-127. 1993.
- KANEV I. Life cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) (Trematoda: Echinotomatidae). **Systematic Parasitology**, v. 28, p. 125-144. 1994.
- KARAVAENA, C. D. On the vertical distribution of molluscs (Bradybaenidae, Helicidae) in the Zailyskii Alatau. **Biologiya Geo Alma Ata**, 1973, n. 8, p. 104-109. 1976.
- KOIE, M; CHRISTENSEN, N. O; NANSEN, P. Stereoscan studies of eggs, free-swimming and penetrating miracidia and early sporocysts of *Faciola hepatica*. **Zoo Parasitenkd**, v. 51, p. 79-90. 1976.
- KREJCI, K. G; FRIED, B. Light and scanning electron microscopic observations of the eggs, daughter rediae, cercariae, and encysted metacercariae of *Echinostoma trivolvis* and *E. caproni*. **Parasitology Research**, v. 80, p. 42-47. 1994.
- KÜMMEL, G. Terminalorgan der Protonephridien. Feinstruktur und Deutung der Funktion. **Z. Naturf**, v. 13B, p. 677-679. 1958.
- KUSEL, J. R. Studies on the structure and hatching of the eggs of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 60, p. 79-88. 1970.
- LA RUE, G. R. The classification of digenetic Trematodes: a review and new system. **Experimental Parasitology**, v. 6, p. 306-344. 1957.
- LEAHY, W. Aspectos adaptativos de *Bradybaena smilaris* Ferussac, 1821 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) submetido ao jejum e dessecação. **Boletim de Fisiologia Animal**, v. 5, p. 47-55. 1980.

- LEAHY, W. M. Comportamento e características anatomofuncionais da reprodução em *Bradybaena similaris* (Molusco Pulmonado). **Ciência & Cultura**, v. 36, n. 8, p. 1389-1392. 1984.
- LEE, F. O; CHENG, T. C. *Schistosoma mansoni*: alterations in total protein and hemoglobin in the hemolymph of infected *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v. 31, p. 203-216. 1972.
- LEFÈVRE, T; ROCHE, B; POULIN, R; HURD, H; RENAUD, F; THOMAS, F. Exploiting host compensatory responses: the “must” of manipulation? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 10, p. 435-439. 2008.
- LIE, K. J; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, v. 53, p. 1192-1199. 1967.
- LIRA, C. R. S; GOMES, E. M; CHAGAS, G. M; PINHEIRO, J. Influência do jejum sobre o conteúdo de proteínas totais e de amônio na hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda, Xanthonychidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, p. 907-913. 2000.
- LO VERDE, P. T. Scanning electron microscope observations on the miracidium of *Schistosoma*. **International Journal for Parasitology**, v. 5, p. 95-97. 1975.
- LOKER, E. S; HERTEL, L. A. Alterations in *Biomphalaria glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. **Journal of Parasitology**, v. 73, p. 503-513. 1987.
- LOOSS, A. Some parasites in the Museum of the School of Tropical Medicine, Liverpool. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 1, p. 123-154. 1907.
- LOOSS, A; CUFFEY, E. On some parasites in the museum of the school of Tropical Medicine, Liverpool with a contribution on the case of distomasis of the liver and rectum. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 1, p. 123-154. 1907.
- LOUREIRO, M. C. Manutenção de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) em terrários. **Revista Ceres**, v. 11, n. 62, p. 60-63. 1960.
- MANOHAR, L; RAO, P. V; SWAMI, K. S. Variations in aminotransferase activity and total free amino acid level in the body fluid of the snail *Lymnaea luteola* during different larval trematode infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.19, p. 36-41. 1972.
- MASSA, D; CHEJLAVA, M. J; FRIED, B; SHERMA, J. High performance column liquid chromatographic analysis of selected carboxylic acids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 101, p. 925-928. 2007.
- MATTOS JR., D. G. de. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907: Alguns aspectos do seu relacionamento com os hospedeiros intermediários e definitivo

sob condições experimentais. 1987. 87f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de concentração: Parasitologia Veterinária) – Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

- MATTOS JUNIOR, D. G; VIANNA, S. S. S. O *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae) no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 3-7, 1987.
- MAYAUDON, T. H. *Eurytrema pancreaticum* (Giard & Billet, 1892). Su presencia em bovinos (*Bos taurus*) de Venezuela. **Revista de Medicina Veterinaria y Parasitologia**, v. 13, p. 175-176. 1954.
- MEAD, A. R. **Pulmonates**. Volume 2B, Economic Malacology with particular reference to *Achatina fulica*. London, Academic Press, 1979. 150p.
- MEULEMAN, E. A; LYARUU, D. M; KHAN, M. A; HOLZMANN, P. J; SMINIA, T. Ultrastructural changes in the body wall of *Schistosoma mansoni* during the transformation of the miracidium into mother sporocyt in the snail host *Biomphalaria glabrata*. **Zoo Parasitenkd**, v. 56, p. 227-242. 1978.
- MEULEMAN, E. A; HOLZAMNN, P. J; PEET, R. C. The development of daughter sporocyst inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. **Zoo Parasitenkd**, v. 61, p. 101-212. 1980.
- MINCHELLA, D. J. Host life-history in response to parasitism. **Parasitology**, v. 90, p. 205-216. 1985.
- MITCHELL, H. T. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 55, p. 1-3. 1972.
- MOHAMED, A. M; ISHAK, M. M. Comparative effects of schistosome infection and starvation on the respiratory transport chain of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 71B, p. 289-292. 1982.
- MOHAMED, S. H. Ultrastructural aspects of intramolluscan developing cercariae of *Echinostoma liei*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 22, p. 479-485. 1992.
- MOREIRA, C. S. D. R; GOMES, E. M; CHAGAS, G. M; PINHEIRO, J. Calcium changes in *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) under starvation. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 5, n. 1, p. 45-54. 2003.
- MORIYAMA, N; TSUJI, M; SETO, T. Karyological studies on bovine pancreatic flukes (*Eurytrema sp.*) and their phenotypes. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 281-291. 1980.

- MUÑOZ-ANTOLI, C; MARÍN, A; TOLEDO, R; ESTEBAN, J. G. Effect of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) experimental infection on longevity, growth and fecundity of juvenile *Radix peregra* (Gastropoda: Lymnaeidae) and *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) snails. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1663-1670. 2007.
- NABIH, I; EL-DARDIRI, Z; EL-ANSARY, A; RIZK, M. Measurement of some selected enzymatic activities on infected *Biomphalaria alexandrina* snails. **Cellular and Molecular Biology**, v. 36, p. 637-642. 1990.
- ODENING, K. Zur Kenntnis des Exkretionssystems einiger Digenetischer Trematoden (Unterordnungen Plagiorchiata, Brachylaemata, Strigeata). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 204, p. 440-456. 1961.
- OLIVEIRA, M. P; ALMEIDA, E. L; VIEIRA, I; OLIVEIRA, M. H. R. **Comunicação nº 1. Criação de Moluscos em Terrários e Aquários (Uma experiência em laboratório)**. Juiz de Fora, Esdeva, 1968. 15p.
- OLIVEIRA, M. P; VIEIRA, I; OLIVEIRA, M. H. R. Sobre *Bradybaena similaris* Férussac (Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora, Fruticicolidae) copula y funcionamiento Del oviducto durante el periodo de fecundacion y formacion del huevo. **Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay**, v. 3, n. 21, p. 155-161. 1971.
- OLSON, P. D; CRIBB, V. V; TKACH, R. A; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 733-755. 2003.
- OTRANTO, D; TRAVERSA, D. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. **Trends Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 12-15. 2003.
- PAN, S. C. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 307-372. 1980.
- PAN, S. C. *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, v. 49, p. 129-149. 1996.
- PASCHOAL, S. V; AMATO, S. B. Consumo de oxigênio e reserva glicolítica da glândula digestiva de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda: Xanthonychidae) infectada com *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) (Digenea: Dicrocoeliidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 2. 1993.
- PASCHOAL, S. V; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae): alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, p. 411-418. 1996.

- PEARSON, J. C. A phylogeny of life-cycle patterns of the Digenea. **Advances in Parasitology**, v. 10, p. 153-189. 1972.
- PICORAL, M; THOMÉ, J. W. Sobre a anatomia do sistema genital de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Pulmonata, Stylommatophora, Bradybaenidae) ocorrentes em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, Supl. IV, p. 435-439. 1989.
- PINHEIRO, J; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda: Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 407-410. 1994.
- PINHEIRO, J; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum*: Influence of the infection on the reproduction and nucleic acids contents in the albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similaris*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 5, p. 635-638. 1995.
- PINHEIRO, J. Influence of starvation on the glycogen and galactogen contents in the snail *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, p. 349-357. 1996.
- PINHEIRO, J; GOMES, E. M; CHAGAS, G. M. Aminotransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* under starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1161-1164. 2001.
- PINHEIRO, J. **Morfologia e ultraestrutura dos ovos e estágios larvais de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) e fisiologia comparada do seu relacionamento com *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Gastropoda)**. 2003.183f. Tese (Doutorado em Biologia Animal, Área de concentração: Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- PINHEIRO, J; MALDONADO JUNIOR, A; LANFREDI, R. M. Light and Scanning Electron Microscopy of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) (Trematoda, Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 121, p. 265-275. 2004a.
- PINHEIRO, J; MALDONADO JR, A; ATTIAS, M; LANFREDI, R. M. Ultrastructure of the miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 97, p. 367-372. 2004b.
- PINHEIRO, J; MALDONADO JUNIOR, A; ATTIAS, M; LANFREDI, R. M. Ultrastructure of the miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 97, p. 367-372. 2005.
- PINHEIRO, J; MALDONADO JUNIOR, A; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma*

paraensei Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v. 106, p. 55-59. 2009.

POULIN, R. **Evolutionary ecology of parasites**. 2e. Princeton University Press. 2007.

PURCHON, R. D. **The Biology of the Molluska**. Hungary: Pergamon Press Ltda. 560p. 1968.

RACE, G. J; MICHAELS, R. M; MARTIN, J. H; LARSH JR, J. E; MATHEWS, J. L. *Schistosoma mansoni* eggs: an electron microscopy study of shell pores and microbarbs. **Proceedings of the Society of the Experimental Biology and Medicine**, v. 130, p. 990-992. 1969.

RACE, G. J; MARTIN, J. H; MOORE, D. V; LARSH JR, J. E. Scanning and transmission electron microscopy of *Schistosoma mansoni* eggs, cercariae, and adults. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, p. 914-924. 1971.

RAGUSA, A. L; CAMPOS, M. S. Identificação de hospedeiro intermediário de *Eurytrema coelomaticum* (Giard e Billet, 1882) LOOSS, 1907 (Trematoda – Dicrocoeliidae) em fazendas de criação de bovinos no estado de São Paulo – Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 1, p. 269-287. 1976.

REITMAN, S; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic piruvic transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**. 1957.

RIBEIRO, O. C; BIANCHIN, I; MELO, H. J. H; GOMES, A; PEREIRA, A. S. Lesões anátomo-patológicas observadas em infecções por *Eurytrema pancreaticum* em bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, 1980, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1980.

ROBERTS, L.S; JANOVY, J. R. J. 1996. **Foundations of Parasitology**. 5th edition. Wm. C. Brown Publishers. USA, 1996. 658p.

SAKAMOTO, K; ISHII, Y. Scanning electron microscope observations on miracidium, cercaria, and cercarial papillar patterns of *Schistosoma japonicum*. **Journal of Parasitology**, v. 64, p. 59-68. 1978.

SAKAMOTO, T; KONO, I; YASUDA, N; YAMAUCHI, C. Studies on *Eurytrema coelomaticum*. I. Preliminary observations on the biological characters of *E. coelomaticum*. **Memoirs of the Faculty of Agricultura**, v. 16, p. 83-92. 1980.

SAKAMOTO, T; KONO, I; MOHRI, S. Studies on *Eurytrema coelomaticum*. IV Comparison between anthelmintic effects of drug against *Eurytrema coelomaticum* in vitro and in vivo. **Journal of the Faculty of Agriculture Iwate University**, v. 17, n. 2, p. 211-222. 1984.

