

INFECÇÃO NATURAL E FORMAS EVOLUTIVAS DE *Echinostoma revolutum*  
(FRÖELICH, 1802) EM *Biomphalaria tenagophila* (ORBIGNY, 1835) E  
*Rattus norvegicus*. SUSCEPTIBILIDADE DE *Mus musculus* AO  
PARASITISMO.

JÚLIO VIANNA BARBOSA

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

INFECÇÃO NATURAL E FORMAS EVOLUTIVAS DE *Echinostoma revolutum*  
(FRÖELICH, 1802) EM *Biomphalaria tenagophila* (ORBIGNY, 1835) E  
*Rattus norvegicus*. SUSCEPTIBILIDADE DE *Mus musculus* AO  
PARASITISMO.

**JÚLIO VIANNA BARBOSA**

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR DR.  
JOSÉ LUIZ DE BARROS ARAÚJO

Tese submetida como requisito  
parcial para a obtenção do  
grau de MAGISTER SCIENTIAE em  
Medicina Veterinária -  
Parasitologia Veterinária.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

SETEMBRO, 1991

**TÍTULO DA TESE**

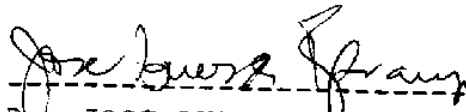
INFECÇÃO NATURAL E FORMAS EVOLUTIVAS DE *Echinostoma revolutum*  
(FRÖELICH, 1802) EM *Biomphalaria tenagophila* (ORBIGNY, 1835) E  
*Rattus norvegicus*. SUSCEPTIBILIDADE DE *Mus musculus* AO  
PARASITISMO

**AUTOR**

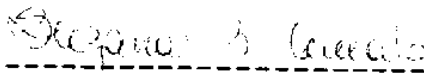
**JÚLIO VIANNA BARBOSA**

TESE APROVADA EM: 30/09/1991

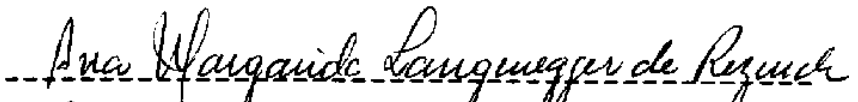
BANCA EXAMINADORA



Dr. JOSÉ LUIZ DE BARROS ARAÚJO



Dra. SUZANA BENCKE AMATO



Profa. ANA MARGARIDA LANENEGGER DE REZENDE

Aos meus pais VICEMAR e LUCIMAR pelo exemplo de vida e dedicação.

Aos meus irmãos SONIA, FELIPE, ADRIANO pelo incentivo e confiança.

Aos meus filhos RODRIGO JORGE e RAYANA, que sempre me deram força e coragem qualidades ocultas em uma criança.

A ZENEIDA pelo amor, carinho, compreensão e dedicação.

"In Memoriam" ao Professor Dr. HUGO DE SOUZA LOPES pela iniciação no curso de mestrado.

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Professor Dr. JOSÉ LUIZ DE BARROS ARAÚJO pela oportunidade e críticas.

Ao Professor Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES, pelo incentivo e esperança.

Ao professor Dr. PEDRO JURBERG pela oportunidade e orientação no início de minha carreira.

A ALFREDO CORONADO pelos primeiros caramujos coletados.

A LILIAN BECK pela grande ajuda durante os "experimentos.

A ROBERTO e JORGE, fotógrafos da Fundação Oswaldo Cruz.

A MÁRIO GATTI e ROSÂNGELA pelo grande apoio na microscopia.

A ANATHEMA T. PINTO e AADA T. PINTO pela correção do Português.

A todos os colegas do Departamento de Biologia que me apoiaram.

## BIOGRAFIA

JÚLIO VIANNA BARBOSA, filho de Vicemar Vianna Barbosa e Lucimar Vianna Barbosa, nasceu no Rio de Janeiro a 29 de julho de 1958. Formou-se em Ciências Biológicas pela Faculdade Técnico Educacional Souza Marques em 1982.

Em 1981 iniciou o estágio de Iniciação Científica no Departamento de Biologia - I.O.C. - FIOCRUZ, sob a orientação do Professor Dr. Pedro Jurberg e Dra. Virgínia T. Schall, sendo bolsista do CNPq nos anos de 1981-1982.

Em 1986 foi contratado como Pesquisador Auxiliar do Departamento de Biologia - I.O.C. - FIOCRUZ.

Em 1987 iniciou o curso de Nivelamento em Parasitologia Veterinária desta Universidade e em 1988 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária.

De 1989 a 1990 foi chefe substituto do Departamento de Biologia - I.O.C. - FIOCRUZ.

## CONTEÚDO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	8
3.1. Coleta e transporte dos moluscos e roedores	8
3.1.1. Coleta	8
3.1.2. Transporte	8
3.2. Manutenção	9
3.2.1. Dos moluscos coletados no campo	9
3.2.2. Dos roedores capturados no campo	9
3.2.3. Dos moluscos e camundongos usados nos experimentos	10
3.3. Método de Sedimentação Simples	11
3.3.1. Obtenção dos ovos nas fezes dos roedores e camundongos	11
3.4. Obtenção dos miracídios	12
3.5. Obtenção das cercárias em moluscos	13
3.6. Exposição de moluscos criados em laboratório a miracídios	13
3.7. Exposição de <i>Biomphalaria tenagophila</i> criada em laboratório a cercárias provenientes de <i>B. tenagophila</i> naturalmente infectado	14
3.8. Infecção experimental em <i>Mus musculus</i>	15

4. EXPERIMENTOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Estágios evolutivos de <i>Echinostoma revolutum</i>	16
4.1.1. Obtenção dos ovos nas fezes dos roedores e camundongos	16
4.1.2. Obtenção dos miracídios	17
4.1.3. Verificação das rédias em moluscos	19
4.1.4. Obtenção das cercárias em moluscos	20
4.2. Exposição dos moluscos criados em laboratório a miracídios	22
4.3. Exposição de <i>B. tenagophila</i> criada em laboratório a cercárias provenientes de <i>B. tenagophila</i> naturalmente infectado	23
4.4. Formas adultas de <i>E. revolutum</i>	25
4.4.1. Obtenção da forma adulta de <i>E. revolutum</i> em <i>Rattus norvegicus</i> e em <i>Mus musculus</i>	25
4.4.1.a. Infecção natural em <i>R. norvegicus</i>	25
4.4.1.b. Infecção experimental em <i>M. musculus</i>	26
4.5. Identificação do verme adulto de <i>E. revolutum</i> obtido em <i>R. norvegicus</i> e em <i>M. musculus</i>	28
<b>5. CONCLUSÕES</b>	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51



## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Local de captura dos moluscos <i>Biomphalaria tenagophila</i> <i>Physa</i> sp. e dos roedores <i>Rattus norvegicus</i> Bairro da Posse, Município de Nova Iguaçu, RJ	36
FIGURA 2. Pote utilizado para o transporte dos moluscos	36
FIGURA 3. Armadilha usada para captura e transporte de <i>Rattus norvegicus</i>	37
FIGURA 4. Criação de moluscos em laboratório	37
FIGURA 5. Técnica de Sedimentação para a obtenção de ovos de <i>Echinostoma revolutum</i>	38
FIGURA 6. Exposição dos moluscos ao teste de cercária	38
FIGURA 7. Gaiolas usadas para manutenção dos roedores	39
FIGURA 8. Molusco <i>Biomphalaria tenagophila</i> utilizado na infecção em <i>Mus musculus</i>	39
FIGURA 9. Infecção em camundongo <i>Mus musculus</i> molusco <i>Biomphalaria tenagophila</i> sendo ministrado oralmente	40
FIGURA 10. Ovo viável de <i>Echinostoma revolutum</i> encontrado em fezes de roedores e camundongos. X 200	40
FIGURA 11. Ovo viável com movimento do miracídio em seu interior. X 40.	41

FIGURA 12.	Ovos de <i>Echinostoma revolutum</i> . A: ovo viável com formação de miracídio no interior; B: ovo inviável. X 100	41
FIGURA 13.	Ovo de <i>Echinostoma revolutum</i> com opérculo aberto. X 100	42
FIGURA 14.	Ovoteste do molusco <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectado com rédias de segunda geração e cercárias de <i>Echinostoma revolutum</i> . X 64	42
FIGURA 15.	Rédia de <i>Echinostoma revolutum</i> . X 40	43
FIGURA 16.	Cercária de <i>Echinostoma revolutum</i> corada por Carmin clorídrico. X 200	43
FIGURA 17.	Síbalas de fezes de <i>Rattus norvegicus</i> , no habitat dos moluscos	44
FIGURA 18.	Fragmento de concha de <i>Biomphalaria tenagophila</i> , encontrado próximo às fezes de <i>Rattus norvegicus</i> . X 8.	44
FIGURA 19.	<i>Rattus norvegicus</i> capturado no habitat dos moluscos	45
FIGURA 20.	<i>Rattus norvegicus</i> necropsiado	45
FIGURA 21.	Tube digestivo de <i>Rattus norvegicus</i>	46

- FIGURA 22. Porção inicial do intestino delgado de *Rattus norvegicus*, destacando três trematódeos de *Echinostoma revolutum* aderidos à mucosa intestinal 46
- FIGURA 23. Trematódeos *Echinostoma revolutum* retirados do intestino delgado de *Rattus norvegicus* 47
- FIGURA 24. *Echinostoma revolutum* fixado com Formol acético e corado com Carmin clorídrico. X 2 47
- FIGURA 25. Desenho da ventosa oral feito na câmara clara, destacando 39 espinhos no disco peristômico. X 200 48
- FIGURA 26. Detalhe dos espinhos no disco peristômico de *Echinostoma revolutum*, visto em contraste de fase. X 400 48
- FIGURA 27. *Echinostoma revolutum* coletados em *Rattus norvegicus* (A) e em *Mus musculus* (B), fixados em Formol acético. X 2,5 49
- FIGURA 28. Ventosa oral com disco peristômico e esôfago. X 100 49
- FIGURA 29. Bolsa do Cirro. X 200 50

## ÍNDICE DA TABELA

Página

TABELA 1. Comparação entre as medidas de <i>Echinostoma revolutum</i> . obtidas por outros autores	35
---	----

## RESUMO

Objetivando estudar a infecção natural de *Echinostoma revolutum* em *Rattus norvegicus* e em *Biomphalaria tenagophila* do Bairro da Posse Município de Nova-Iguaçu, RJ, Brasil, e a infecção desse trematódeo em camundongo *Mus musculus* sob condições de laboratório, foram coletados moluscos *B. tenagophila* e constatou-se que alguns exemplares eliminavam cercária do tipo Echinostomocercária. Verificou-se também fragmentos de concha e fezes de ratos no habitat desses moluscos. Essas fezes foram examinadas e foram observados ovos de trematódeo (média de 20 ovos por campo). Após captura e necrópsia de um roedor (*R. norvegicus*), foram retirados 38 trematódeos do intestino delgado, esses vermes foram identificados como *E. revolutum*.