- SAKAMOTO, T; OIKAWA, T. Cubic crystal protein inclusions in the neodermis of the pancreatic fluke, *Eurytrema pancreaticum*, and *Eurytrema coelomaticum*. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1393-1399. 2007.
- SANDLAND, G. J; RODGERS, J. K; MINCHELLA, D. J. Interspecific antagonism and virulence in hosts exposed to two parasite species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 43-47. 2007.
- SANTOS, E. **Moluscos do Brasil (vida e costumes)**. Belo Horizonte: Itatiaia Ltda, 1982. 141p.
- SANTOS, O. Presencia de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) em El Uruguay. **Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay**, v. 7, n. 66-67, p. 376-378. 1994.
- SHIEN, Y. S; LIU, L. L; HUANG, S. W. Studies on eurytreemiasis. II Pathological study of the pancreas of the cattle and goats naturally infected with *Eurytrema pancreaticum*. **Journal Chinese Society Veterinary Science**, v. 5, n. 2, p. 133-138. 1979.
- SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. 7e. Mexico: Nueva Editorial Interamericana S. A. de C. V., 1987. 823p.
- SOUTHGATE, V. R. Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the tegument of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, v. 61, p. 177-190. 1970.
- SOUZA, R. M; GOMES, E. M; CHAGAS, G. M; PINHEIRO, J. The influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 365-371. 2000.
- STANISLAWSKY, E; BECKER, W; MÜLLER, G. Alterations of free amino acid content in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata) in starvation and after infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 63B, p. 477-482. 1979.
- TANG Z; TANG. The biology and epidemiology of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) and *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) in cattle and sheep in China. **Acta Zoologica Sinica**, v. 23, p. 267-282. 1977.
- TANG, C. C. Studies on the life history of *Eurytrema coelomaticum* Janson, 1889. **Journal of Parasitology**, v. 36, p. 559-573. 1950.
- THIELE, J. **Handbuch der systematischen weichtierkunde**, v. 1, n. 2, p. 1-778. 1931.
- THOMÉ, J. W; SILVA, A. V; SANTOS, D. D. **Manual de aulas práticas de Zoologia: estudo morfo-anatômico de um molusco Sigmureta**. Porto Alegre: Cadernos EDIPUCRS 12, Série Zoologia, 1996. p. 2-25.

- TRAVASSOS, L. Revisão de família Dicrocoeliidae Odhner. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 1-357. 1944.
- UETA, M. T. Infecção experimental de *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica*. *Revista de Saúde Pública*, v. 14, p. 53-57. 1980.
- VILLELA, G. G; BACILA, M; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997. 552p.
- VOGE, M; SEIDEL, J. S. Transformation *in vitro* of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* into young sporocysts. **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 699-704. 1972.
- WAJDI, N. Penetration by the miracidium of *S. mansoni* into the snail host. **Journal of Helminthology**, v. 40, p. 235-244. 1966.
- WALKER, A. J. Do trematode parasites disrupt defence-cell signalling in their snail hosts? **Trends Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 154-159. 2006.
- WIKEL, S. K; BOGITSH, B. J. *Schistosoma mansoni*: penetration apparatus and epidermis of the miracidium. **Experimental Parasitology**, v. 36, p. 342-354. 1974.
- WILSON, R. A. The structure and permeability of the shell and vitelline membrane of the egg of *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, v. 57, p. 47-58. 1967.
- WILSON, R. A. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica* L. **Journal of Parasitology**, v. 55, p. 124-133. 1969a.
- WILSON, R. A. The fine structure of the protonefridial system in the miracidium of *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, v. 59, p. 461-467. 1969b.
- WILSON, R. A; PULLIN, R; DENISON, J. An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnaea truncatula*. **Parasitology**, v. 63, p. 491-506. 1971.
- YAMAGUTI, S. **A synoptical review of life histories of digenetic of vertebrates**. Tokyo: Keikan Publish Co. Japan, 1975.
- YAMAMURA, M. H. **Algumas avaliações sobre a patologia e controle da euritrematose bovina**. 1989. 128p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária, Área de concentração: Helminologia Veterinária) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro.
- YAMAMURA, M. H; HORNER, M. R; LOPES, C. W. Avaliação patológica da euritrematose em bovinos naturalmente infectados na região de Londrina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 16, n. 1, p. 89-99, 1995.

- YANAGIHARA, M. Notes the injurious Pulmonata Gastropods of sugar cane in Formosa. **Transactions of the Natural History Society of Formosa**, v. 20, n. 106, p. 14-18. 1930.
- ZDÁRSKÁ, Z. Ultrastructure of the digestive tract of *Echinostoma revolutum* cercaria. **Folia Parasitologica**, v. 38, p. 179-181. 1991.
- ZDÁRSKÁ, Z. Transmission electron microscopy of sensory receptors of *Echinostoma revolutum* (Frölich, 1802) cercaria (Digenea: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 78, p. 598-606. 1992.
- ZHENG, Y; XUENONG, L; JING, Z; HU, Z; CAI, X. Comparison of 18S ribosomal RNA gene sequences of *Eurytrema coelomaticum* and *Eurytrema pancreaticum*. **Parasitology Research**, v. 100, p. 645-646. 2007.
- ZIEGLER, J. C. S; VIDOTTO, O; MARQUES, F. A. C; ROCHA, M. A; YAMAMURA, M. H; VILLAS BOAS, L. L. Prevalência de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos abatidos em Londrina, procedentes de diferentes microrregiões do estado do Paraná, Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 1, 1984, Londrina. **Resumos...** Londrina: UEL, 1984.

7 ANEXOS

Author's personal copy

Veterinary Parasitology 177 (2011) 72–78



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Light and scanning electron microscopy of sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907

Daniele Oliveira Franco-Acuña^{a,b}, Jairo Pinheiro^{c,*}, Aleksandra Oliveira-Menezes^d, Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini^e, Renato Augusto DaMatta^f, Wanderley de Souza^g

^a Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRJ, Seropédica, RJ, Brazil

^b Secretaria Municipal de Educação do Rio de Janeiro, Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Área de Biociência, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, UFRJ, BR465, km 7, 23.900-000 Seropédica, RJ, Brazil

^d Laboratório de Biologia de Helminthos Otto Wucherer, Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Área de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRJ, Seropédica, RJ, Brazil

^f Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

^g Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 September 2010
Received in revised form
19 November 2010
Accepted 22 November 2010

Keywords:
Eurytrema coelomaticum
Scanning electron microscopy
Light microscopy
Morphology
Sporocyst

ABSTRACT

Eurytrema coelomaticum is a fluke that infects ruminants in South America, Europe and Asia. The morphology of the mother and daughter sporocysts of *E. coelomaticum* obtained from *Bradybaena similans*, the first intermediate host, is described for the first time by light and scanning electron microscopy. The intermediate host was exposed to *E. coelomaticum* eggs and after 30 days the mother sporocyst was found in the coelom adhered to the intestine wall. This sporocyst was a rounded or elongated mass (0.1078 mm), with numerous germinal balls in it, and a folded tegument with no specializations. The daughter sporocysts obtained following dissection of infected snails have varied shape, one hollow tapered region with many transversal and longitudinal striations, named anterior end. The expelled daughter sporocyst presented an oval sac-like central region with a small anterior and a posterior longer filament-like prolongation. The measures of the expelled sporocysts are presented and compared to previous descriptions.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Eurytrema coelomaticum (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907 is a common fluke widely distributed in South America, Europe and Asia; adults are found in pancreatic and bile ducts of ruminants, including cattle and domestic animals (Chinone et al., 1984). This trematode is of veterinary and medical importance, because its infection causes lower production of meat and milk and eurytrematosis has high occurrence in Brazilian cattle, mainly in the South and

Southern regions (Bossart et al., 1989; Ilha et al., 2005; Bassani et al., 2006).

Giard and Billet (1892) have described the digenetic trematode as *Distoma coelomaticum*, later this species was allocated in a new genus created by Looss (1907), and was named *E. coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907. Only in 1977, Tang and Tang published in China a study on the biology and epidemiology of *E. coelomaticum* and *Eurytrema pancreaticum*, with some morphological descriptions of the larval stages of both parasites. However, this publication is in Chinese, limiting its access. After this, Sakamoto et al. (1980, 1984) described the anthelmintic effects on adult worms. Sakamoto et al. (1985) and Sakamoto and Oikawa (2007) studied some structures of the adult of

* Corresponding author. Tel: +55 21 26814825; fax: +55 21 26823222.
E-mail address: jps@ufrj.br (J. Pinheiro).

E. coelomaticum using transmission electron microscopy. Brandolini and Amato (2001) made a histological analysis of the migration route of *E. coelomaticum* in the intermediate snail host *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821). Therefore, little has been reported about the morphology of larval stages of *E. coelomaticum*.

In its life cycle, the miracidium, inside the egg, is ingested by the snail host and hatches in the lumen of the intestine, penetrates through its intestinal wall and adheres to the peri-intestinal connective tissue region, where it grows until it transforms into the mother-sporocyst (Basch, 1966). Asexually, the mother sporocyst generates daughter sporocysts that are released after maturation and degeneration of the mother tegument. After an additional asexual reproduction, the cercariae develop within the daughter sporocysts, completing the intramolluscan development of *E. coelomaticum*. Brandolini and Amato (2001) showed that the prepatent period to *E. coelomaticum* in *B. similaris* was 107 days in autumn and 79 days in late spring in Brazil. It has been shown that the parasitic castration of *B. similaris* induced by *E. coelomaticum* infection is caused by a nutritional process (Pinheiro and Amato, 1994) with no involvement of RNA and DNA alteration in albumen gland-ovotestis complex of infected snails (Pinheiro and Amato, 1995). Paschoal and Amato (1996) showed an abnormal gametogenesis in *B. similaris* infected with *E. coelomaticum* corroborating the previous authors. In the same parasite-host system, Paschoal and Amato (1993) showed that the strong positive relation between calcium content of the shell and its diameter was lost when the *B. similaris* snails were infected with *E. coelomaticum*. Thus, the mother and daughter sporocysts are important targets to study the biology of the parasite and its relationship with the intermediate snail host, and the information obtained may be important for the control of this parasitic disease.

The morphological analysis of adults and larval stages can reveal aspects of the cell biology of helminths, with possible taxonomic value (Ehlers, 1985) and constituting an important tool to understand the parasite physiology (Bergquist and Coley, 1998), which may allow the development of research on control (Doenhoff, 1998), anthelmintic resistance (Mountford and Harrop, 1998), development and optimization of new drugs (Wilson and Coulson, 1998), immunology and pathology of the host (Molyneux and Davies, 1997; Roberts and Suhardono, 1996), diagnostics (Thompson et al., 1996) and vaccines (Damian, 1987). It is surprisingly the lack of information about morphology and ultrastructure of intramolluscan larval stages of *E. coelomaticum*. The purpose of this study was to provide additional morphological information by histology, light and scanning electron microscopy (SEM) of the mother and daughter sporocysts of *E. coelomaticum*.

2. Materials and method

2.1. Snails collection and maintenance

Specimens of *B. similaris* were manually collected from residential gardens located at Seropédica, RJ, Brazil (latitude $-22^{\circ}44'28''$, longitude $43^{\circ}42'27''$, height 26 m). The snails were examined through their transparent shells for

the presence of *Posthodiplostomum minimum* metacercariae in the pericardial cavity and those animals free of infection were maintained under laboratory conditions in a terrarium with a layer of 2 cm of earth. The terrariums were moistened with tap water and the snails were fed with fresh lettuce leaves in alternate days. Samples of randomly chosen snails were dissected to ensure that the snails were free of larval helminths. Snails free of helminthic infection were experimentally infected.

2.2. *Eurytrema coelomaticum* collection, eggs obtaining and experimental infection

The adult worms were collected from the pancreas of naturally infected bovines that were slaughtered in an industrial abattoir (Matadouro Municipal de Barra Mansa, Barra Mansa, RJ, Brazil). The adult worms were kept overnight in Petri dishes with Locke's saline solution (Humason, 1979). Adult worms were discarded and eggs were sedimented. The eggs were washed three times in Locke's solution and stored at 10°C until their utilization.

The eggs were spread on pieces of fresh lettuce leaves in Petri dishes with a moistened filter paper at the bottom, and the snails were put over the lettuce leaves. The Petri dishes were closed and the snails were maintained in contact with eggs overnight. After this period, they were transferred to terrariums and maintained as described above.

2.3. Snail dissection, larvae collection and processing

The snails were dissected at 30 and 60 days post-exposure and after this last period weekly. The collected larvae were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. For light microscopy (LM) observations the fixed larvae were mounted on glass slides, observed and measured using an Olympus BX51 and the images were captured with an Olympus DP12 camera or a Zeiss Axiovision system. Measured values are presented as means and standard deviation with minimal and maximal results in parenthesis.

Infected snails were fixed in Dubosq-Brasil fixative (Brandolini and Amato, 2001) for 24 h at 4°C . The soft tissues were removed from the shell and maintained in 70% ethanol. The tissues were processed following routine histological techniques (Humason, 1979). The sections with $5\ \mu\text{m}$ were obtained using a Libshaw microtome, mounted on glass slides, stained with hematoxylin and eosin, and observed as described above.

For SEM the fixed larvae were washed three times in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide, and washed again in the same buffer. The larvae were dehydrated in a crescent ethanolic series and critical point dried using CO_2 (Baltec CPD). In some experiments, the dried specimens were mechanically fractured. The sporocysts were mounted on metallic stubs and golden coated (Pinheiro et al., 2004). The observations were made using a Zeiss DSM962 or a Jeol SEM5310 scanning electron microscope, operating at 20 kV. The images were obtained using the Semafore software.

3. Results

3.1. Mother sporocysts

After 30 days of exposure of the snail to *E. coelomaticum* eggs the mother sporocysts appeared as a mass of cells adhered to the coelomatic surface of the intestinal wall (Fig. 1a). According to the location at the intestinal surface of the snail the mother sporocyst were seen as a round or elongated mass (Fig. 1b and c) with 0.1078 ± 0.0269 mm (0.096–0.1196 mm). Inside the mother sporocyst it was possible to observe numerous germinal cells forming groups, known as "germ balls", which give rise to daughter sporocysts. The tegument was composed by a layer of few cells (Fig. 1b and c). The outer surface of the tegument had no specializations, presenting only some foldings and after fracture of the specimen it was possible to observe the thin membranous wall of the tegument (3.0–4.5 μ m thick), and the germinal cells and muscle fibers inside the larva (Fig. 1d).

3.2. Daughter sporocysts

The observed daughter sporocysts were of two types: (i) larvae from snails experimentally infected and dissected at 82–100 days of infection; and (ii) larvae

naturally expelled by the infected snails at 79–120 days of infection.

3.3. Dissected sporocysts

The larvae from early dissections (Fig. 2a) were smaller than those from later dissections that were also more elongated (Fig. 2b). They had, at least, one extremity of the body constricted, but it was also possible to observe constrictions in the middle region of the body (Fig. 2c and d). Tang and Tang (1977) reported that each larva develops a proboscis-like portion at the anterior end. The same structure was observed in the present study (Fig. 2a, b and f). This larval stage did not present oral aperture. Thus, the hollow tapered end is named anterior end, and the elongated end the posterior region. In the tapered region are concentrated the cercariae in development tightly packed by an inner tegument highly folded, named endocyst, which was already separated from the external sac, when dissected sporocysts were observed (Figs. 2e and 3a).

The external surface of the tegument was folded presenting well defined transversal and concentric striations at the anterior end of the larval body (Fig. 3b, c and d). These striations ended in a blind cavity at the hollow tapered region (Fig. 2e and f). When observed by SEM the tegument showed striations that were interrupted by longitudinal

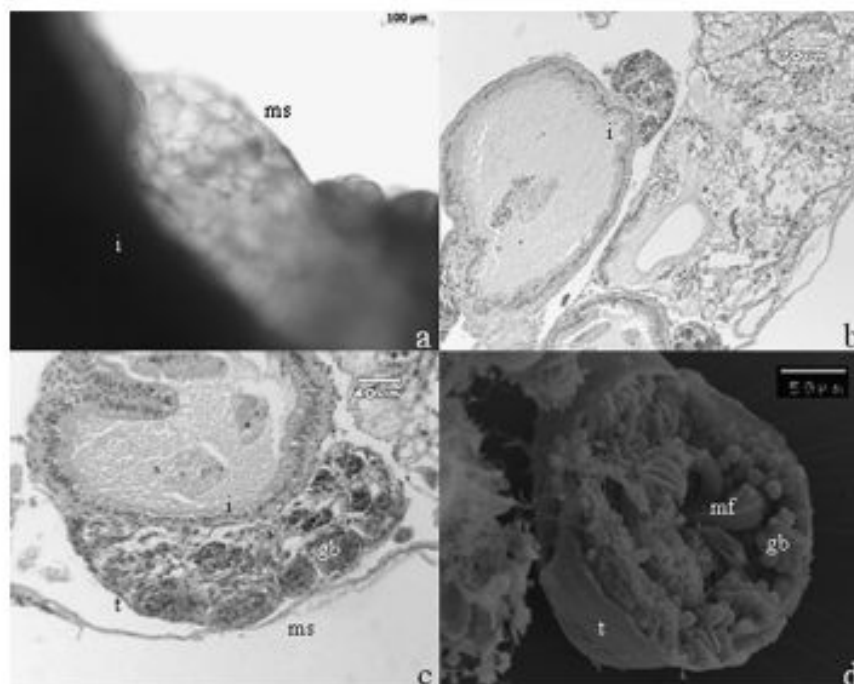


Fig. 1. *Eurytrema coelomaticum* mother sporocysts. (a) LM of a mother sporocyst (ms) adhered to the coelome surface of the intestinal wall (i). (b and c) Histological sections of *Bradybaena similis* experimentally infected with *E. coelomaticum* showing different positions of the mother sporocyst (ms) developing in the snail intestinal wall (i). Note the tegument (t) and germinal balls (gb). (d) SEM of a fractured specimen of *E. coelomaticum* sporocyst showing the tegument (t), germinal cells (gc) and muscle fibers (mf).

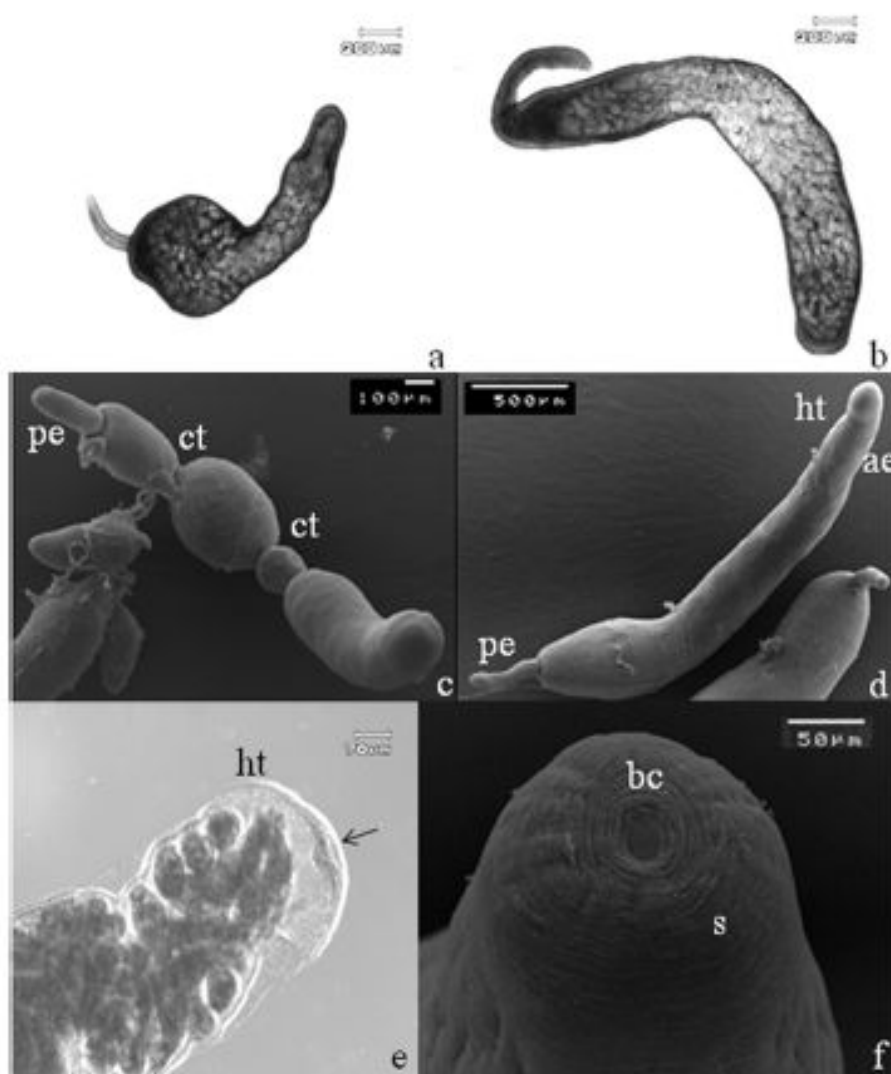


Fig. 2. *Eurytrema coelomaticum* daughter sporocysts obtained from experimentally infected *Bradybaena similis* at different times. (a and b) LM of whole larvae, showing variation in shape. (c) SEM of larvae showing constrictions (ct) at the middle of the body, the elongation at the posterior end (pe) of the body and the hollow tapered anterior end. (d) SEM of another larvae showing the elongated posterior end (pe) and the hollow tapered (ht) anterior end (ae) region. (e) LM of sporocyst from dissection showing the anterior end with the hollow tapered region (ht), proboscis-like, with the blind cavity, sucker-like (arrow), anteriorly located. (f) SEM of anterior end of daughter sporocyst with the blind cavity (bc) and striations (s).

striations, which were more conspicuous at the anterior end of the body (Fig. 3c, d and e). This hollow region presented a granular and dense aspect with dark appearance under the LM (Fig. 3a).

3.4. Expelled sporocysts

When expelled, the sporocyst had a whitish color in the center of the body and was transparent at both ends (Fig. 3f)

and had a total length of 5.280 mm (4.450–5.950 mm). As described before for *E. pancreaticum* (Tang, 1950), *E. coelomaticum* sporocysts also have a transparent oval sac-like region. The middle of the body was swollen, exhibiting a round or oval sac-like shape; the anterior terminal portion had a short prolongation as one filament, and the posterior region a longer filament-like prolongation (Fig. 3g). This swollen region measured about 1.287 mm (1.000–1.500 mm) in length and 0.095 mm

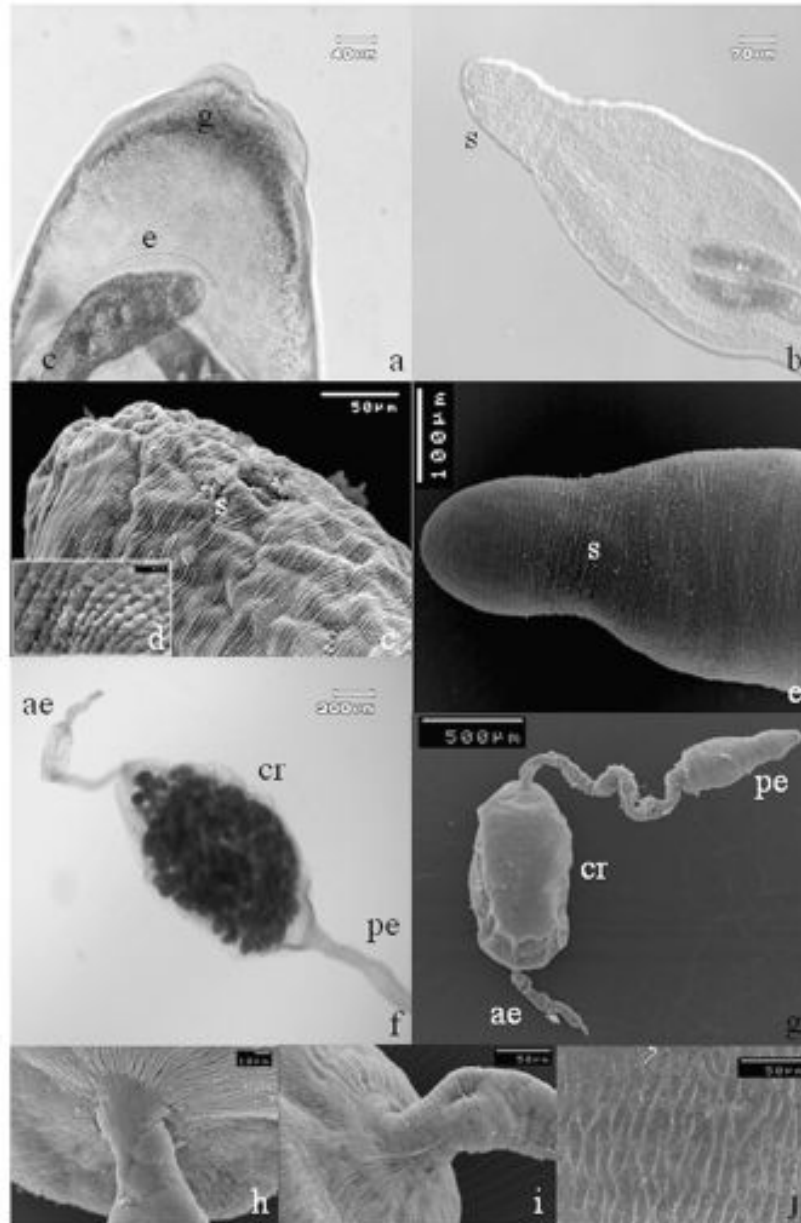


Fig. 3. Daughter sporocysts of *Eurytrema colomastix*. (a) LM of daughter sporocyst obtained from dissections of *Bradybaena similaris* experimentally infected showing hollow tapered anterior end of sporocyst daughter body, with the blind cavity (bc) and granular aspect (g). The cercariae (c) are completely formed and the endocyst (e) is visible. (b) LM of anterior end of daughter sporocyst body, from dissections of snail host, with transversal and concentric striations (s). (c) SEM of transversal and concentric striations (s) throughout the larvae body. (d) SEM of detail of transversal striations showing the longitudinal striations in the tegument surface. (e) SEM of anterior end of the sporocyst body with hollow tapered aspect and many concentric striations (s). (f) LM of daughter sporocyst expelled by *Bradybaena similaris* experimentally infected showing the transparent oval sac-like central region (cr) of the body and both prolongations, the smallest anterior end (ae) and the longer posterior end (pe). (g) SEM of whole daughter sporocyst expelled by *B. similaris* experimentally infected, showing the anterior end (ae), the middle of the body (cr) and the posterior end (pe). (h and i) SEM of region of the formation of the anterior and posterior filaments, respectively. (j) SEM of a daughter sporocyst expelled showing a detail of the external surface of the tegument.

(0.700–1.400 mm) in width. The anterior filament was 0.712 mm (0.0425–0.0950 mm) in length and the posterior filament was larger than the anterior one, 3.250 mm (2.450–3.775) in length. The point of origin of the anterior and posterior filaments is viewed in Fig. 3h and i, respectively. The tegument of the larvae presents many foldings with different orientations (Fig. 3j).