Foram observados os seguintes estágios evolutivos: ovo, miracídio, rédia II e cercária. Embora não encontrado o estágio de metacercária, ficou evidente a sua existência em *B. tenagophila* e *Physa* sp., pois os camundongos *M. musculus* infectados com esses moluscos eliminaram ovos de *E. revolutum* em suas fezes após 18 dias da infecção. Esses moluscos foram considerados como primeiro e segundo hospedeiros intermediários, respectivamente, para a propagação de *E. revolutum* na natureza, sendo que *B. tenagophila* pode funcionar como primeiro e segundo hospedeiro intermediário ao mesmo tempo. Verificou-se ainda que *R. norvegicus* e *M. musculus* são excelentes hospedeiros definitivos de *E. revolutum* na natureza e em laboratório, respectivamente.

A relação *E. revolutum/R. norvegicus* pode ser considerada uma ANTROPOZOONOSE, fato importante em campanhas que visam combater a Schistosomose utilizando como controle biológico o *E. revolutum*.

## SUMMARY

In order to study natural infection of *Echinostoma revolutum* in *Rattus norvegicus* and in *Biomphalaria tenagophila* from the district of Posse, Nova Iguaçu, RJ, Brasil, as well as the infection of this trematode on the *Mus musculus* mouse under laboratory conditions, several *B. tenagophila* snails were collected, being show that some of these specimens released Echinostomocercariae. Shell fragments and rat feces were found in the habitat of these mollusks and stool examination revealed trematode eggs (about 20 eggs per microscopical field).

Thirty-eight (38) trematodes were taken from the small intestine of a captured specimen of *R. norvegicus*. These worms were identified as *E. revolutum*.

The following evolutive stages were observed: egg, miracidium, rhedia II and cercaria. Although the metacercaria stage was not found, its occurrence in *B. tenagophila* and *Physa* sp. became evident since *M. musculus* mice infected with cercariae from this mollusks released eggs of *E. revolutum* in their stools (18) eighteen days after infection. These snails were considered as first and second intermediate host, respectively, for the spread of *E. revolutum* in nature, while *B. tenagophila* may act simultaneously as the first and second intermediate host. It was also seen that *R. norvegicus* and *M. musculus* are excellent definitive hosts for *E. revolutum* in nature and in the laboratory, respectively.

The relationship between *E. revolutum* and *R. norvegicus* may be regarded as an **Anthropozoonosis**, an important condition to be considered in campaigns against schistosomiasis which use *E. revolutum* as biologic control measure.



## 1. INTRODUÇÃO

O estudo da verminose conhecida como Echinostomiasis, tem como agente etiológico o helminto da classe Trematoda, subclasse Digenea, ordem Echinostomatiformes e da família Echinostomatidae. Torna-se importante, à medida em que determinadas espécies dessa família passam a parasitar o intestino de animais de interesse veterinário e também o próprio homem, considerada portanto uma zoonose (ACHA & SZYFRES, 1986). Dentre essas espécies é citado o *Echinostoma revolutum* (FRÖELICH, 1802), trematódeo encontrado em várias regiões do mundo com exceção da África do Sul e interior da China (BEAVER, 1937). Esse mesmo autor, em sua monografia, oferece vasta lista dos hospedeiros, destacando, como hospedeiros intermediários, moluscos aquáticos como *Helisoma trivolvis*, várias espécies dos gêneros *Lymnaea*, *Physa* e *Planorbis*, e como hospedeiros definitivos, várias espécies de aves do gênero *Anas*.

O estudo desse helminto é também importante no controle biológico da Schistosomose, pois alguns trabalhos visam conhecer a ação antagonista entre *E. revolutum* (FRÖELICH, 1802) e *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907). Segundo LIE et al. (1965) as rédias de *E. revolutum* além de destruírem os esporocistos filhos do *Schistosoma*, também os eliminam quando ocorre infecção múltipla desses em um mesmo hospedeiro. MORAVECK et al. (1974) sugerem uma possível utilização desse trematódeo no controle biológico de *S. mansoni*, visto que a larva de *E. revolutum* anula a de *S. mansoni*. A Organização Mundial da Saúde também considera

como área chave para o controle biológico de vetores da Schistosomose a utilização de patos e de *Echinostoma* dessas aves como predadores e parasitos, respectivamente, desses vetores. Isso porque a presença desse helminto causa esterilidade nos moluscos *Biomphalaria pfeifferi* e *B. glabrata* prejudicando também o desenvolvimento dos esporocistos do *Schistosoma*, quando esse trematódeo co-infecta os caramujos hospedeiros, além de influenciar na quantidade de cercárias de *Schistosoma* eliminadas.

O conhecimento dessa relação parasito-hospedeiro tem aplicação no campo da medicina, pois BONNE et al. (1952) relatam o encontro de *E. revolutum* em um garoto de cerca de oito anos de idade da Indonésia. É importante também destacar a ação deste helminto em aves de interesse econômico pois, segundo FREITAS (1976), embora o grau de patogenicidade do verme seja aparentemente pequeno, se houver infecção maciça pode levar a um quadro de enterite, seguido de diarreia hemorrágica, podendo inclusive acarretar a morte das aves.

Por outro lado, a ocorrência desse helminto não está restrita somente a infecção natural em aves, podendo também existir parasitando naturalmente roedores silvestres no Brasil, como já foi descrita por TRAVASSOS (1944) em seu relatório de excursão no Estado do Espírito Santo. Esse autor relatou o encontro de dois Echinostomatídeos localizados no intestino delgado de *Nectomys squamipes* (BRANTS). ANDO & OZAKI (1923) encontraram *E. cinetorchis* (= *E. revolutum*) parasitando o intestino de *M. norvegicus*, no Japão.

Recentemente estudando caramujos *B. tenagophila* (ORBIGNY, 1835) da localidade do Bairro da Posse, Nova Iguaçu, RJ, Brasil, constatou-se que alguns exemplares eliminavam cercárias do tipo Echinostomocercária. Em constantes idas ao local para coleta de moluscos, foi observado com grande frequência, fezes de ratos no habitat desses moluscos. Verificou-se também fragmentos de concha desses moluscos próximos às fezes. Após coleta de uma pequena amostra do material, o qual foi processado segundo Método de Sedimentação Simples (HOFFMANN, PONS & JANER, 1934), observou-se grande quantidade de ovos de trematódeos nessas fezes.

Objetiva esse trabalho identificar o trematódeo proveniente de roedor silvestre (*R. norvegicus*), investigar a possibilidade de obtenção das formas adultas e evolutivas (ovo, miracídio, rédias I e II, cercárias e metacercárias) do verme em *B. tenagophila* e em *M. musculus* sob condições de laboratório, além da descrição morfológica comparativa dos vermes adultos encontrados em roedores silvestres e de laboratório.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

*Echinostoma revolutum* foi descrito pela primeira vez na literatura por FRÖELICH em 1802, como *Distomum revolutum*.

NICOLL (1914) estudando os trematódeos do Norte da Queenslândia, cita seis espécies novas para o gênero *Echinostoma*, diferenciando-o com relação ao número de espinhos contidos no colar cefálico (29 a 47).

Com relação ao ciclo deste trematódeo é citado JOHNSON (1920) que na Califórnia determinou os estágios de ovo, miracídio, rédias I e II, cistos e adultos de *E. revolutum*, utilizando apenas dois hospedeiros: caramujos (*Physa occidentalis*) e aves (*Marila marila*). Esse mesmo autor afirma que o estágio de esporocisto é omitido.

BEAVER (1937) cita que provavelmente os primeiros trabalhos experimentais sobre o ciclo de vida de *E. revolutum* foram feitos por PAGENSTECHE (1857), embora não tenha dado a descrição do encistamento da metacercária ou até mesmo dados suficientes sobre a morfologia do adulto. Em suas conclusões BEAVER (1937) afirma que os ovos de *E. revolutum* eclodem com cerca de três semanas liberando o miracídio, o qual penetra em uma grande variedade de caramujos pulmonados e provavelmente sofrem metamorfose em esporocistos que produz rédia mãe e por sua vez produz segunda geração de rédias. Essas rédias produzem cercárias que emergem do caramujo após três meses.

CHURCHILL (1950) estudou o ciclo de *E. revolutum* em *Helisoma trivolvis* evidenciando que o miracídio sofre metamorfose originando esporocisto, e não rédia, como JOHNSON (1920) relatou. Observou também que um pequeno número de rédias de primeira geração se desenvolve a partir do esporocisto.

FRIED & FOLEY (1969) estudando a infecção de *E. revolutum* concluíram que os ovos encubados a uma temperatura de 37,5 - 39°C se desenvolveram e eclodiram em maior quantidade.

FRIED & WEAVER (1969) verificaram o efeito da temperatura de 37°C no desenvolvimento e eclosão dos ovos de *E. revolutum*.

FRIED & BUTLER (1978) estudaram a infecção, encistamento e o desenvolvimento da metacercária na membrana do carioalantóide de pintos.

ANDERSON & FRIED (1987) afirmam que *B. glabrata* é um excelente segundo hospedeiro intermediário para a propagação de *E. revolutum* em laboratório.

Uma variedade enorme de trabalhos foram publicados com relação à infecção natural e experimental de *E. revolutum* em aves. Dentre eles se destaca JOHNSTON (1912) que registrou o encontro de *E. revolutum* em aves (*Anas superciliosa*) do Norte da Queenslândia.

LUTZ (1924) foi o primeiro a verificar a existência de *E. revolutum* em patos da espécie *Cairina moschata*, infectados experimentalmente com cistos de *E. revolutum*, provenientes de *Physa* sp.

TUBANGUI (1932) observou a presença de cistos de *Echinostoma* em *Lymnaea peregra* Muller, que desenvolveram formas adultas de *E. revolutum* em pombos.

MELLO (1933) foi quem, pela primeira vez, assinalou a presença de *E. revolutum* em galinhas no Brasil.

SENGER (1954) manteve *E. revolutum* parasitando galinhas infectadas experimentalmente, evidenciando o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência desse helminto.

FRIED et al. (1968) estudaram o desenvolvimento e crescimento de metacercária cultivada em membrana carioalantóide de pintos a uma temperatura de 37 - 38°C.

TRAVASSOS et al. (1968) descrevem o encontro de *E. revolutum* em falo de pato doméstico procedente de Belém do Pará.

KOHN & BUHRNHEIN (1972) descrevem a infestação natural de *E. revolutum* em porco doméstico no Brasil.

CARVALHO et al. (1974) registraram pela primeira vez a ocorrência de *E. revolutum* em pato doméstico procedente de Minas Gerais.

FRIED & SCHEUERMANN (1987) estudaram a infecção do miracídio *E. revolutum* em *Helisoma trivolvis*.

A ocorrência de *E. revolutum* não está somente restrita a infecção em aves, podendo também ocorrer em mamíferos inclusive no próprio homem, como descrito por BONNE et al. (1952) que descreveram cinco Echinostomatídeos encontrados em humanos no Arquipélago de Malaio. Dentre eles se destacam 85 exemplares de *E. revolutum* parasitando um menino de oito anos de idade.

DOLLFUS (1925) cita ANDO & OZAKI (1923) descrevendo *E. cinetorchis* (= *E. revolutum*) parasitando *M. norvegicus* no Japão.

TRAVASSOS (1944) descreve a ocorrência de dois Echinostomatídeos em *Nectomys squamipes*.

FRANCO, HUFFMAN & FRIED (1986) infectaram 30 fêmeas de hamsters *Mesocricetus auratus* com  $100 \pm 25$  cistos de *E. revolutum* e observaram que os ovos eram eliminados nas fezes entre o décimo e o décimo primeiro dia após a infecção.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia para o Controle da Schistosomose do Departamento de Biologia - Instituto Oswaldo Cruz (I.O.C.) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ.

#### 3.1. Coleta e transporte dos moluscos e roedores

##### 3.1.1. Coleta

Tanto as coletas dos moluscos *B. tenagophila* e *Physa* sp., como dos roedores *R. norvegicus*, foram feitas no Bairro da Posse, Município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, a partir de maio de 1989.

Os exemplares de *B. tenagophila* foram coletados em seus habitats naturais (vala rasa). As *Physa* sp. foram coletadas à margem do córrego onde havia pouca quantidade de água (Fig. 1).

Os *R. norvegicus* foram capturados dentro da vala ou nas dependências de uma indústria madeireira que fica próximo ao habitat dos moluscos.

##### 3.1.2. Transporte

Os moluscos foram transportados para o laboratório em potes de plástico medindo 9 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade, contendo pouca quantidade de água retirada do local da coleta. Para impedir a saída dos moluscos, os potes foram tampados (Fig. 2).



Os *R. norvegicus* foram capturados e transportados com auxílio de uma armadilha apropriada para captura de gambás. Essa armadilha era deixada no local durante a noite, sendo retirada no dia seguinte (Fig. 3).

### **3.2. Manutenção**

#### **3.2.1. Dos moluscos coletados no campo**

Os moluscos coletados, após serem separados e identificados, foram mantidos no laboratório em caixas de plástico medindo 30 x 17,5 x 12 cm. Estas caixas continham água estabilizada (30 dias) e um fundo composto de 82% de barro peneirado esterilizado em estufa (100°C por 2h), 40% de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_2$ ) e 14% de farinha de ostra. Para impedir a saída dos caramujos as caixas foram cobertas com tela de náilon com malha de 2,0 mm. Diariamente os moluscos eram alimentados com alface (*Lactuca sativa* L.) em quantidade "ad libitum" (Fig. 4).

#### **3.2.2. Dos roedores capturados no campo**

Os roedores capturados foram mantidos em caixas de cimento amianto medindo 30 x 30 x 16,5 cm até serem sacrificados. Estas caixas foram fechadas com telas apropriadas, que permitiam a colocação de água através de mamadeiras de plástico e alimentados

com ração para roedores (milho moído, subprodutos do trigo, farinha de torta de soja, farinha de peixe, farinha de carne, bifosfato de cálcio, carbonato de cálcio, sal comum, vitaminas e microelementos minerais).

### **3.2.3. Dos moluscos e camundongos usados nos experimentos**

Devido a enorme dificuldade de criação em laboratório dos moluscos *B. tenagophila* e *Physa* sp. coletados no Bairro da Posse, foram utilizados também nos experimentos *B. tenagophila* procedentes do Bairro de Pendotiba - Niterói, por serem facilmente mantidos em laboratório. Outras espécies de moluscos também foram utilizadas tais como: *B. glabrata* procedentes de Touros, Rio Grande do Norte, e *Helisoma duryi* linhagem de Saint Croix, gentilmente cedidos pela Dra. Lygia Corrêa do Departamento de Malacologia, I.O.C. - FIOCRUZ.

Os camundongos usados nos experimentos foram *M. musculus* (machos), com aproximadamente 40 dias de idade. Esses animais nasceram e foram mantidos no Biotério Central da FIOCRUZ. Com o objetivo de averiguar se estavam negativos para ovos de trematódeos, esses camundongos tiveram suas fezes examinadas, através do Método de Sedimentação Simples, no período de uma semana.

### 3.3. Método de Sedimentação Simples

#### 3.3.1. Obtenção dos ovos nas fezes dos roedores e camundongos.

Tanto os ovos do trematódeo *E. revolutum* provenientes de *R. norvegicus* (naturalmente infectado), como de *M. musculus* (infectado em laboratório), foram obtidos através do Método de Sedimentação Simples (HOFFMANN, PONS & JANER, 1934) que constitui em diluir 5g de fezes frescas em 200ml de solução fisiológica no beaker, deixando em repouso por 10 a 20 minutos, para amolecer. Com o auxílio de um bastão de vidro eram maceradas e em seguida peneiradas em gase diretamente no cálice de sedimentação, deixando o material em repouso durante 20 a 30 minutos. O líquido sobrenadante era desprezado e se adicionava ao sedimento 200 ml de solução fisiológica. A mistura era agitada e em seguida deixada em repouso por mais 20 a 30 minutos para sedimentação. Novamente o líquido sobrenadante era desprezado e uma parte do sedimento era pipetado, colocado entre lâmina e lamínula e examinado ao microscópio para pesquisa de ovos (Fig. 5).

### 3.4. Obtenção dos miracídios.

Para esse item, foram coletados 100 sibalas de fezes de *R. norvegicus* durante três dias. Essas fezes foram processadas e analisadas segundo Método de Sedimentação Simples. Para obtenção dos miracídios, foi necessário um período de incubação dos ovos, pois ROWCLIFFE & OLLERENSHAW (1960) afirmam que esses ovos não são embrionados quando recém eliminados nas fezes. Logo, com o objetivo de averiguar a influencia da luminosidade, temperatura e o tipo de diluente empregado na obtenção do miracídio em laboratório, foram utilizados 04 (quatro) tipos de amostra, diferenciadas pelos diluentes empregados, a saber: amostra A: solução salina 8 g/l; amostra B: água estabilizada (30 dias); amostra C: água da torneira e a amostra D: água deionizada. Cada amostra foi dividida em quatro tubos de ensaio: dois envolvidos com papel de alumínio e dois sem papel de alumínio. Os tubos foram mantidos em temperaturas diferentes: 37°C (estufa B.O.D) e 25 ± 2°C (temperatura ambiente). Diariamente era renovado 90% do volume de cada solução, e duas vezes ao dia todo o material era oxigenado, pois segundo FRIED & WEAVER (1969) a não oxigenação dentro da cultura pode ser responsável pela inviabilidade do ovo, dentre outros fatores.

### 3.5. Obtenção das cercárias em moluscos.

Para obtenção das cercárias foram utilizados 120 moluscos *B. tenagophila* procedentes do Bairro da Posse. Esses moluscos quando chegavam ao laboratório eram submetidos ao teste de eliminação de cercária, para verificar se estavam positivos ou não para cercária *E. revolutum*. O teste consistia em individualizar os moluscos em pequenos frascos de vidro transparente, contendo 10 ml de água estabilizada e expô-los à luz por um período de 4h. Ao término desse período, os moluscos eram então examinados com auxílio de um microscópio estereoscópio à procura de cercárias (Fig. 6).

### 3.6. Exposição de moluscos criados em laboratório a miracídios.

Para esse estudo foram utilizados síbalas de *R. norvegicus*, coletadas diretamente no habitat de *B. tenagophila*. Essas síbalas foram processadas e analisadas segundo Método de Sedimentação Simples, foi observado a presença de ovos de trematódeo (média de 30 ovos por campo). Esses ovos foram incubados com água deionizada em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Os miracídios foram pipetados e colocados em presença de 20 *B. tenagophila* (linhagem de Pendotiba), 20 *H. dury* (linhagem de Saint Croix) e 20 *B. glabrata* (linhagem de Touros), criadas em laboratório), foi utilizada uma média de seis miracídios por molusco. Ao término da infecção esses moluscos foram mantidos em

caixas plásticas medindo 28 X 17 X 11cm, contendo água estabilizada (30 dias) e alface "ad libitum".

Para verificar o estágio de rédia, a amostra de 20 moluscos foi dividida em dois grupos de 10 moluscos cada espécie. O primeiro grupo foi dissecado com 45 dias e o segundo com 90 dias após a infecção.

### **3.7. Exposição de *Biomphalaria tenagophila* criada em laboratório a cercárias provenientes de *B. tenagophila* naturalmente infectado.**

O objetivo deste item é a verificação do estágio larvar de metacercária em *B. tenagophila* (linhagem de Pendotiba). Para tal, serão utilizadas cercárias eliminadas por *B. tenagophila* (linhagem da Posse).