4. Discussion

Looss (1907) redescribed *D. coelomaticum* and proposed the new genus *Eurytrema* based only in characters observed in the adult worm. Only in 1977, Tang and Tang included in their study characteristics of the larval stages of *E. coelomaticum*, such as morphometrical description of the intramolluscan larval development. Since then, the morphology of the *E. coelomaticum* intramolluscan larval stages was forgotten. Beyond this, they reported some biological and epidemiological aspects of *Eurytrema* species, presenting some characteristics of *E. coelomaticum*, but they focused only on morphometrical characters and the images were presented as drawings. This lack of information leads us to describe in this work the morphology and characteristics of the larval stages of *E. coelomaticum* and to compare it with data on the morphology of *E. pancreaticum* that has been reported by Tang (1950).

The morphology of *E. coelomaticum* presented in this paper is based on histology, direct LM and SEM observations, and adds new features for the species identification only observed by these techniques. The mother sporocysts had an amorphous structure adhered to the coelome wall of the intestine of the snail. This larva had a diameter of 0.096 mm in its rounded position, which is higher than the size reported by Tang (1950) to *E. pancreaticum* (0.092 mm), and the ones presented by Tang and Tang (1977), who showed drawings of *E. coelomaticum* mother sporocysts in different developmental stages with diameter varying between 0.040 and 0.050 mm. Tang and Tang (1977) used as intermediate host two species of snail: *B. similaris* and *Cathaica ravidia sieboldiana*. However, when they presented the morphometrical results they did not separate the measurement from the larvae obtained for each snail host species. Thus, the difference in size between their work and the ones reported here may be related to differences in the intermediate host snail. Another factor that influences the size of the larvae is the temperature during development; larvae that develop at higher temperatures are smaller. Differences in temperature may also explain the distinct measurements between the studies. Besides these morphometrical differences, the mother sporocysts did not present lobes as described by Tang (1950), who reported the presence of lobes in completely developed mother sporocysts of *E. pancreaticum*.

The daughter sporocysts expelled by the snails host had a varied morphology. But they were smaller than those of *E. pancreaticum* measured by Tang (1950), which were: 6.9–7.9 mm in total length; 0.7–1.0 mm in width. Later, in 1977, Tang and Tang found the same measurements for *E. coelomaticum*.

Jang (1969) showed some figures of larval stages of *E. pancreaticum*, but the mother and daughter sporocysts were shown in a general view in groups of larvae after they were expelled by the first intermediate host snail. Our observations are the first to present morphometrical characters of *E. coelomaticum* sporocysts and morphological aspects, as seen by LM and SEM, including mother sporocysts, daughter sporocysts in development and after being expelled by the snail host. The topography of *E. coelomaticum* sporocysts tegument present many folds and striations that increase the absorption surface, an important feature, once the sporocysts do not have an aperture and all nutrients need to be absorbed through their tegument. The presence of an anteriorly located blind cavity, a sucker-like structure, anteriorly located is first described here, and is probably an important structure for fixation of the larva to the host tissues during their development.

The presence of two envelopes composing the body wall of sporocysts constitute an important feature for physical protection of the cercariae and to avoid the excessive desiccation of the larvae when they leave the snail host and are exposed to the external environmental conditions.

The sporocyst is the most important stage of the intramolluscan larval development, because intense asexual multiplication occurs allowing the formation of hundred of cercariae from only one miracidium. Thus, this is an important stage to be controlled avoiding eurytrematosis in bovine cattle.

Acknowledgements

We thank Beatriz Ferreira Ribeiro, Giovana Alves de Moraes and Márcia Adriana da Silva for technical support. This work is financially supported by Fundação de Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). JP is a FAPERJ post-doctoral and RAD and WS are CNPq fellows.

References

- Basch, P.F., 1966. Patterns of transmission of the trematode *Eurytrema pancreaticum* in Malaysia. *Am. J. Vet. Res.* 27, 234–240.
- Bassani, C.A., Sangioni, L.A., Saut, J.P.E., Yamamamura, M.H., Heatley, S.A., 2006. Epidemiology of eurytrematosis (*Eurytrema* spp. Trematoda: Dicrocoeliidae) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the State of Paraná, Brazil. *Vet. Parasitol.* 141, 356–361.
- Bergquist, N.R., Coley, D.C., 1998. Schistosomiasis vaccines: research to development. *Parasitol. Today* 11, 191.
- Bossaert, K., Coignoul, F., Kumar, V., 1989. *Eurytrema coelomaticum* infection in an abattoir in South Brazil. *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.* 69, 263–268.
- Brandolini, S.V.P.B., Amato, S.B., 2001. Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae). *Rev. Bras. Zool.* 18, 499–502.
- Chinone, S., Fukase, T., Itagaki, H., 1984. Experimental infection of domestic cats with *Eurytrema pancreaticum* and *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Jap. J. Parasitol.* 33, 29–39.
- Damian, R.T., 1987. The exploitation of host immune responses by parasites. *J. Parasitol.* 73, 3–13.
- Doenhoff, M.J., 1998. A vaccine for schistosomiasis: alternative approaches. *Parasitol. Today* 14, 105.

- Ehlers, U., 1985. Phylogenetic relationship within Platyhelminthes. In: Morris, S.C., George, J.D., Gibson, R., Platt, H.M. (Eds.), *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*. Oxford University Press, Oxford, USA, pp. 143–158.
- Giard, A., Bilet, A., 1892. Sur quelques Trématodes parasites des boeufs du Tonkin. *C. R. Soc. Biol.* 94, 613.
- Hamason, G.L. (Ed.), 1979. *Animal Tissue Techniques*. W. H. Freeman and Company, CA, USA, 661 pp.
- Itha, M.R.S., Loretti, A.P., Reis, A.C.F., 2005. Wasting and mortality in beef cattle parasitized by *Eurytrema coelomaticum* in the State of Paraná, Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 133, 49–60.
- Jang, H., 1969. Studies on the *eurytrema coelomaticum*. II. Life cycle. *Kor. J. Parasitol.* 7, 178–200.
- Looss, A., 1907. Some parasites in the Museum of the School of Tropical Medicine, Liverpool. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1, 123–154.
- Molynaux, D.H., Davies, J.B., 1957. Onchocerciasis control: moving towards the millennium. *Parasitol. Today* 13, 418.
- Mountford, A.P., Harrop, R., 1998. Vaccination against schistosomiasis: the case for lung-stage antigens. *Parasitol. Today* 14, 109–114.
- Paschoal, S.V., Amato, S.B., 1993. Consumo de oxigênio e reserva glicolítica em *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda: Xanthonychidae) infectada com *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Bilet, 1892) (Digenea: Dicrocoeliidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2, 115–118.
- Paschoal, S.V., Amato, S.B., 1996. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Bilet) (Digenea: Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda: Xanthonychidae): alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. *Rev. Bras. Zool.* 13, 411–418.
- Pinheiro, J., Amato, S.B., 1994. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae): the effects of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 407–410.
- Pinheiro, J., Amato, S.B., 1995. *Eurytrema coelomaticum*: influence of the infection on the reproduction and the nucleic acids contents in the albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similaris*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 635–638.
- Pinheiro, J., Maldonado, A., Landredi, R.M., 2004. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma parvum* (Trematoda, Echinostomatidae). *Vet. Parasitol.* 121, 265–275.
- Roberts, J.A., Suhardono, S., 1996. Approaches to the control of fascioliasis in ruminants. *Int. J. Parasitol.* 26, 971–981.
- Sakamoto, T., Kono, I., Yasuda, N., Yamamoto, Y., Nakagawa, H., 1980. Studies on *Eurytrema coelomaticum* II. The anthelmintic efficiency of nitroxylin and praziquantel against *Eurytrema coelomaticum* in cattle. *Mem. Fac. Agri. Kagoshima Univ.* 16, 93–101.
- Sakamoto, T., Kono, I., Motri, S., 1984. Studies on *Eurytrema coelomaticum* IV. Comparison anthelmintic effects of drugs against *Eurytrema coelomaticum* in vitro and in vivo. *J. Fac. Agr. Iwate Univ.* 17, 211–227.
- Sakamoto, T., Tanimura, I., Seki, I., 1985. Studies on *Eurytrema coelomaticum* V. Electron microscopical observations on the legument and associated structures of adult *Eurytrema coelomaticum*. *J. Fac. Agr. Iwate Univ.* 17, 307–319.
- Sakamoto, T., Oikawa, T., 2007. Cubic crystal protein inclusions in the neodermis of the pancreatic fluke *Eurytrema pancreaticum* and *Eurytrema coelomaticum*. *Parasitol. Res.* 101, 1393–1399.
- Tang, C.C., 1950. Studies on the life history of *Eurytrema pancreaticum* janson, 1889. *J. Parasitol.* 36, 559–574.
- Tang, Z., Tang, C., 1977. The biology and epidemiology of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Bilet, 1892) and *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) in cattle and sheep in China. *Acta Zool. Sin.* 23, 267–282.
- Thompson, D.P., Klein, R.D., Geary, T.G., 1996. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. *Parasitology* 113, S217–238.
- Wilson, R.A., Coulson, P.S., 1998. Why don't we have a schistosomiasis vaccine? *Parasitol. Today* 14, 97.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907

Jairo Pinheiro^{a,*}, Daniele Oliveira Franco-Acuña^b, Aleksandra Oliveira-Menezes^c, Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini^d, Wanderley de Souza^e, Renato Augusto DaMatta^f

^a *Área de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brazil*

^b *Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ, Secretaria Municipal de Educação do Rio de Janeiro, Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

^c *Laboratório de Biologia de Helmintos Otto Wucherer, Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

^d *Área de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brazil*

^e *Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

^f *Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biotecnologia, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2011

Received in revised form 18 May 2011

Accepted 23 May 2011

Keywords:

Ultrastructure

Eurytrema coelomaticum larval trematode

Morphology

Mother sporocyst

Daughter sporocyst

ABSTRACT

The digenetic trematode *Eurytrema coelomaticum* is a parasite of pancreatic ducts of ruminants. The ultrastructure of the mother and daughter sporocysts of *E. coelomaticum* was analyzed. The mother sporocyst was attached to the coelome of the intestine wall of intermediate snail host *Bradybaena similaris*, intimately adhered in some regions. It presents a highly folded tegument with granules and the body wall was composed by an outer syncytial layer, basal lamina, and circular and longitudinal muscle layer. Below was the cell body (cyton) with the nucleus. The daughter sporocysts obtained by dissection exhibited many granules and secretory vesicle in the outer layer indicating an intense secretory activity. The body wall presented the same layers of the mother sporocysts, but the outer syncytial layer invaginated and an amorphous layer was present between the syncytial and circular muscle layers. The protonephridial excretory system was viewed. The anterior and posterior end of the expelled sporocyst exhibit a degenerated structure, but biological activity still occurred in these regions. The swollen middle of the body was filled by a lamellar structure formed by degenerating membranes, but the excretory system was preserved. The endocyst wall was fibrillar and filled by cercariae and amorphous, membranous and secretory material inside it. These results were discussed.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Adults of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) (Looss, 1907) parasitizes the pancreatic ducts of ruminants in many countries in South America, Europe and Asia (Bassani et al., 2006), causing economic losses because

the infection leads to reduction in meat and milk production. Thus, this infection has a high veterinary and economic importance (Bossaert et al., 1989). In its complex life cycle the eggs of *E. coelomaticum* are ingested by the intermediate snail host *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) where the miracidium hatches and migrates to the coelomic cavity, giving rise to the mother sporocyst. After an intense asexual reproduction process, the daughter sporocysts is formed, which internally will produce the cercariae. The mother sporocysts, containing

* Corresponding author. Tel.: +55 21 26814825; fax: +55 21 26823222. E-mail address: jps@ufrj.br (J. Pinheiro).

41 cercariae, emerge from the snail host and remains in
42 the environment until ingested by a grasshopper Tettigoni-
43 dae (*Conocephalus* sp.), the second intermediate host
44 (Brandolini and Amato, 2001).

45 Some studies on the *E. coelomaticum*/*B. similis* inter-
46 relationship showed alterations in carbohydrate, calcium
47 and reproductive metabolism (Paschoal and Amato, 1993,
48 1996; Pinheiro and Amato, 1994, 1995; Brandolini and
49 Amato, 2001; Pinheiro et al., 2001). Because sporocyst is the
50 longest larval stage in the intramolluscan development and
51 intense asexual reproduction occurs, most of the metabolic
52 changes encountered in the snail host results from the
53 sporocyst action.

54 In spite of its crucial role in the development and
55 completion of the digenetic trematodes life cycle, there
56 are few studies on sporocysts morphology and ultra-
57 structure. Most studies are on *Schistosoma mansoni*
58 sporocysts (Meuleman et al., 1980; Fournier and Thérion,
59 1985; Yoshino and Laursen, 1995; Castillo and Yoshino,
60 2002).