Foram coletados 100 *B. tenagophila* de campo e examinados através do teste de eliminação de cercária, onde verificou-se que estavam positivos para cercária de *E. revolutum*. Também foram separados da criação de laboratório 20 *B. tenagophila* (linhagem de Pendotiba), medindo entre 8-10 mm de diâmetro de concha. Esses moluscos foram expostos à presença de uma média de 200 cercárias de *E. revolutum* por um período de 8 horas.

### 3.8. Infecção experimental em *Mus musculus*

Para esse estudo, foram utilizados 10 camundongos machos *Mus musculus* com aproximadamente 40 dias de idade. Foram utilizados também 120 *B. tenagophila* e 45 *Physa* sp, coletados no Bairro da Posse. Esses moluscos foram examinados através do teste de eliminação de cercária. Para a infecção os camundongos foram individualizados em gaiolas contendo ração apropriada (NUVILAB CR1), maravalha e mamadeiras com água estabilizada. Antes de cada infecção os camundongos passavam por um período de privação alimentar de 8 horas por dia. Após esse período foram divididos em grupos de acordo com o tipo de infecção. Cada grupo continha uma amostra de 03 camundongos, com exceção do grupo de controle, que continha somente 01 camundongo que não foi infectado. Grupo A: A1, A2 e A3; grupo B: B1, B2 e B3; e grupo C: C1, C2 e C3. Esses grupos foram diferenciados da seguinte maneira: grupo A: foram ministrados oralmente 12 *B. tenagophila* positivos (que estavam eliminando cercária) para cada camundongo, perfazendo um total de 36 *B. tenagophila*; grupo B: foram ministrados oralmente 28 *B. tenagophila* negativos para cada camundongo, perfazendo um total de 84 *B. tenagophila*; grupo C: foram ministrados oralmente 21 *Physa* sp. para o C1, 12 *Physa* sp. para o C2 e C3, perfazendo um total de 45 *Physa* sp. ao término da infecção.

Os camundongos foram infectados da seguinte maneira: os moluscos *B. tenagophila* positivos, negativos e as *Physa* sp. foram separados e tiveram sua concha quebrada com auxílio de duas placas de Petri, e retirada a parte mole do molusco que era então ministrada oralmente para cada camundongo (Fig. 7 - 9).

#### **4. EXPERIMENTOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

##### **4.1. Estágios evolutivos de *Echinostoma revolutum*.**

###### **4.1.1. Obtenção dos ovos nas fezes dos roedores e camundongos.**

Com auxílio do Método de sedimentação foi possível observar grande quantidade de ovos por campo (média de 15 a 25 ovos). Tanto nas fezes de *R. norvegicus* como de *M. musculus*, os ovos encontrados foram comparados, e observou-se que eram de coloração amarelada e mediam 0,09 - 0,12mm de comprimento por 0,07 - 0,09 mm de largura para *R. norvegicus* e 0,11-0,13mm de comprimento por 0,07 - 0,09 mm de largura para *M. musculus*. Quando comparados foi visto que não existe grande diferença entre às medidas do comprimento e largura (para os dois hospedeiros). O mesmo acontece com relação às medidas obtidas por outros autores que estudaram esse helminto em aves e mamíferos (DOLLFUS, 1925; TRAVASSOS, et al 1969; KOHN & BUHRNHEIN, 1972) (Fig. 10, Tab. I).



#### 4.1.2. Obtenção dos miracídios

Verificou-se que após o terceiro dia de experimento já era possível observar a segmentação no interior do ovo. No sétimo dia já podia ser visto o movimento do miracídio e no décimo segundo dia ocorreu a eclosão, fato verificado somente nos tubos da amostra D que continha água deionizada, mantida a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , independente de estar no claro ou no escuro. A maioria dos ovos apresentava o opérculo aberto, o período de desenvolvimento e eclosão do miracídio nas outras amostras, variou de 07 a 18 dias (Fig. 11 - 13). Esses dados vão de encontro com os de FRIED & WEAVER (1969), que também estudaram a influência da temperatura e luminosidade no desenvolvimento do ovo de *E. revolutum*, verificando que após sete dias de experimento, 31,8% dos ovos mantidos em temperaturas de  $37^{\circ}\text{C}$  com água de torneira estavam totalmente embrionados, e desses 38,7% eclodiram, sugerindo com isso que uma alta percentagem de ovos de *E. revolutum* pode desenvolver e eclodir em volta desta temperatura. Este fato é segundo os autores, de grande importância, visto que os vermes adultos se localizam na parte mais baixa do trato intestinal de vários tipos de aves que funcionam como hospedeiros definitivos, onde a temperatura pode atingir 40 a  $43^{\circ}\text{C}$ . Esses ovos podem se adaptar, sobreviver, desenvolver e eclodir nesta temperatura o que para outros ovos de trematódeos torna-se letal. Esses autores, também obtiveram resultados positivos com temperaturas inferiores a  $37^{\circ}\text{C}$  verificando que ocorre desenvolvimento e eclosão à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ .

JOHNSON (1920) reporta à eclosão do miracídio de *E. revolutum* após 20 dias em temperaturas de 70 F, que corresponde a 21,1°C. NASIR (1960) observou que o miracídio de *E. nudicaudatum* emerge do ovo após três semanas em temperatura de 19 a 24°C. ROWCLIFFE & OLLERENSHAW (1960) também verificaram o efeito da temperatura no desenvolvimento dos ovos de *Fasciola hepatica*, obtendo um desenvolvimento total do ovo, após 20 dias em temperatura de 20°C, tempo esse que foi reduzido para somente oito dias quando a temperatura era de 30°C.

ROWAN (1956) sugere que a luz seja importante para desencadear a reação enzimática que dissolve o opérculo de *Fasciola hepatica*. Por outro lado, FRIED & WEAVER (1969), conseguiram que 28,9% dos ovos de *E. revolutum* mantidos a 37°C, 8,9% a 30°C e 52% em temperatura ambiente eclodissem no escuro. Esse fato também foi confirmado pelos dados aqui obtidos, visto que mais de 50% dos ovos de *E. revolutum* que foram mantidos à temperatura ambiente  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em água deionizada eclodiram após sete dias de experimento independente de estarem no claro ou no escuro provando com isso que os fatores que envolvem a eclosão de ovos de *E. revolutum* estão presentes mesmo na ausência da luz.

#### 4.1.3. Verificação das rédias em moluscos

Para verificação dos estágios evolutivos de rédias, foram separados e dissecados 20 exemplares de *B. tenagophila* coletados no Bairro da Posse que estavam positivos para o teste de eliminação de cercárias.

Foi observado que as rédias de primeira e segunda geração se localizavam no ovoteste dos moluscos. Essa localização tem grande importância no desenvolvimento dos moluscos, pois todos que estavam parasitados por rédias de *E. revolutum* não desovaram, e no período máximo de 40 dias estavam mortos. Esses dados da localização são confirmados por LUTZ (1924) e FRIED & SCHEURMANN (1987) que relatam o encontro de rédias no hepatopâncreas e ovotestes dos moluscos.

No que diz respeito ao estágio evolutivo de esporocisto, esta fase não foi constatada, pois não foi encontrada, fato confirmado por JOHNSON (1920) que afirma que a fase de esporocisto é omitida. TRAVASSOS (1950) também relata a possibilidade de exclusão da fase de esporocisto, evoluindo o miracídio diretamente para o estágio de rédia e esta, dando logo origem à cercárias. Por outro lado, BEAVER (1937) sugere uma provável metamorfose do miracídio em esporocisto o qual produz rédia mãe que origina segunda geração de rédia. CHURCHILL (1950) também verificou o estágio de esporocistos quando estudou o ciclo em linhagem de *E. revolutum* obtidas de infecção com *Helisoma trivolvis*, onde constatou a metamorfose do miracídio em esporocisto e não em rédia como JOHNSON (1920) pensava.

CHURCHILL sugere também que um pequeno número de rédias de primeira geração se desenvolve a partir de cada esporocisto (Fig. 14 - 15).

#### 4.1.4. Obtenção das cercárias em moluscos

Após o teste de eliminação de cercária da amostra de 120 *B. tenagophila* coletados, foi verificado que 36 estavam positivos e 84 negativos. Essas cercárias foram fixadas e identificadas como Echinostomocercária por apresentarem em sua ventosa oral o colar de espinhos cefálicos, terem cauda única do tipo Leptocercaria e possuírem o corpo preenchido por um grande número de células cigogênicas dispersas ao longo do corpo o que tornava difícil a visualização das estruturas internas. Nas cercárias coradas por Carmin, foi possível visualizar um conjunto de células localizado ao nível do acetábulo na parte posterior. Este conjunto celular, provavelmente corresponde aos primórdios do sistema reprodutor. A cauda é longa e não foi observado o poro excretor. As cercárias quando se deslocaram, dobravam a região anterior sobre a posterior, movimentavam o corpo e a cauda em movimento circulatório. Podiam também, deslocar-se sobre o substrato por reptação, fixando as ventosas e puxando o corpo, enquanto que a cauda permanecia reta (Fig. 16).

Segundo SCHELL (1970), as echinostomocercárias da família Echinostomatidae são semelhantes às da família Psilostomatidae com a diferença que estas últimas não apresentam o colar de

espinhos, exatamente como acontece com as cercárias echinostoma 2 descritas por VEITENHEIMER-MENDES (1982) e as aqui obtidas. LUTZ (1924) descreve e registra a ocorrência de um grande número de echinostomocercárias para o Rio de Janeiro, Bahia e Minas Gerais (Brasil). Entretanto, a partir das descrições e das ilustrações por ele apresentadas, não é possível compara-las para fins de identificação com a echinostomocercária aqui descrita.

BEAVER (1937) cita como sinonímia para cercária de *E. revolutum* as Cercária helvética XXIV DUBOIS e Cercária trivolvis CORT, por apresentarem uma disposição de 37 espinhos em seu colar, que segundo ele, é semelhante a dos adultos. Outros meios para a identificação das cercárias por ele citados são espessura da membrana da cauda, os doze ductos cefálicos e as células glandulares dispostas em dois grupos, além da disposição única do sistema excretor. Os dados de JOHNSON (1920) discordam dos de BEAVER (1937), pois reportam a existência de 43 espinhos nas cercárias, enquanto que os adultos possuem somente 37 espinhos. FRIED & SCHEURMANN (1987), afirmam que não se pode assumir que uma cercária com 37 espinhos no seu colar cefálico eliminada por outro pulmonado seja de *E. revolutum*, devido ao fato do grau de especificidade entre linhagens de *E. revolutum* e linhagens de moluscos.