61 Despite its great importance, there are few studies on
62 the biology and morphology of the different forms of *E.*
63 *coelomaticum*. Some studies on the morphology of adult
64 worms were made using light (LM), scanning (SEM) and
65 transmission (TEM) electron microscopy focusing on the
66 cubic crystal inclusions of the tegument (Sakamoto et al.,
67 1985; Eduardo and Sy, 2007; Sakamoto and Oikawa, 2007).
68 Looss (1907) presents only drawings of adult stage in the
69 redescription of *E. coelomaticum*. Since then, Jang (1969)
70 described the life cycle of *Eurytrema pancreaticum* pre-
71 senting only LM figures detailing the larval stages of this
72 parasite. Tang (1950) presents detailed description and
73 drawings of eggs and larval stages of *E. pancreaticum*.
74 Although only in 1977, Tang and Tang presented some
75 morphological characteristics of the larval stages of *E.*
76 *coelomaticum*, but their results were presented as drawings
77 based only in LM. Recently, Franco-Acuña et al. (in press)
78 showed a detailed description of the morphology of the
79 mother and daughter sporocysts of *E. coelomaticum* using
80 LM and SEM and histology.

81 Actually, the sporocyst is not considered a "germinal
82 sac" as proposed by Cable (1971). The main reason is
83 the absence of a mouth or oral aperture in the sporo-
84 cysts. Moreover, the tegument is described as a very
85 dynamic structure with intense absorption and secretion
86 processes, important for larvae survival. So, the changes
87 in infected snail host, cited above, with withdrawal of
88 nutrients, secretion of peptides for neuroendocrine mod-
89 ulation, involve transport of substances through this
90 tegument. Beyond this, the external surface of the sporo-
91 cyst tegument expresses receptors responsible for a
92 potential immune evasive strategy (Dunn and Yoshino,
93 1991).

94 So, the ultrastructural study of the sporocysts, par-
95 ticularly of their tegument, may result in important
96 information for further studies on the *in vitro* maintenance
97 and action of drugs for the control of this parasite in cattle.
98 Thus, the mother and daughter sporocysts and its relation-
99 ship with the intermediate snail host are important targets
100 to be studied. The information obtained may be important
101 for the control of this parasitic disease.

102 The aim of this study was to provide additional infor-
103 mation on the morphology of the mother and daughter
104 sporocysts of *E. coelomaticum* using TEM.

105 2. Materials and method

106 2.1. Snails collection and maintenance

107 Specimens of *B. similis* were manually collected from
108 residential gardens located at Seropédica, RJ, Brazil (lati-
109 tude -22°44'28", longitude 43°42'27", height 26 m). The
110 snails were examined through their transparent shells for
111 the presence of *Posthodiplostomum gallinum* metacercariae
112 in the pericardial cavity and those animals free of infection
113 were maintained under laboratory conditions in a terrar-
114 ium with a layer of 2 cm of earth. The terrariums were
115 moistened with tap water and the snails were fed with
116 fresh lettuce leaves in alternate days. Samples of randomly
117 chosen snails were dissected to ensure that the snails were
118 free of larval helminths. Snails free of helminthic infection
119 were experimentally infected.

120 2.2. *E. coelomaticum* collection, eggs obtaining and 121 experimental infection

122 The adult worms were collected from the pancreas
123 of naturally infected bovines that were slaughtered in
124 an industrial abattoir (Matadouro Municipal de Barra
125 Mansa, Barra Mansa, RJ, Brazil). The adult worms were
126 kept overnight in Petri dishes with Locke's saline solution
127 (Humason, 1979). Adult worms were discarded and eggs
128 were sedimented. The eggs were washed three times in
129 Locke's saline solution and stored at 10 °C until their uti-
130 lization.

131 The eggs were spread on pieces of fresh lettuce leaves in
132 Petri dishes with a moistened filter paper at the bottom, and
133 the snails were put over the lettuce leaves. The Petri dishes
134 were closed and the snails were maintained in contact with
135 eggs overnight. After this period, they were transferred to
136 terrariums and maintained as described above.

137 2.3. Snail dissection, larvae collection and processing

138 The mother and the daughter sporocysts were collected
139 after dissections of snails 30 and 60 days after exposure,
140 respectively. After 70 days post exposure, the snails were
141 maintained isolated in Petri dishes, with tap water moist-
142 ened filter paper at the bottom; the dishes were daily
143 observed under a stereomicroscope to check the presence
144 of expelled sporocysts. So, the larvae obtained formed three
145 groups: i – dissected mother sporocysts; ii – dissected
146 daughter sporocysts; and, iii – expelled daughter sporo-
147 cysts.

148 The collected larvae were fixed in 2.5% glutaraldehyde
149 in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4 for 24 h. For TEM the fixed
150 larvae were washed in 0.1 M cacodylate buffer, post fixed in
151 1% osmium tetroxide and 0.8% ferrocyanide, washed again
152 in the same buffer, dehydrated in a crescent series of ace-
153 tone, infiltrated and embedded in epoxy resin (Polybed).
154 Semi-thin sections were stained with toluidine blue and
155 observed under a Zeiss Axioplan light microscope; images

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

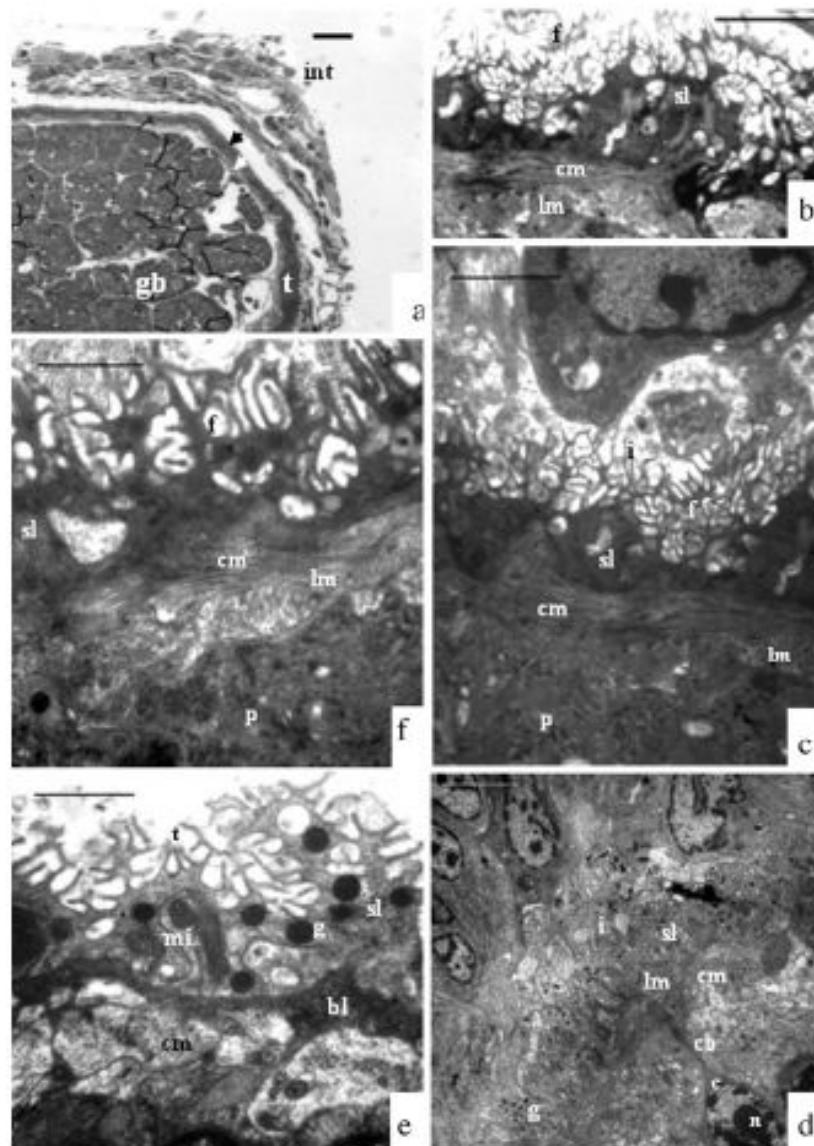
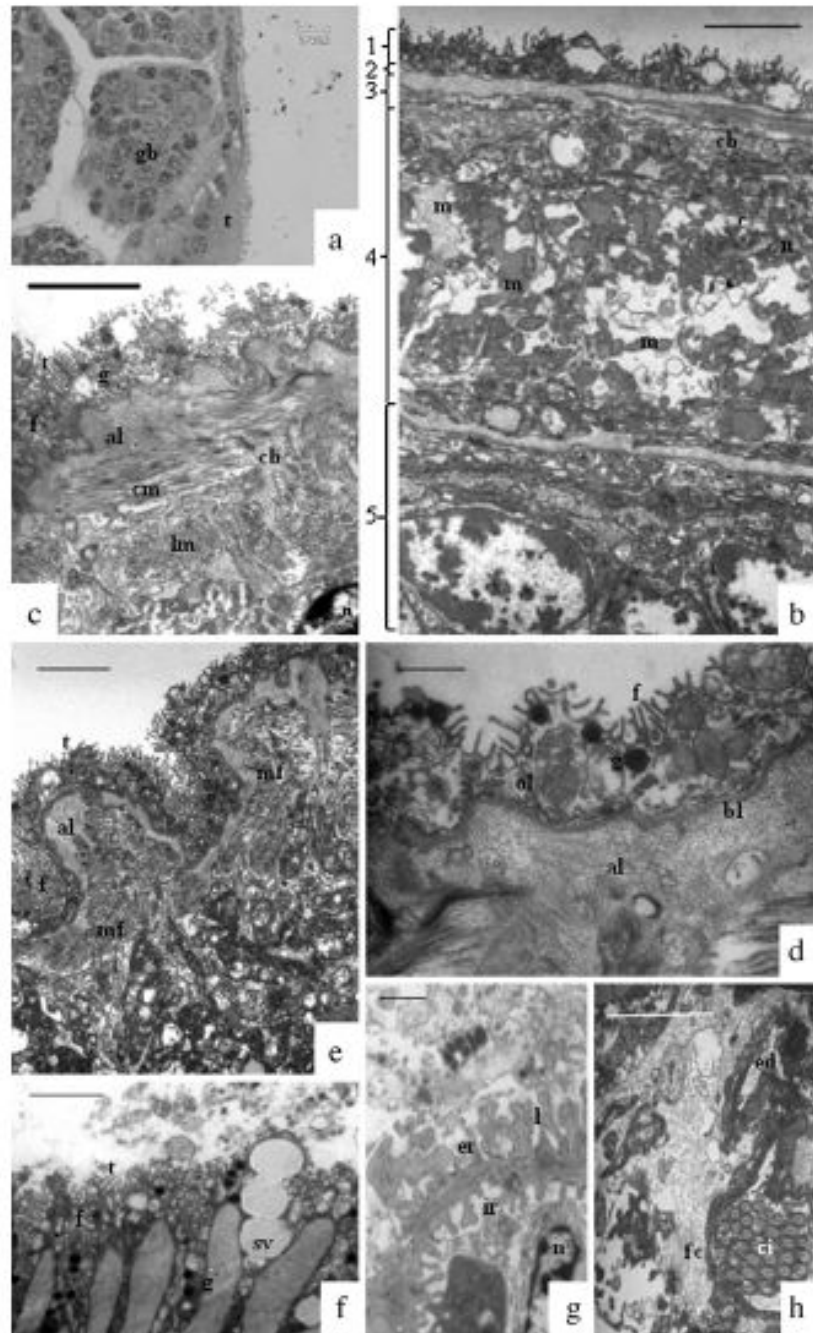


Fig. 1. Mother sporocysts of *Eurytrema coelomaticum*. (a) LM of a semithin section of a mother sporocyst adhered to the intestine wall of the intermediate snail host *Bradybaena similis*. Tegument and germinal balls are seen. Scale bar = 7 μ m. (b) Ultrathin layer of the tegument with many folds, syncytial layer, circular and longitudinal muscle layers. Scale bar = 2 μ m. (c) Detail of the tegument and its components. Scale bar = 1 μ m. (d) Interface between the developing mother sporocysts and the tissues of snail host. Scale bar = 2 μ m. (e) Detail of the tegument. A well defined basal lamina, mitochondria and many electron dense granules can be seen. Scale bar = 1 μ m. (f) Interface of the mother sporocyst and the snail showing the cytoplasmic bridge joining the syncytial layer to the cyton region with evident nucleus. Scale bar = 5 μ m (int = intestine wall; t = tegument; f = tegumental folds; gb = germinal balls; sl = syncytial layer; cm = circular muscle layer; lm = longitudinal muscle layer; p = parenchyma; mi = mitochondrion; g = granules; bl = basal lamina; i = interface; cb = cytoplasmic bridge; c = cyton).

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044



Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

152 were captured with an MRC5 AxioCam digital camera and
153 processed with the Axiovision program. Ultrathin sections
154 were stained with uranyl acetate and lead citrate (De Souza,
155 2007) and observed in a Zeiss 900 Transmission Electron
156 Microscope at 80 kV. The images were obtained using iTEM
157 Software.

158 3. Results

159 3.1. Mother sporocysts

160 The developing larva was adhered to the intestinal wall
161 (Fig. 1a). The transversal semithin sections of this form
162 showed that the tegument was divided in two different
163 regions: an external layer more electrondense and, immediately
164 below, an internal one, electrondense, followed by a body
165 cavity with germinal balls (Fig. 1a).

166 By TEM the tegument showed an external surface with
167 many projections and folds (Fig. 1b). Pieces of the intestine
168 with the larvae adhered to it were collected and processed.
169 In some points the interface between the larva and the tissue
170 of the snail host were observed (Fig. 1c and d). However,
171 at others it was difficult to define the limits between both
172 tissues (Fig. 1d), but some sections showed a considerable
173 space between the developing larva and the tissue host,
174 reaching about 3.8 μm (Fig. 1c).

175 Right below the surface of the larval body was located
176 a syncytial layer with many electrondense granules and
177 mitochondrial profiles (Fig. 1e). The syncytial layer rests
178 on a dense basal lamina whose thickness varies; in some
179 regions, it was very thin and almost imperceptible (Fig. 1a,
180 b, d and f). Below this basal lamina, a layer of circular
181 muscle fibers, followed immediately by a transversal
182 muscle fibers were seen (Fig. 1c, e and f). Desmosomes
183 or hemidesmosomes were not observed between the
184 basal lamina, circular or longitudinal muscle fibers.
185 Below the longitudinal muscle fibers, the parenchyma,
186 composed by somatic and germinal cells, was located
187 (Fig. 1d).

188 3.2. Daughter sporocysts

189 Two types of daughter sporocysts were described: (i)
190 dissected larvae from snails experimentally infected; and
191 (ii) larvae naturally expelled by infected snails.

192 3.2.1. Dissected sporocysts

193 The tegument was thicker in daughter sporocysts
194 ($10.36 \pm 4.75 \mu\text{m}$) than the mother sporocysts
195 ($2.58 \pm 0.39 \mu\text{m}$), presenting an external region highly

196 folded with nuclei located below it, indicating the cell
197 body or cyton (Fig. 2a). Transversal and longitudinal
198 ultrathin sections were obtained. In a general view, the
199 larval body may be divided in five different regions. The
200 tegument was composed by: 1 – outer syncytial layer; 2 –
201 an amorphous layer; 3 – muscular layer formed by circular
202 and longitudinal muscle. Below the tegument, cytons were
203 located (layer 4) followed by the central region of the body
204 where germinal balls were found (layer 5) (Fig. 2b).

205 The surface of the outer layer was highly folded (Fig. 2c
206 and d) presenting invaginations that protrudes through the
207 amorphous and circular muscle layers (Fig. 2d). The outer
208 layer of the tegument was connected to the inner layer
209 through cytoplasmic bridges that cross the muscular region
210 (Fig. 2c); it was supported by a membrane with a trilaminar
211 appearance and thicker inner region; an amorphous layer
212 was found right below this membrane with a fibrous view
213 (Fig. 2d). In the cyton region layer, nuclei and many mitochon-
214 drial profiles were observed (Fig. 2b and c). According to
215 the grade of muscle contraction, the organization of
216 these layers was lost and impossible to be differentiated
217 (Fig. 2e). The tegument region presented many vesicles and
218 granules mainly in the outer layer indicating an intense
219 secretory activity (Fig. 2f).

220 Excretory structures were observed in the cyton region
221 that was located $8.72 \pm 0.79 \mu\text{m}$ from the surface of the
222 larval body. The excretory system was protonephridial,
223 composed of flame cells (Fig. 2g and h) driving the excretory
224 products through the excretory channels. The base
225 of the flame cells is seen in Fig. 2g, the cell membrane of
226 the basal region presents cytoplasmic projections forming
227 internal and external ribs and leptotriches. Moreover, the
228 nuclei of the flame cell were located at this region. Barrel
229 cilia were observed in the apical portion of the flame cell
230 (Fig. 2h).

231 Cytoplasmic bridges were well observed in longitudinal
232 sections (Fig. 3a). It was also possible to identify the pres-
233 ence of hemidesmosomes joining the outer layer and the
234 circular muscle fibers, and the circular and the longitudi-
235 nal muscle fibers layers (Fig. 3b). This outer layer exhibited
236 many granules and mitochondrial profile (Fig. 3c). In this
237 direction of section, the basal lamina was evident, as well
238 as the amorphous layer below it (Fig. 3c). Different from
239 what was seen in transversal sections, longitudinally in
240 the contracted larva, the organization of the muscle layers
241 was maintained (Fig. 3d). Many granules, secretory vesicles
242 and channel-like structures where the secretory vesicles
243 emerge were observed (Fig. 3e and f). These secretory vesicles
244 open in the external surface of the larval body through
245 the outer layer (Fig. 3f).

196 Fig. 2. Transversal sections of daughter sporocyst of *Eurytrema coelomaticum* obtained from dissections of *Bradybaena similaris* experimentally infected. (a) Semithin section showing the tegument with nuclei and the body cavity with germinal balls. (b) General view of the different layers in the body wall of the sporocyst: 1: outer syncytial layer; 2: amorphous layer; 3: muscular layers; 4: inner layer with the cell body or cyton; 5: inner central region of the body with germinal balls. Scale bar = 2 μm . (c) Detail of body wall with an outer folded surface with granules followed by an amorphous layer, circular and longitudinal muscle layers. The cytoplasmic bridge and the cyton are evident. Scale bar = 1 μm . (d) The contracted larva showing disorganization of the muscular layers. Scale bar = 2 μm . (e) Detail of the syncytial layer with folds, granules, evident basal lamina and amorphous layer. Scale bar = 500 nm. (f) Secretory activity in the outer layer of the tegument. Scale bar = 2 μm . (g) Section at the base of a flame cell with the external and internal ribbed region, leptotriches and the nucleus. Scale bar = 2 μm . (h) Upper level of the flame cell at the barrel with cilia within the cylinder. Scale bar = 1 μm . (i) tegument; gb = germinal balls; cb = cytoplasmic bridges; m = mitochondrion; c = cyton; n = nucleus; al = amorphous layer; cm = circular muscle layer; lm = longitudinal muscle layer; g = granules; f = folds; mf = muscle fibers; bl = basal lamina; ol = outer layer; sv = secretory vesicle; er = external ribbed region; ir = internal ribbed region; l = leptotriches; fc = flame cell; ed = excretory duct.

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

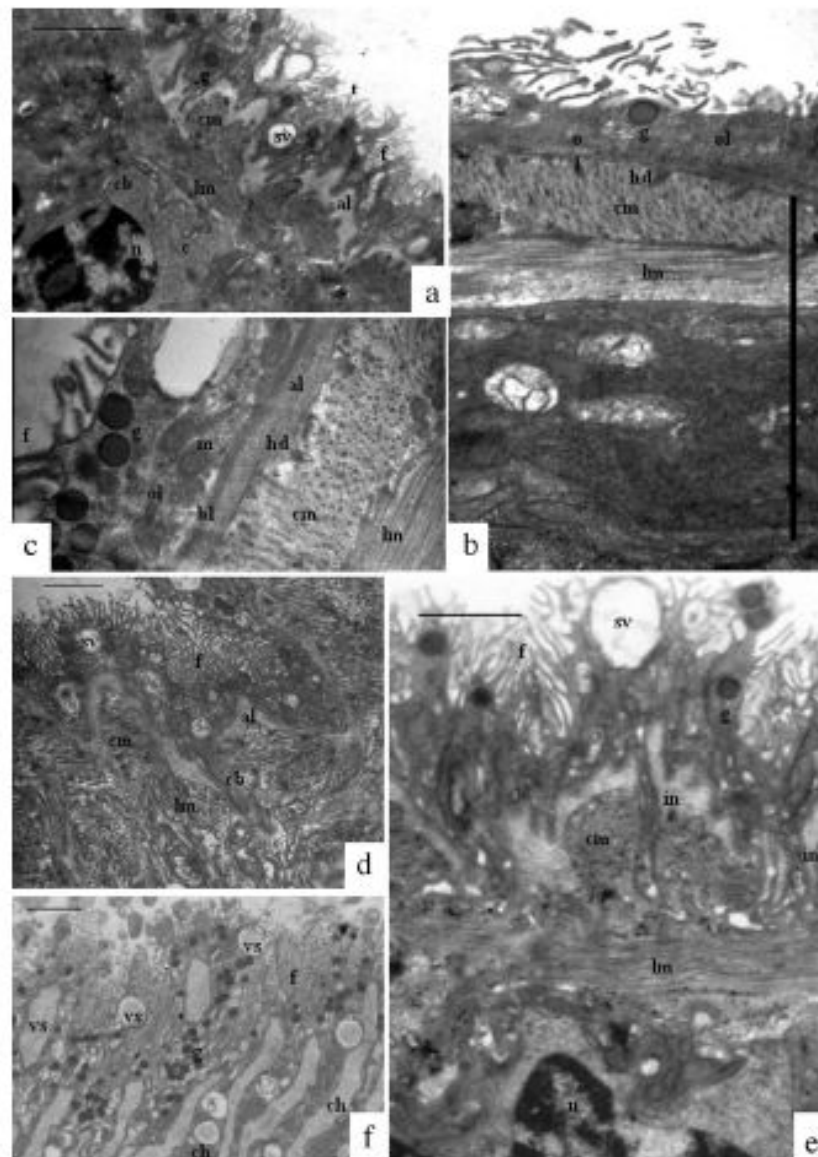


Fig. 3. Longitudinal sections of daughter sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* obtained from dissections of *Bradybaena striolaris* experimentally infected. (a) General view of the tegument with the outer layer with many folds, granules and secretory vesicle, followed by the amorphous layer, the circular and longitudinal muscle layers, the cell body (cyton) and the nucleus. Scale bar = 2 μ m. (b) Outer layer of tegument, with many granules and mitochondria, joined to the circular and longitudinal muscle layers by hemidesmosomes. Scale bar = 2 μ m. (c) Detail of the outer, amorphous and muscular layers of the tegument. Scale bar = 500 nm. (d) Observation of the body of a contracted larva. Scale bar = 2 μ m. (e) Release of a secretory vesicle and an invagination crossing the circular muscle layer. Scale bar = 1 μ m. (f) Formation and release of many secretory vesicles and granules. Scale bar = 2 μ m (t = tegument; cb = cytoplasmic bridges; m = mitochondrion; c = cyton; n = nucleus; al = amorphous layer; cm = circular muscle layer; lm = longitudinal muscle layer; g = granules; f = folds; mf = muscle fibers; bl = basal lamina; ol = outer layer; sv = secretory vesicle; hd = hemidesmosome; ch = channel; in = invagination).

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billel, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

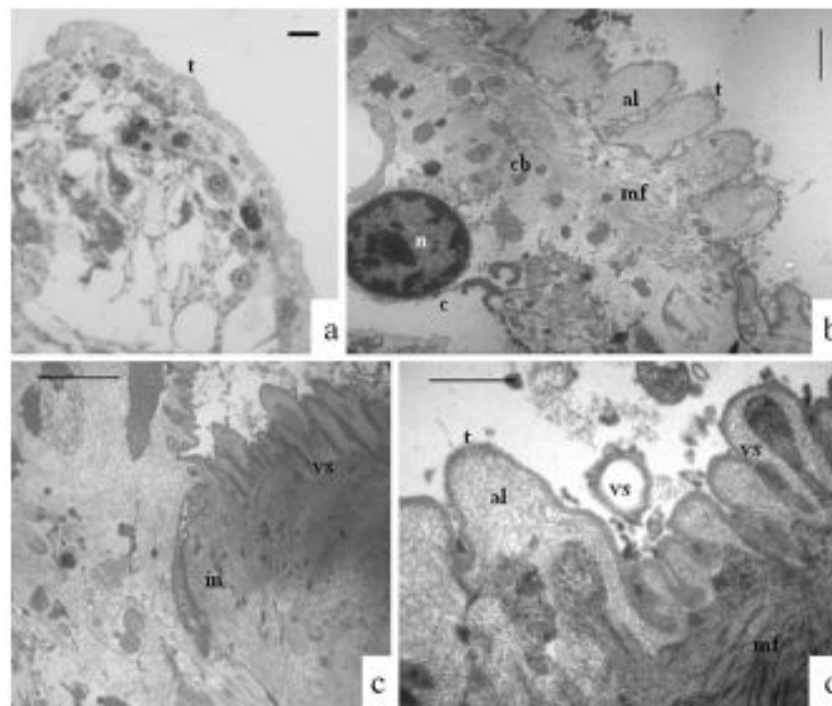


Fig. 4. Transversal section of the anterior end of expelled sporocysts of *Eurytrema coelomaticum*. (a) Semithin section showing the tegument and the body cavity without developing larvae. Scale bar = 7 μm . (b) Tegument with folds that are larger in size and filled by an amorphous layer. Note the disorganization of the muscular layers joined to the cell body (cytoch) by a cytoplasmic bridge. Scale bar = 2 μm . (c) Region of folded tegument and secretory activity, with the amorphous and muscular layers degenerated. Scale bar = 2 μm . (d) Detail of formation and release of secretory vesicles at the top of the tegumental folds. Scale bar = 500 nm (t = tegument; cb = cytoplasmic bridges; c = cyton; n = nucleus; al = amorphous layer; mf = muscle fibers; vs = secretory vesicle; in = invagination).

3.2.2. Expelled sporocysts

The ultrathin sections of the expelled sporocysts of *E. coelomaticum* were obtained in the anterior, middle and posterior regions of the larva body.