#### 4.2. Exposição dos moluscos criados em laboratório a miracídios

Após o período de 45 e 90 dias, todos os grupos de moluscos utilizados (*B. tenagophila*, *B. glabrata* e *H. dury*) foram sacrificados à procura do estágio de rédia, o qual não foi encontrado. Esse período foi estabelecido em função dos trabalhos de JOHNSON (1920) que observou o aparecimento de rédia mãe com apenas 35 dias e rédias filhas após 03 meses à infecção com miracídio, e BEAVER (1937) que verificou o estágio de rédia mãe com menos de seis semanas.

O não aparecimento dos estágios de rédia de primeira e segunda geração, pode ser explicado pelo grau de especificidade da linhagem de *E. revolutum* a linhagem de molusco segundo FRIED & SCHEUERMANN (1987), que estudaram a infecção do miracídio de *E. revolutum* em moluscos criados em laboratório: *Physa heterostropha* (cepas da Pensilvânia), *H. trivolvis* (cepas da Pensilvânia e Colorado) e *B. glabrata* (cepas de Porto Rico), concluíram que de todos os moluscos testados, somente *H. trivolvis* cepas da Pensilvânia foi susceptível à infecção com miracídio de *E. revolutum* cepas da Pensilvânia, provando assim que *E. revolutum* é altamente específico para tais espécies de caramujos.

#### 4.3. Exposição de *B. tenagophila* criada em laboratório a cercárias provenientes de *B. tenagophila* naturalmente infectado.

Numerosos autores reportam o encistamento de cercária de *E. revolutum* no rim e cavidade do pericárdio de vários Physídeos, Lymneídeos e Planorbídeos (BEAVER, 1937; FRIED & WEAVER, 1969; LO & CROSS, 1975; FRIED & BENNETT, 1979).

No que se refere ao tempo do aparecimento de metacercária após infecção com cercária de *E. revolutum*, são citados os trabalhos de FRIED & BENNETT (1979) que verificaram o encistamento de cercária de *E. revolutum* no rim de *Physa heterostropha* dentro de 1 hora. No presente estudo, após o período de 8 horas, todos os moluscos testados foram dissecados à procura do estágio larvar de metacercária, estágio este que não foi verificado. Observações similares foram feitas por LO & CROSS (1975) que também observaram esse encistamento em *Lymnaea ocella*. Segundo ANDERSON & FRIED (1987) detalhes desse encistamento em caramujos pulmonados não são ainda disponíveis. Apesar disso esses mesmos autores, observaram que embora *B. glabrata* não seja hospedeiro natural de *E. revolutum* nos E.U.A. este molusco pode ser um excelente segundo hospedeiro intermediário para propagação do trematódeo *E. revolutum* em laboratório, e que os caramujos dos gêneros *Physa* e *Helisoma* são os segundos hospedeiros intermediários naturais de *E. revolutum* nos E.U.A., confirmando os dados de BEAVER (1937).

ANDERSON & FRIED (1987) também descreveram o caminho percorrido pelas cercárias de *E. revolutum*, dizendo que elas penetram pela uretra via nefridióporo, migram sobre o túbulo renal e se encistam no sacúlo renal dentro de 2 horas após a infecção em *P. heterostropha*, *B. glabrata* e *H. trivolvis*. Não foi observada metacercária no coração, ovoteste ou no hepatopâncreas. Consideravelmente mais cistos foram encontrados por esses autores no rim de *Physa* do que em *Biomphalaria* num período de 1 hora, fato este que não ocorreu em relação a *Helisoma*. Isto pode ser explicado, em função da extensão do túbulo renal dos planorbídeos, que é reduzido ou ausente em *Physa*. Esse comprimento pode ser o fator principal de atraso do encistamento das cercárias em *Biomphalaria* e *Helisoma* quando comparados com *Physa*.

Esses autores relatam ainda que embora a primeira localização do encistamento da cercária de *E. revolutum* seja no rim, alguns cistos também foram encontrados no pericárdio, região da sola (pé), colar do manto, intestino e também associados ao muco dos caramujos, como as evidências de FRIED & WEAVER (1969) que observaram a formação de cistos de *E. revolutum* na trilha do muco de *H. trivolvis* e estes podendo infectar galinhas domésticas.

O fato de não ter sido observado o estágio larvar de metacercária no presente trabalho, provavelmente pode ser explicado pelo grau de especificidade já descrito por FRIED & SCHEURMANN (1987), pois embora os moluscos testados sejam da mesma espécie *B. tenagophila*, são de procedências diferentes



(linhagem da Posse/linhagem de Pendotiba), podendo assim acarretar dificuldades na obtenção da infecção, ou seja, do estágio larvar de metacercária.

#### **4.4. Formas adultas de *E. revolutum***

##### **4.4.1. Obtenção da forma adulta de *E. revolutum* em *Rattus norvegicus* e em *Mus musculus***

###### **4.4.1.a. Infecção natural em *R. norvegicus***

Recentemente estudando moluscos *B. tenagophila* da localidade do Bairro da Posse, Município de Nova Iguaçu, Brasil, foi constatado que alguns exemplares eliminaram cercárias do tipo de Echinostomocercária. Com constantes idas ao local para coleta de molusco, foi observado com grande frequência, fezes de ratos no habitat desses moluscos. Verificou-se também fragmentos de conchas de *B. tenagophila* próximo às fezes. Coletando uma pequena amostra desse material e processando segundo Método de Sedimentação Simples, foi observado ovos de trematódeos nessas fezes (Fig. 17 - 18).

Após captura e necrópsia de um roedor do local identificado como *R. norvegicus*, foram retirados 30 trematódeos adultos que, após fixados e corados com Carmim clorídrico, foram identificados como *E. revolutum*. Estes vermes se localizavam ao longo de todo o tubo digestivo incluindo o estômago de onde foram retirados 03 trematódeos que estavam aderidos a mucosa (Fig. 19 -

24) .

#### 4.4.1.b. Infecção experimental em *M. musculus*

Neste item constatou-se que dos 120 *B. tenagophila* analisados, 30% estavam positivos para cercária de *E. revolutum*, e após o décimo dia do término da infecção (administração desses moluscos para os camundongos) o camundongo B1 apresentava o abdome dilatado e de coloração diferente, e no décimo oitavo dia estava morto. Esse animal foi necropsiado e retirados 38 trematódeos jovens que estavam localizados ao longo do tubo digestivo. Neste dia também foi realizado o teste de Sedimentação Simples das fezes dos camundongos dos grupos A, B e C, com os seguintes resultados: grupo A: A1 e A2 positivos; grupo B: B1 e B3 positivos; grupo C: C1 e C2 positivos. Todos os camundongos foram sacrificados, sendo retirados em média 25 *E. revolutum* de cada camundongo.

A presença de infecção natural de Echinostomatídeos em roedores já foi descrita por TRAVASSOS (1944) quando relatou a existência de 02 Echinostomatidae no intestino delgado de *Nectomys squamipes* no Brasil. DOLLFUS (1925) cita ANDO & OZAKI (1923) que descreveram *E. cinetorchis* (= *E. revolutum*) parasitando o intestino de *M. norvegicus* no Japão.

No que diz respeito à infecção experimental de *E. revolutum* em outros hospedeiros definitivos, é citado SENGER (1954) que estudou o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de *E. revolutum* em roedores. FRANCO et al (1986) também

verificaram esses parâmetros em hamster dourado. Recentemente BINDSEIL & CHRISTENSEN (1984) infectaram camundongos albinos com 20 metacercária de *E. revolutum* e recuperaram 15 - 20 vermes adultos por camundongo.

HOSIER & FRIED (1986) conseguiram uma taxa de 88% de recuperação do verme *E. revolutum* em camundongos, enquanto que SIRAG et al (1980) e CHRISTENSEN et al (1981) reportam alta recuperação de 100 a 94% respectivamente. Esses autores observaram também que não há diferença de susceptibilidade entre fêmeas e machos quando infectados com *E. revolutum*. Este dado vai de encontro com os estudos de MOLAN & JAMES (1984) onde verificaram que os camundongos fêmeas são mais resistentes que os machos, quando comparados à infecção intestinal do trematódeo *Microphallus pygmaeus*.

FRANCO, HUFFMAN & FRIED (1986) obtiveram recuperação de 38% dos vermes após 105 dias de infecção em hamster, sugerindo que este animal seja um excelente hospedeiro para o estudo de infecção, crescimento e desenvolvimento de *E. revolutum*, e deve ser usado como modelo experimental para estudos de echinostomiasis.

Com relação ao item de recuperação dos vermes, o presente estudo evidencia uma recuperação média de 25 trematódeos adultos por camundongo em apenas 18 dias de infecção com metacercária de *E. revolutum* em camundongo *M. musculus*. Esse dado é importante no que se refere ao uso de *E. revolutum* como modelo de estudo para trematódeo intestinal em infecção de camundongos.

#### 4.5. Identificação do verme adulto de *E. revolutum* obtido em *R. norvegicus* e em *M. musculus*

Segundo NASIR (1960), existem aparentemente 117 espécies descritas para o gênero *Echinostoma*. Porém somente três espécies tem seu ciclo conhecido: *E. revolutum*, *E. macrochis* e *E. lindoensis*. Para a taxonomia desse gênero o número de espinhos contidos no colar cefálico é de grande importância. Porém a literatura existente é muito discordante. HILARIO & WHARTON (1917) descreveram para *Euparyphium ilocanum* que os espinhos desenvolvidos se perdem rapidamente durante o ciclo de vida desses vermes, ou até mesmo algumas vezes pode não apresentar o desenvolvimento dos espinhos dificultando sua identificação.