3.2.2.1. Anterior region. Semithin sections showed a thick tegument and no developing larvae (Fig. 4a). The tegument of this region presented an external surface with greater folds (1.47 μm) than those observed in the dissected sporocysts (0.15 μm); the circular and longitudinal muscle layers were not distinguishable (Fig. 4b). No differentiation of the outer layer, basal lamina and amorphous layer were seen; in some sections the muscular layers were not observed (Fig. 4c and d).

3.2.2.2. Middle region. Semithin sections showed a very thin tegument and one large space below where cellular structures were not identified. In this region the endocyst with a well defined wall and the cercariae were observed (Fig. 5a).

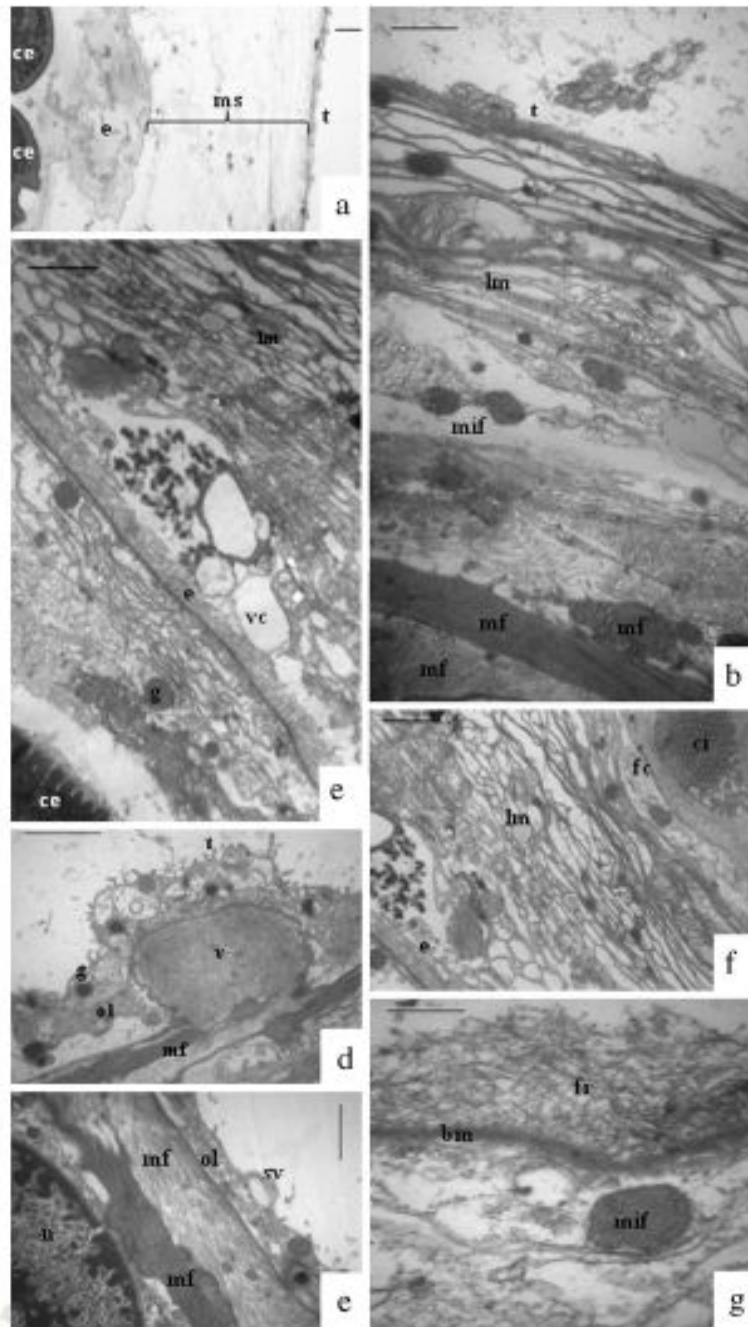
The region of the membranous sac did not present cellular structures, and its inner region had many membrane-like structures forming lamellae; myelin figures were also observed (Fig. 5b). Vacuolar structures were

located near the endocyst (Fig. 5c). In some sections the muscular layers were located adjacent to the external surface of the tegument (Fig. 5d and e), but in others these layers were far separated from each other (Fig. 5b). The excretory system of the larva was located in the membranous sac region, where flame cell was observed (Fig. 5f), at the periphery in the expelled sporocyst.

Internally, protected by the membranous sac, was the endocyst, in which the cercariae developed; the external wall of the endocyst was composed by a fibrillar structure, supported by a basal lamina (Fig. 5c and g). In the endocyst, lamellar structures, amorphous material and myelin figures were also observed (Fig. 5c); the cercariae seem to be partially involved by this amorphous material.

3.2.2.3. Posterior region. The external region showed some projections. Below this region, a continuous and less electron-dense layer was observed and in the body cavity there were no cercariae (Fig. 6a). The tegument was highly branched, with many myelin figures (Fig. 6b–e). A space between this outer layer and a highly electron-dense membrane was seen suggesting it was detached from the larva body (Fig. 6e); the membrane had invaginations for which the outer layer protrudes (Fig. 6b) crossing the continuous

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044



Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

285 amorphous layer and the circular and longitudinal muscle
286 layers (Fig. 6b and d). The integrity of the muscle area seems
287 to be lost (Fig. 6b), and below them the cytoplasmic bridges
288 and the cyton region, with nucleus, were preserved (Fig. 6b
289 and d).

300 4. Discussion

301 The trematode *E. coelomaticum* is the agent of
302 bovine eurytrematosis that causes ductal obstruction
303 with a subsequent interstitial pancreatitis resulting in
304 low productivity and rejection of pancreas in abattoirs.
305 Furthermore, it infects other domestic and wild ruminants,
306 acquiring great economic and ecological importance
307 (Bossaert et al., 1989; Bassani et al., 2006). Surprisingly, to
308 date no studies on the ultrastructure of adult and larval of
309 *E. coelomaticum* were made. Only recently Franco-Acuña et al.
310 (in press) begun to study the morphology and ultrastruc-
311 ture of the larval stages of *E. coelomaticum* focusing on the
312 topography of the mother and daughter sporocysts, using
313 LM and SEM and histology. Here, we analyzed the mother
314 and daughter sporocysts using TEM.

315 According to Tang (1950) and also described by Franco-
316 Acuña et al. (in press), the mother sporocyst is closely
317 surrounded by the tissue host. However, TEM observations
318 revealed a well defined space between the developing larva
319 and the intestine of the snail host and in other region the
320 larva was completely adhered to this tissue, which is not
321 easily seen under LM or histological sections (Franco-Acuña
322 et al., in press).

323 The external surface of the mother sporocyst seems to
324 be smooth under LM (Jang, 1969), and is cited by Franco-
325 Acuña et al. (in press) as presenting some folds. Here, this
326 tegument was observed as highly folded forming a tangled
327 mesh at the external surface corroborating with Franco-
328 Acuña et al. (in press). It must be remembered that the
329 sporocysts have not an oral aperture (Cable, 1971); so,
330 all the nutrients required for the intense plastic processes
331 involved in the asexual reproduction are absorbed through
332 the tegument. Beyond this, the access of requirements is
333 facilitated by the deep invaginations which reach the cir-
334 cular muscle layer.

335 The daughter sporocysts obtained from dissections pre-
336 sented a well defined and thick tegument, with evident
337 nucleus, whose topography of larval body surface was care-
338 fully described by Franco-Acuña et al. (in press) by SEM;
339 their results by LM did not show details of the tegument
340 layers and their organization. When observed under TEM,
341 it was possible to define the different layers of the body
342 wall. Pinheiro and Amato (1994, 1995) analyzing daugh-
343 ter sporocysts of *Echinostoma parvensei* did not observe the
344 cytoplasmic bridges connecting the outer to inner tegu-

345 mental layer. In the present study, these bridges were
346 clearly shown in both transversal and longitudinal sections.
347 As observed in the mother sporocyst, the dissected daugh-
348 ter sporocysts presented a surface of tegument highly
349 folded, increasing the absorption surface as well as improv-
350 ing the adhesion of the larva to the host tissue.

351 When the larva is contracted the muscular layers
352 were disorganized, but when a longitudinal section was
353 observed the organization and separation of these layers
354 was still distinguishable. These observations showed that
355 the transversal constriction movements are more intense
356 than those of stretching and shrinking.

357 In both, mother and daughter sporocysts, the presence
358 of many electrondense granules and many mitochon-
359 drial profiles in the outer layer of the tegument indicates
360 an intense metabolic activity, corroborating the secre-
361 tion processes that consume large amounts of energy.
362 Furthermore, in the daughter sporocysts, beyond these
363 granules, were also observed secretory vesicles being
364 formed at the base of the outer layer and released at the
365 top of this region. These vesicles may carry to the outer
366 environment excretion/secretion products, as nitrogenous
367 products of degradation and substances that will modulate
368 the neuroendocrine system of the host, probably caus-
369 ing the changes extensively reported in the infected snail
370 (Brandolini and Amato, 2001; Pinheiro et al., 2001; Lira
371 et al., 2000; Souza et al., 2000; Pinheiro and Amato, 1995,
372 1994).

373 Perhaps the more intense secretory activity in the
374 daughter sporocysts as compared to the mother may be
375 related to the statement of Tang (1950) that in the latter
376 the early development is quite slow. This is further corrob-
377 orated by the fact that the mother sporocysts analyzed here
378 were still in the beginning of their development (30 days-
379 old). The observed mother sporocyst showed a metabolic
380 activity more intense than the daughter sporocyst, which
381 is evidenced by the presence of secretory vesicles and great
382 number of mitochondrial profiles, such increased activity
383 may be related not only to the high rate of asexual divi-
384 sion, but also with the differentiation processes to form the
385 cercariae in the daughter sporocysts.

386 Franco-Acuña et al. (in press) did not observe excre-
387 tory structures in *E. coelomaticum* using LM and SEM. Tang
388 (1950) describes the excretory system of *E. pancreaticum*
389 composed by one excretory opening on each side of the
390 body connected to an excretory tube that divides in three
391 tubules ended with a flame cell. In this study the flame
392 cell was observed in the inner layer of the tegument, at
393 the cyton region, placed near the body surface; part of the
394 excretory tubule was also observed. Furthermore, excre-
395 tory openings were not seen. These differences can be used
396 to differentiate both species.

397 **Fig. 5.** Middle swollen region of expelled sporocysts of *Eurytremata coelomaticum*. (a) Semithin transversal section showing the tegument surface of the
398 membranous sac filled by an amorphous material and the endocyst with the cercariae inside. Scale bar = 7 μ m. (b) The membranous sac region with
399 membranous structures inside forming lamellae and myelin figures, and degenerated muscle layers located far from the body surface. Scale bar = 3 μ m. (c)
400 Detail of the degenerated muscle layers placed near to the external surface of the body and secretory vesicle at the surface. Scale bar = 1 μ m. (d) Detail of a
401 projection at the external surface of the body and many granules. Scale bar = 2 μ m. (e) Flame cell located in the membranous sac region. Scale bar = 2 μ m.
402 (f) General view of the body showing the endocyst, with a cercaria, filled by membranes residues, amorphous material and granules. Scale bar = 2 μ m. (g)
403 Detail showing the fibrillar aspect of the endocyst wall. Scale bar = 500 nm. (t- tegument; e- endocyst; ce- cercaria; lm- membranous lamellae; m- myelin
404 figure; mf- muscle fibers; ol- outer layer; n- nucleus; v- vesicle; g- granule; f- flame cell; ci- cilia; vc- vacuole; fr- fibrillar region; bm- basal lamina).