BEAVER (1937) observou a presença de espinhos em *E. revolutum* dispostos no lado ventral do corpo de todos os indivíduos, porém nos espécimes mais longos com 10mm de comprimento ou mais, os espinhos da cutícula dorsal não eram vistos, o que também dificultava a determinação do verme. Este autor sugere que a variação desse número pode estar relacionada com a morte do trematódeo ou de seus hospedeiros, além do fato de um possível atraso durante a preparação e fixação dos vermes após terem sido recuperados.

PRICE (1931) e BEAVER (1937) chamam a atenção para esses fatores e seus efeitos na identificação dos vermes. NASIR (1960) necropsiando pombos retirou 25 trematódeos jovens que estavam mortos no interior do intestino. Quatorze desses trematódeos

apresentavam somente uma mancha no disco peristômico, e os 11 restantes não possuíam nenhum vestígio. Esse autor afirma que se deve ter muito cuidado no exercício da recuperação e preparação desses espécimes, para que se possa afirmar com certeza o número de espinhos de cada espécie. HILARIO & WHARTON (1917), SANDGROUND & BONNE (1940) também tiveram dificuldades com relação a este aspecto, perdendo todos os espinhos de seus exemplares na hora da manipulação dos mesmos.

No presente estudo esse fato também ocorreu em alguns exemplares recuperados de *R. norvegicus* naturalmente infectados e de *M. musculus* infectados experimentalmente. Verificou-se que a metodologia para a recuperação, preparação e fixação do verme não foi adequada, o que dificultou muito a identificação pois alguns exemplares não apresentavam espinhos em seu colar.

BEAVER (1937) enfatiza a necessidade de uma investigação mais detalhada do número de espinhos, pois não se pode afirmar que a presença ou ausência de espinhos no colar seja identificado como *E. revolutum*. Deve-se levar em consideração que este parâmetro pode também ocorrer em outras espécies. Este autor comparou criteriosamente *E. revolutum* com cada uma das 18 espécies do gênero de *Echinostoma* que possuíam 37 espinhos em seu colar, conseguindo com isso reduzir para oito espécies que passaram a ser sinônimas de *E. revolutum* (*E. miyagawai* ISHII, 1932; *E. cinetorchis* ANDO & OZAKI, 1923; *E. armigerum* BARKER & IRVINE, 1915; *E. coalitum* BARKER & BEAVER, 1915; *E. mendax* DIETZ, 1909 (LUTZ, 1924; SPREHN, 1932; BEAVER, 1937); *E. paraulum* DIETZ, 1909 (BAYLIS, 1929; IWATA & TAMURA, 1933; BEAVER,

1937); *E. columbae* ZUNKER, 1925 (KRAUSE, 1925; BEAVER, 1937) e *E. limocoli* JOHNSON, 1920 (BEAVER, 1937)). As outras oito espécies foram questionadas suas sinonímias; as duas restantes foram aceitas como sendo distintas de *E. revolutum* e pertencentes a diferentes gêneros. BEAVER (1937) não mencionou as duas espécies que foram descritas por YAMAGUTI (1934, 1935): *E. ralli* e *E. robustum* as quais possuem 37 espinhos em seu colar.

NASIR (1960) cita que SKRJABIN (1956) e YAMAGUTI (1971) chamam atenção para cinco novas espécies do gênero *Echinostoma* caracterizando-as por apresentarem 37 espinhos no seu colar. Para a determinação de *E. nudicaudatum* NASIR (1960) comparou essa espécie com rodas que tinham 37 espinhos do gênero de *Echinostoma*: *E. revolutum*, *E. ralli*, *E. robustum*, *E. lindoensis* (SANDGROUND & BONNE, 1940) e as cinco espécies *E. revolutum tenuicollis* (BASCHKIROVA, 1941), *E. goldi* (OSCHMARIN, 1956), *Echinostoma* sp (SADOVSKAJA, 1952), *E. splendens* (VERMA, 1936) e *E. stromi* (BASCHKIROVA, 1946).

TRAVASSOS et al (1968) descreveram *E. revolutum* em falo de patos domésticos, apresentando 38 espinhos no seu disco peristômico. CARVALHO et al (1974) também verificaram a presença de *E. revolutum* em patos domésticos, contendo 37 espinhos e não 38 como TRAVASSOS et al (1968) descreveram.

DORKSEN (1969) estudando a variação do número de espinhos no colar de *E. revolutum* provenientes de infecção em roedores aquáticos *Ondatra zibethica*, observou que dos 17 *Echinostoma* examinados, 03 tinham 36 espinhos, 06 com 37, 04 com 38, 03 com 39 e 01 com 40 espinhos. BEAVER (1937) encontrou 79% dos 220

espécimes estudados contendo os 37 espinhos perfeitos, os restantes 21% tinham mais ou menos esse número. Esse autor explica que as espécies com menos de 37 poderiam ter perdido seus espinhos durante "ferimentos" no seu ciclo de vida, ou até mesmo quando manejados indevidamente durante a fixação. Para as espécies com mais de 37 espinhos, explica que existe uma produção de "espinhos acessórios", os quais são reduzidos nas outras espécies.

DORKSEN (1969) verificou que os espinhos de *Echinostoma* são aproximadamente iguais no comprimento, sempre que os espécimes possuem 38 a 40 espinhos. Para ele a validade do termo "espinhos acessórios" descritos por BEAVER (1937) não existe. Neste caso a interpretação da variação do número de espinhos uma característica normal em *E. revolutum* cepas de Pitt Meadows.

Essas observações foram confirmadas nos resultados contidos neste trabalho, pois tanto *E. revolutum* obtido de *R. norvegicus* como em *M. musculus*, possuem em seu colar 39 espinhos (Fig. 25 - 26). Por outro lado, DOLLFUS (1925) cita o encontro de *E. cinetorchis* ANDO & OZAKI, 1923 em *Mus norvegicus* naturalmente infectado no Japão, contendo em seu colar 37 espinhos. Essas variações aqui descritas, provavelmente são explicadas pelos "espinhos acessórios" descritos por BEAVER (1937).

Na tabela I verifica-se uma comparação entre as medidas obtidas de *E. revolutum* encontrado em diversos hospedeiros, conforme as evidências de DOLLFUS (1925), TRAVASSOS et al (1969), KOHN & BUHRNHEIN (1972) e as aqui obtidas. Pode-se observar que além da variação do número de espinhos contidos no colar

cefálico (37 - 39). Não há muita diferença quando comparados outros parâmetros de medida, principalmente as medidas da ventosa oral, bolsa do cirro e o acetábulo dentre outros obtidos em *R. norvegicus* e em *M. musculus* (Fig. 27 - 29). que possa levar a outra identificação que não seja *E. revolutum*.



## 5. CONCLUSÕES

Mediante observações sobre a Infecção natural, formas evolutivas de *E. revolutum* em *B. tenagophila* e *R. norvegicus* e o estudo da susceptibilidade de *M. musculus* ao parasitismo, pode-se concluir que:

Os estágios evolutivos observados foram: ovo, miracídio, rédias de segunda geração e cercária. Embora, não encontrada a forma larvar de metacercária é evidente sua existência em *Physa* sp e *B. tenagophyla*, pois os camundongos *M. musculus* infectados com esses moluscos eliminaram ovos de *E. revolutum* 18 dias após à infecção.

Os moluscos *B. tenagophila* e *Physa* sp, são excelentes primeiros e segundos hospedeiros intermediários para a propagação de *E. revolutum* na natureza, sendo que *B. tenagophila* pode funcionar como primeiro e segundo hospedeiro intermediário ao mesmo tempo, eliminando cercárias e abrigando a forma de metacercária.

O roedor silvestre *R. norvegicus* e o camundongo *M. musculus* são excelentes hospedeiros definitivos de *E. revolutum* na natureza e em laboratório, respectivamente.

A presença do estágio evolutivo de rédias de segunda geração no ovoteste, inibe o desenvolvimento de *B. tenagophila* linhagens da Posse em laboratório.

Provavelmente existe um alto grau de especificidade dos estágios de miracídio e cercárias quando relacionadas as linhagens de *B. tenagophila* (Posse) e *B. tenagophila* (Pendotiba).

A relação *Echinostoma revolutum/Rattus norvegicus* tem um ciclo bem estabelecido, pois os estudos neste local já datam de 02 anos, podendo ser classificado como Zoonose, muito embora, não haja participação do homem. Essa relação deve ser considerada quando da utilização desse helminto no controle biológico da Schistosomose.

Tabela I - Comparação entre as medidas de *Echinostoma revolutum* (medidas em milímetros).

ORGÃOS	AUTORES				
	DOLLEFUS (1925)	TRAVASSOS et al (1969)	KOHN & BUHRNHEIN (1972)	PRESENTE	TRABALHO
OSPEDEIRO	rato	aves	porco	rato	camundongo
COMPRIMENTO	9,48-14,62	45,60-21,80	7,25-13,15	3,82-15,15	5,44-20,29
ARGURA	1,68- 2,20	2,60- 3,00	2,10- 2,75	0,86- 2,65	1,14- 3,82
DE ESPINHOS	37	38	39	39	39
ENTOSA ORAL	0,26-0,30	0,36-0,48 0,41-0,53	0,28-0,41 0,30-0,46	0,15-0,35 0,16-0,36	0,17-0,47 0,15-0,45
CETABULO	1,01-1,18	1,18-1,42 1,16-1,44	0,83-1,12 0,82-1,22	0,49-0,86 0,49-0,90	0,60-1,07 0,59-1,15
ARINGE	0,20-0,21 0,19-0,25	0,32-0,36 0,34-0,38	0,28-0,38 0,22-0,35	0,14-0,24 0,12-0,24	0,17-0,40 0,20-0,34
SOFAGO	0,69-0,81	0,90-1,00	0,41-0,84	0,17-0,38	0,22-0,35
OLSA DO CIRRO	0,47-0,54 0,26-0,30	?	0,42-0,92 0,48-0,77	0,15-0,69 0,09-0,43	0,32-1,15 0,10-0,53
ESTICULO ANTERIOR	0,44-0,61	?	0,44-0,68 0,48-0,66	0,24-0,86 0,21-0,94	0,37-1,15 0,39-0,94
ESTICULO POSTERIOR	0,58-0,91 0,38-0,62	?	?	0,33-0,80 0,33-0,78	0,41-1,15 0,45-1,00
VARIO	0,41-0,62	?	0,35-0,78 0,24-0,66	0,21-0,55 0,18-0,54	0,31-0,98 0,25-0,41
OVOS	0,09-0,10 0,06-0,07	0,11-0,12 0,06-0,08	0,10-0,15 0,07-0,09	0,09-0,12 0,07-0,09	0,11-0,13 0,07-0,09
LANDULA DE MEHLIS	0,48-0,79 0,30-0,40	?	0,26-0,59 0,26-0,97	0,07-0,27 0,07-0,58	0,51-1,38 0,18-0,70
LOCALIDADE	Japão	Brasil	Brasil	Brasil	Brasil



Figura 1. Local de captura dos moluscos *Biomphalaria tenagophila*, *Physa* sp. e dos roedores *Rattus norvegicus*. Bairro da Posse, Município de Nova Iguaçu, RJ.



Figura 2. Pote utilizado para o transporte dos moluscos.



Figura 3. Armadilha usada para captura e transporte de *Rattus norvegicus*.



Figura 4. Criação de moluscos em laboratório.



Figura 5. Técnica de sedimentação para a obtenção de ovos de *Echinostoma revolutum*.



Figura 6. Exposição dos moluscos ao teste de cercária.



Figura 7. Gaiolas usadas para manutenção dos roedores.

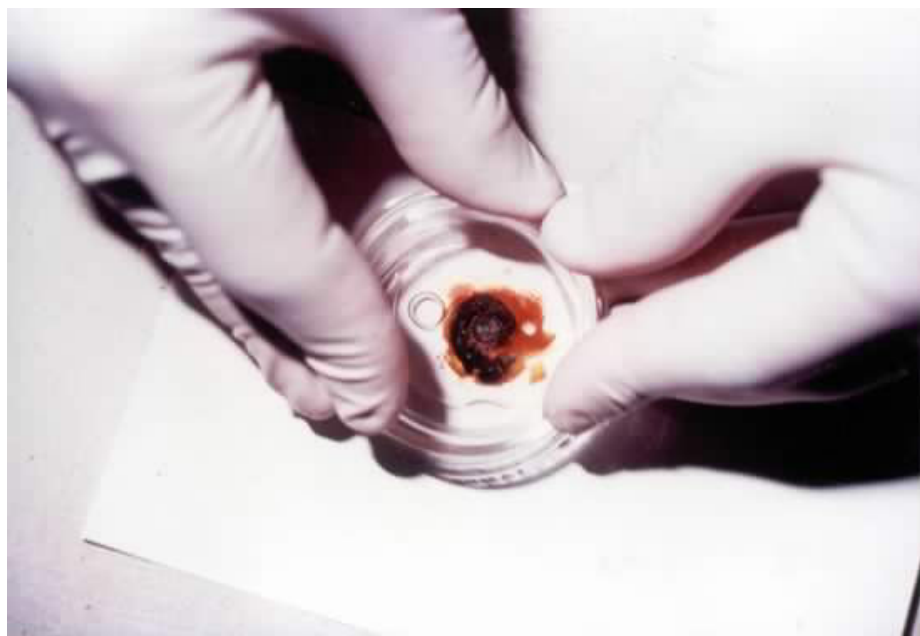


Figura 8. Molusco *Biomphalaria tenagophila* utilizado na infecção em *Mus musculus*.

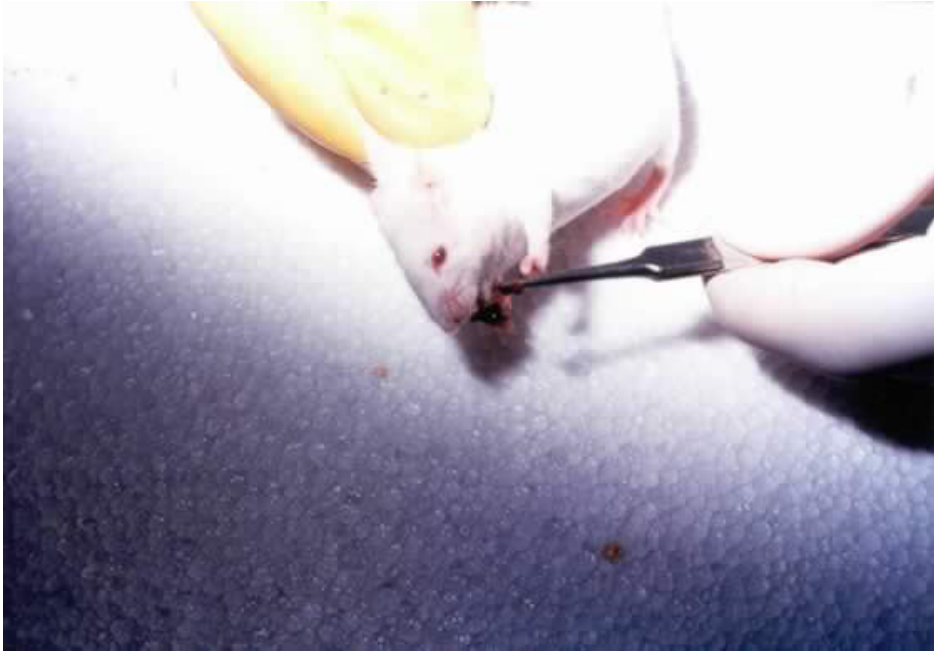


Figura 9. Infecção em camundongos *Mus musculus*: molusco *Biomphalaria tenagophila* sendo ministrado oralmente.



Figura 10. Ovo viável de *Echinostoma revolutum* encontrado em fezes de roedores e camundongos. X 200.





Figura 11. Ovo viável com movimento do miracídio em seu interior. X 40.



Figura 12. Ovos de *Echinostoma revolutum*. A: ovo viável com formação de miracídio no interior; B: ovo inviável. X 100.



Figura 13. Ovo de *Echinostoma revolutum* com opérculo aberto.  
X 100.



Figura 14. Ovoteste do molusco *Biomphalaria tenagophila* infectado  
com rédias de segunda geração e cercárias de  
*Echinostoma revolutum*. X 64.



Figura 15. Rédia de *Echinostoma revolutum*. X 40.



Figura 16. Cercária de *Echinostoma revolutum* corada por Carmin clorídrico. X 200



Figura 17. Síbalas de fezes de *Rattus norvegicus*, no habitat dos moluscos.



Figura 18. Fragmento de concha de *Biomphalaria tenagophila*, encontrado próximo às fezes de *Rattus norvegicus*. X 8.



Figura 19. *Rattus norvegicus* capturado no habitat dos moluscos.



Figura 20. *Rattus norvegicus* necropsiado.

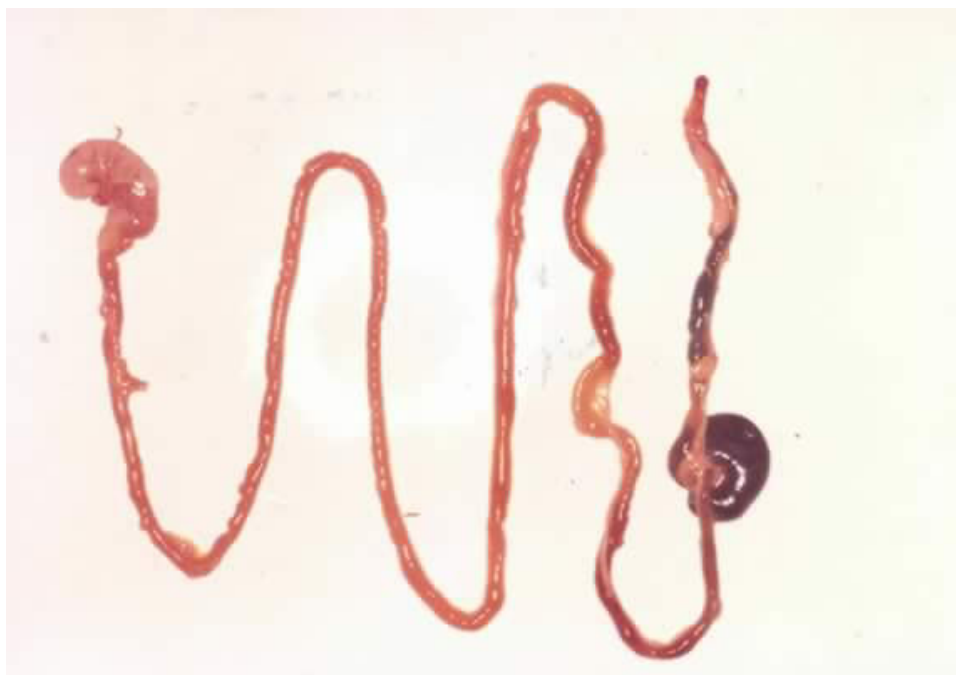


Figura 21. Tubo digestivo de *Rattus norvegicus*.



Figura 22. Porção inicial do intestino delgado de *Rattus norvegicus*, destacando três trematódeos de *Echinostoma revolutum* aderidos à mucosa intestinal.



Figura 22. Trematódeos *Echinostoma revolutum* retirados do intestino delgado de *Rattus norvegicus*.



Figura 24. *Echinostoma revolutum* fixado com Formol acético e corado com Carmin clorídrico. X 2.

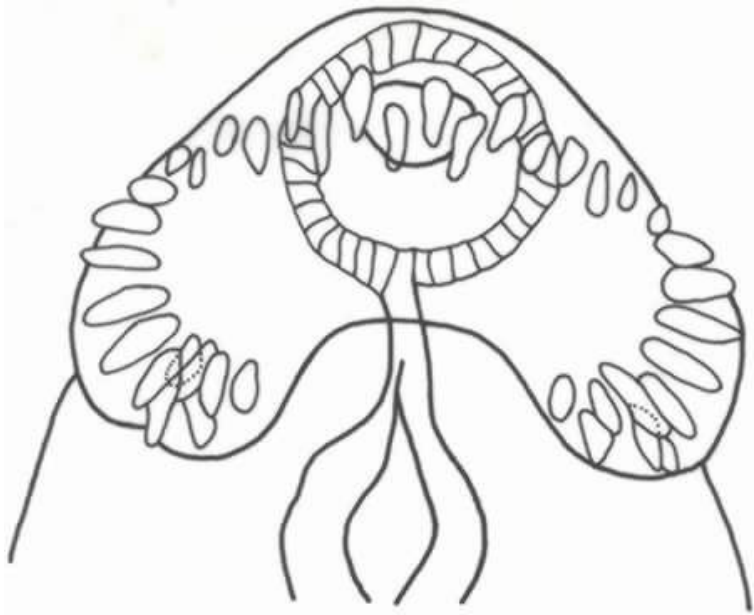


Figura 25. Desenho da ventosa oral feito na Câmara clara, destacando 39 espinhos no disco peristômico. X 200.