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytremata coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

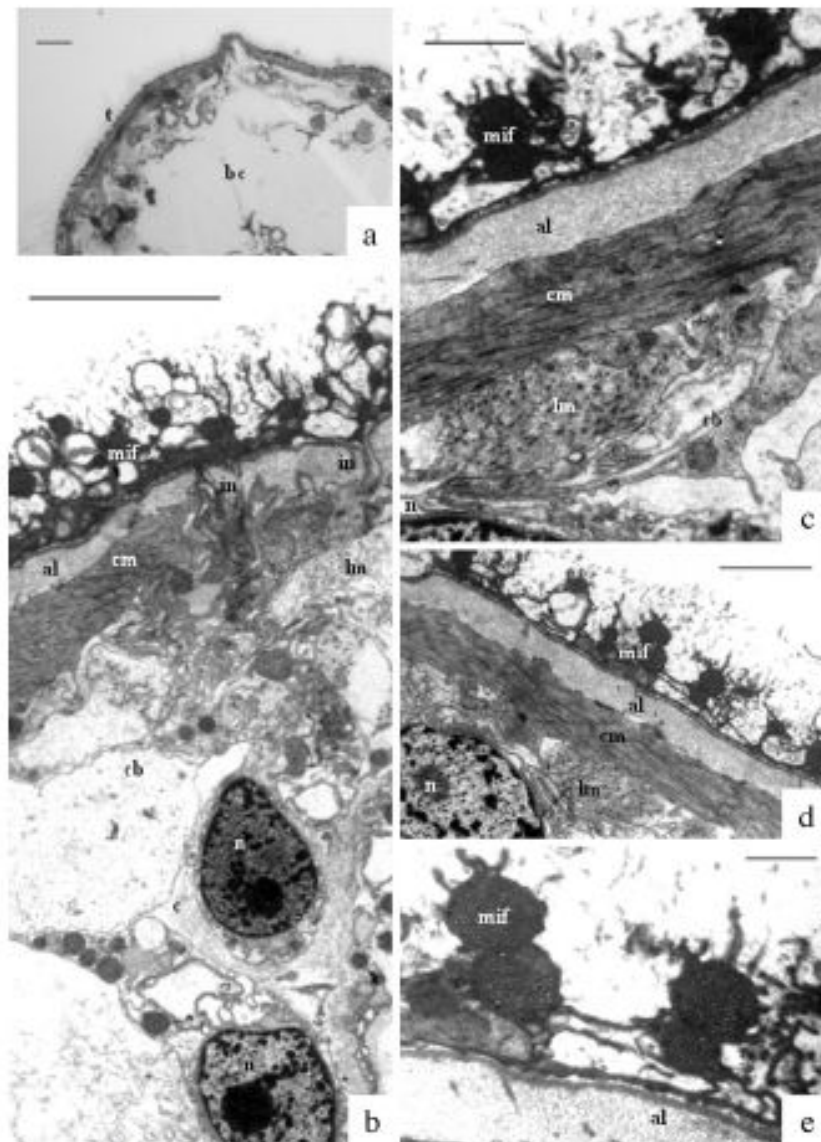


Fig. 6. Posterior region of sporocysts of *Eurytrema coelomaticum*. (a) Semithin section with a thick tegument and the body cavity without developing larva. Scale bar = 7 μ m. (b) General view of the larval body showing the external surface with many folds and myelin figures supported by a visible trilaminar membrane with invaginations crossing the amorphous and circular muscle layers and the presence of cytoplasmic bridges and cell body (cyton) with nucleus. Scale bar = μ m. (c and d) Detail of the outer external surface with myelin figures, membrane, amorphous, circular and longitudinal muscle layers and cytoplasmic bridges connecting to body cell with nucleus. Scale bar = μ m. (e) Detail of myelin figures at the external surface of the tegument. Scale bar = μ m (t = tegument; bc = body cavity; al = amorphous layer; cm = circular muscle layer; lm = longitudinal muscle layer; cb = cytoplasmic bridges; mif = myelin figure; in = invagination; n = nucleus).

387 The expelled sporocysts were all observed in transversal
388 direction sections. The anterior end of the daughter
389 sporocyst shows degenerative characteristics. The structural
390 changes indicate a reduction, or loss, of absorptive
391 activity in this region of the larval body. Despite this, the

secretory activity was maintained, which can be verified
by the presence of electron-dense granules and formation
of secretory vesicles.

The middle region of the sporocyst body, named membranous sac, is where the cercariae concentrated (Tang and

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

Tang, 1977). Jang (1969) stated that when the sporocysts are expelled the external wall detaches from the inner wall and the endocyst coils and occupies the swollen region. Details of these regions are also showed by Franco-Acuña et al. (in press) to daughter sporocysts of *E. coelomaticum*. Tang (1950) stated that when the swollen cyst is formed, the outer cysts wall apparently dies, once no further movement is noticed. The membranous sac region seen here shows a degenerated appearance, with degenerated membranes containing myelin figures. The lamellar structure of the membranous sac is probably important to reduce the water loss and dehydration of the larva exposed to the environmental conditions after emergence. The muscle layer was degenerate and may be placed near or well away from the external surface of the membranous sac. Secretory and excretory activity was still occurring, once vesicles were formed in the tegument surface and the flame cell structure was maintained.

The endocyst was cited by Tang (1950) as an inner cyst wall. By the first time it was possible to observe that the endocyst was not a membranous structure, but composed by a fibrillar material supported by a thick basal lamina. Moreover, inside the endocyst membranous structures amorphous material was observed. These components are probably essential to prevent mechanical damage to the cercariae packed in the endocyst when exposed to the external conditions and ingested by the second intermediate host.

According to Tang (1950) the posterior region of the expelled sporocyst contracts pushing the cercariae to the middle of the larval body. Probably, when this region contracts the membranes coils and begins a degenerative process, leading to the myelin figures. The contractile ability and absorptive processes in the posterior region of sporocyst body seem to be maintained. Thus, the anterior and posterior regions of expelled daughter sporocyst did not die when exposed to the external environmental differently to *E. pancreaticum* as stated by Tang (1950).

By the first time a detailed description of the ultrastructural organization of the mother and daughter sporocysts of *E. coelomaticum* and the changes that occurred through larval development were made. According to Ehlers (1985), new information on comparative morphology based on LM and electron microscopy provides valuable characteristics in elucidating phylogenetic relationships. The characterization of the tegumental components is a very important tool for taxonomic studies, since after penetration in the snail host the miracidium sheds the epidermal ciliated plates and a new tegument, named neodermis, is formed (Ehlers, 1985).

The ultrastructural characteristics of the neodermis are a taxonomic tool to study the Trematoda, being conserved in the larval intramolluscan stages. Beyond this, the elucidation of these morphological and ultrastructural points may clarify some details of the larval trematodes/snail host interface and may be related to the physiological changes that arise in the parasitized snail host. The present study opens new perspectives to study the *E. coelomaticum* and other Dicrocoeliidae widely spread in many countries and with a great economic and ecological importance.

Acknowledgements

We thank Beatriz Ferreira Ribeiro and Giovana Alves de Moraes for technical support. Financial support was by Fundação de Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). JP is a FAPERJ post-doctoral and RAD and WS are CNPq fellows.

References

- Bassani, C.A., Sangioni, L.A., Saut, J.P.E., Yamamamura, M.H., Headley, S.A., 2006. Epidemiology of eurytrematosis (*Eurytrema* spp. Trematoda: Dicrocoeliidae) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the State of Paraná, Brazil. *Vet. Parasitol.* 141, 356–361.
- Bossaert, K., Colignon, F., Kumar, V., 1980. *Eurytrema coelomaticum* infection in an abattoir in South Brazil. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 69, 263–268.
- Brandolini, S.V.P.B., Amato, S.B., 2001. Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Bilet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similis* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae). *Rev. Bras. Zool.* 18, 499–502.
- Cable, R.M., 1971. Parthenogenesis in parasitic helminths. *Am. Zool.* 11, 267–272.
- Castillo, M.G., Yoshino, T.P., 2002. Carbohydrate inhibition of *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell adhesion to primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 125, 513–525.
- De Souza, W. (Ed.), 2007. *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro, RJ, p. 357.
- Dunn, T.S., Yoshino, T.P., 1991. Tegumental surface modulation in *Schistosoma mansoni* primary sporocysts in response to ligand binding. *Parasite Immunol.* 13, 121–135.
- Eduardo, S.L., Sy, H.G., 2007. Scanning electron microscopy observations on the tegumental surface of adult *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) Loos, 1907 (Trematoda: Dicrocoeliidae), a parasite of ruminants in the Philippines. *Philipp. J. Vet. Med.* 44, 100–106.
- Ehlers, U., 1985. Phylogenetic relationship within Platyhelminthes. In: Morris, S.C., George, J.D., Gibson, R., Platt, H.M. (Eds.), *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*. Oxford University Press, Oxford, USA, pp. 143–158.
- Fournier, A., Théron, A., 1985. Morpho-anatomic and functional sectorization of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts. *Z. Parasitenkd.* 71, 325–336.
- Franco-Acuña, D.O., Pinheiro, J., Oliveira-Menezes, A., Brandolini, S.V.P.B., DaMatta, R.A., De Souza, W. Light and scanning electron microscopy of sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Bilet, 1892) Loos, 1907. *Vet. Parasitol.*, in press.
- Hamason, G.J. (Ed.), 1979. *Animal Tissue Techniques*. W.H. Freeman and Company, CA, USA, p. 661.
- Jang, H., 1969. Studies on the *Eurytrema coelomaticum*, II. Life cycle. *Korean J. Parasitol.* 7, 178–200.
- Loos, A., 1907. Some parasites in the Museum of the School of Tropical Medicine, Liverpool. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1, 123–154.
- Medeman, E.A., Holzmann, P.J., Peet, R.C., 1980. The development of daughter sporocysts inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. *Z. Parasitenkd.* 61, 201–212.
- Paschoal, S.V., Amato, S.B., 1993. Consumo de oxigênio e reserva glicolítica em *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Gastropoda: Xanthonychidae) infectada com *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Bilet, 1892) (Digenea: Dicrocoeliidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2, 115–118.
- Paschoal, S.V., Amato, S.B., 1996. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Bilet) (Digenea: Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similis* (Férussac) (Gastropoda: Xanthonychidae): alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. *Rev. Bras. Zool.* 13, 411–418.
- Pinheiro, J., Amato, S.B., 1994. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoeliidae): the effects of infection on carbohydrate contents of its

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Bilet, 1892) Loos, 1907. *Vet. Parasitol.* (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

- 550 intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthony-
551 chidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89, 407–410.
- 552 Pinheiro, J., Amato, S.B., 1995. *Eurytrema coelomaticum*: influence of the
553 infection on the reproduction and the nucleic acids contents in the
554 albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similaris*. Mem. Inst.
555 Oswaldo Cruz 90, 635–638.
- 556 Pinheiro, J., Gomes, E.M., Chagas, G.M., 2001. Aminotransferases activity in
557 the hemolymph of *Bradybaena similaris* under starvation. Mem. Inst.
558 Oswaldo Cruz 96, 1161–1164.
- 559 Sakamoto, T., Tanimura, I., Seki, I., 1985. Studies on *Eurytrema coelo-*
560 *maticum* V. electron microscopical observations on the tegument and
561 associated structures of adult *Eurytrema coelomaticum*. J. Fac. Agric.
562 Iwate Univ. 17, 307–319.
- 563 Sakamoto, T., Oikawa, T., 2007. Cubic crystal protein inclusions in the neo-
564 dermis of the pancreatic fluke, *Eurytrema pancreaticum*, and *Eurytrema*
565 *coelomaticum*. Parasitol. Res. 101, 1393–1399.
- 566 Tang, C.C., 1950. Studies on the life history of *Eurytrema pancreaticum*
567 Janson, 1889. J. Parasitol. 36, 559–574.
- 568 Tang, Z., Tang, C., 1977. The biology and epidemiology of *Eurytrema*
569 *coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) and *Eurytrema pancreaticum*
570 (Janson, 1889) in cattle and sheep in China. Acta Zool. Sin. 23,
571 267–282.
- 572 Yoshino, T.P., Laursen, J.R., 1995. Production of *Schistosoma mansoni*
573 daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in syntenic
574 culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. J. Parasitol.
575 81, 714–722.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: Pinheiro, J., et al., Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.044

Remetente: chob@andrews.edu

Data: 24/06/2011 22:28

Assunto: Parasitology Research - Manuscript ID PR-2011-0613 (SY-05)

Para: jps@ufrj.br

24-Jun-2011

Dear Dr. Pinheiro:

Your manuscript entitled "The cercaria of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae)" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Parasitology Research.

Your manuscript ID is PR-2011-0613.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at mc.manuscriptcentral.com/parasite and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to mc.manuscriptcentral.com/parasite .

Thank you for submitting your manuscript to the Parasitology Research.

Sincerely,
Parasitology Research Editorial Office

Manuscript Number:

Title: The cercaria of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae)

Article Type: Research Paper

Keywords: trematode; morphology; ultrastructure; Dicrocoeliidae; *Eurytrema*

Corresponding Author: Dr. Jairo Pinheiro, Dr.

Corresponding Author's Institution: UFRRJ

First Author: Jairo Pinheiro, Dr.

Order of Authors: Jairo Pinheiro, Dr.; Daniele O Franco-Acuña, M.Sc.; Aleksandra Oliveira-Menezes, D.Sc.; Solange V Brandolini, Ph.D.; Renato A DaMatta, D.Sc.; Wanderley De Souza, D.Sc.

Abstract: *Eurytrema coelomaticum* is a digenetic trematode which parasitizes pancreatic ducts of ruminants. In the present study, the morphology of cercaria was analyzed using light, scanning and transmission electron microscopies. Measurements of the larvae were higher than those reported in the literature. An oral sucker with many papillae and an oral aperture in its center, and a ventral sucker with few discrete papillae on the edge were observed. No stylet, at the anterior end of the larval body, and spines, at the tegument of the end of the tail, were observed. The cercaria had lateral penetration glands and the (central) pre-acetabular glands from which ducts direct to the anterior region, open in a small anterior pocket. The flame cells were located laterally and communicated with fine branches, which converge to two lateral excretory collecting ducts that opened in a excretory bladder, centrally located at the posterior end of the body. The tegument presented an external layer loosely attached to the larva body, below it an amorphous syncitial outer layer with many mitochondrial profiles were observed. This region exhibited many secretion and released secretory granules indicating an intense secretory activity. The circular and longitudinal muscle layers were arranged in sequence below the outer layer. The outer layer was connected, by cytoplasmic bridges, to the internal region of the tegument, where the cell body with nucleus was located. In the cercarial body it was possible to observe a typical flame cell with the barrel region, where cilia, and the internal and external ribbed regions were found. The somatic cells seem to have an active metabolism, with a well developed endoplasmic reticulum, secretory granules and evident nuclei. The results are discussed in the light of the biology and taxonomy of this species.