Figura 26. Detalhe dos espinhos no disco peristômico de *Echinostoma revolutum*, visto em contraste de fase. X 400.





Figura 27. *Echinostoma revolutum* coletados em *Rattus norvegicus* (A), e em *Mus musculus* (B). Fixados em formol acético. X 2,5.

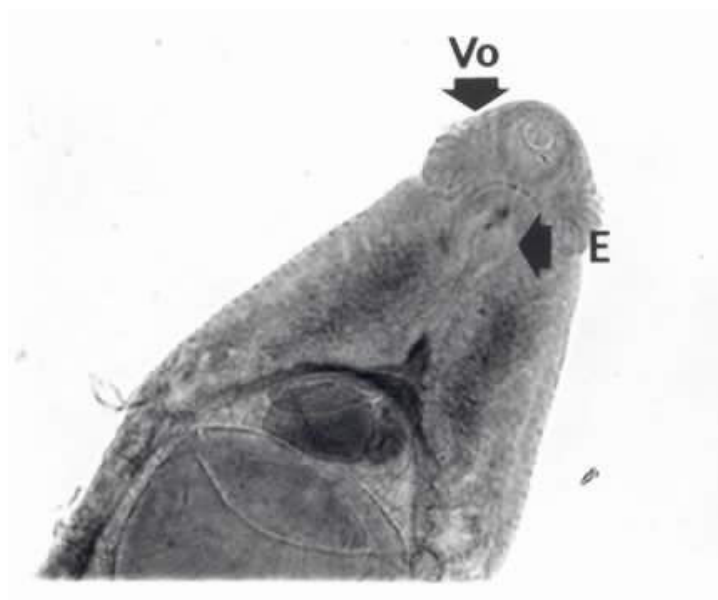


Figura 28. Ventosa oral com disco peristômico e esôfago. X 100.

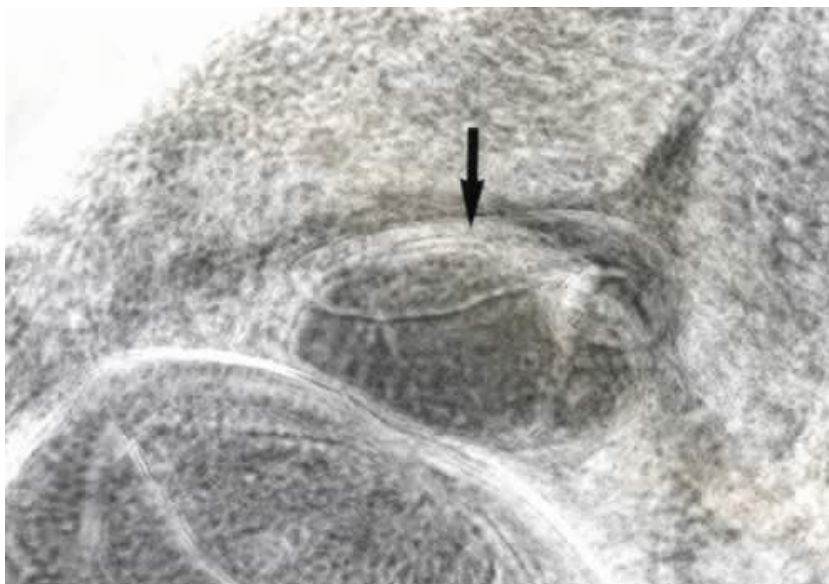


Figura 29. Bolsa do cirro. X 200.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. 1986. Zoonoses y enfermedades transmissibles comunes ao hombre y a los animales. Segunda Ediction. Org. Pan Americana de la Salud, 672-674.
- ANDERSON, J.W. & FRIED, B. 1987. Experimental infection of *Physa heterostropha*, *Helisoma trivolvis* and *Biomphalaria glabrata* (gastropoda) with *Echinostoma revolutum* (Trematoda) cercariae. J. Parasitol, 73 (1): 49-54.
- ANDO, A. & OZAKI, Y. (1923). Sur quatre nouvelles espèces de trématodes de genre *Echinostoma*. Dobutsu G. Z., 35: 108-119.
- BEAVER, P.C. 1937. Experimental studies on *Echinostoma revolutum* (Fröelich) a fluke from birds and mammals. Illinois Biological Monography, 15(1): 1-96, 3 plates.
- BINDSEIL, E. & CHRISTENSEN, N.O. 1984. Thymus-independent crypt hyperplasia and villous atrophy in the small intestine of mice infected with the trematode *Echinostoma revolutum*. Parasitology, 88 (3): 431-438.
- BONNE, C.; BRAS, G. & LIE, K.J. 1952. Five Echinostomes found in man in the Malayan Archipelago. American Journal of Disease, 20: 12-16.

- CARVALHO, O.S.DOS, KAWAZOE, U. & CUBA, C.A. 1974. *Echinostoma Revolutum* (Fröelich, 1802) (Trematoda, Echinostomatidae) em pato doméstico de Minas Gerais. Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro, 17(2): 73-75, 2 figuras.
- CHRISTENSEN, N.O.; NYDAL, R.; FRANSEN, F. & NANSEN, P. 1981. Homologous immunotolerance and decreased resistance to *Schistosoma mansoni* in *Echinostoma revolutum* infected mice. Journal of Parasitology, 67 (2): 164-166.
- CHURCHILL, H.M. 1950. Sporocyst of *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802). Journal of Parasitology, 36(6)Sect. 2: 27-28
- DOLLFUS, R. 1925. Distomiens parasites de Muridae du genre *Mus*. Annales Parasitologique, 3(1) : 85-102.
- DORKSEN, G.P. 1969. Variation in collar spine number of *Echinostoma revolutum* from the Muskrat. The Journal of Parasitology, 55 (2): 380.
- FRANCO, J.; HUFFMAN, J.E. AND FRIED, B. 1986. Infectivity, growth, and development of *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. Journal of Parasitology, 72(1): 142-147.
- FREITAS, M.G. 1976. Helminthologia Veterinária. Editora Rabelo & Brasil Ltda-Nova Suíça, Belo Horizonte-Minas Gerais, 1-396p.

- FRIED, B. & BENNET, M.C. 1979. Studies on encystment of *Echinostoma revolutum* cercariae. *Journal of Parasitology*, 65: 38-40.
- FRIED, B. AND BUTLER, M.S. 1978. Infectivity, excystation, and development on the chick chorioallantois of the metacercaria of *Echinostoma revolutum* (Trematoda). *Journal of Parasitology*, 64(1): 175-177.
- FRIED, B. AND FOLEY, D.A. 1969. Temperature tolerance of *Echinostoma revolutum* on the chick chorioallantois. *Journal of Parasitology*, 55(5): 982-964.
- FRIED, B. AND SCHEUERMANN, S. 1987. Infectivity of *Echinostoma revolutum* miracidia for laboratory-raised pulmonate snails. *Journal of Parasitology*, 73(5): 1047-1048.
- FRIED, B. AND WEAVER, L.J. 1969. Effects of temperature on the development and hatching of eggs of the Trematode *Echinostoma revolutum*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 88(2): 253-257.
- FRIED, B.; WEAVER, L.J. AND KRAMER, M.D. 1968. Cultivation of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) on the chick chorioallantois. *Journal of Parasitology*, 54(5): 939-941.

- HILARIO, J.S. AND WHARTON, L.D. 1917. *Echinostoma ilocanum* (Garrison): a report of five cases and a contribution to the anatomy of the fluke. The Philippine Journal of Science, section B, Tropical Medicine, vol. XII(3): 165-166.
- HOFFMANN, R.P. 1987. Diagnóstico de Parasitologia Veterinária. Editora Sulina, Porto Alegre-RS, 1-156 p.
- HOSIER, D.W. AND FRIED, B. 1986. Infectivity, growth, and distribution of *Echinostoma revolutum* in Swiss Webster and ICR mice. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 53(2): 173-176.
- JOHNSON, J.C. 1920. The life cycle of *Echinostoma revolutum* (Fröelich). Univ. Calif. Publ. Zool., 19(11): 335-388, plates 19-25, 1 figure in text.
- JOHNSTON, S.J. 1912. On some trematode parasites of Australian Frogs. Ibid XXXVII pp: 285-362.
- KOHN, A. & BUHRNHEIN, V. 1972. Infestação natural de *Echinostoma revolutum* (FRÖELICH, 1802) (Trematoda, Echinostomatidae) em porco doméstico. Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro, 16(1): 5-6.

- LIE, K.J.; BASCH, P.F. & UMATHEVY, T. 1965. Antagonism between two species of larval trematods in the same snail. *Nature (Lond)* 206: 422-423.
- LO, C.T. & CROSS, J.H. 1975. Observation on the host-parasit relations between *Echinostoma revolutum* and *Lymnaeid snails*. *Chin. J. Microbiol.*, 8: 241-252.
- LUTZ, A. 1924. Estudos sobre a evolução dos endotrematodes brasileiros. Parte especial: I. Echinostomidae. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 17: 55-73, estampas 5-12.
- MELLO, A. 1933. Da ocorrência de *Echinostoma revolutum* (FRÖELICH, 1802) em *Gallus domesticus* no Brasil. *Arch. Esc. Sup. Agric. Med. Vet, Rio de Janeiro*, 10 (2): 172.
- MOLAN, A.L. & JANES, B.L. 1984. The effects of sex age and dite of mice and gerbils on susceptibility to *Microphallus pygmaeus* (Digenea: Microphallidae). *International Journal for Parasitology*, 14: 521-526.
- MORAVEC, F.; BARUS, V.; RYZAVY, B. AND YOUSIF, F. 1974. Observations of the development of two Echinostomes, *Echinoparyphium recurvatum* and *Echinostoma revolutum*, the antagonists of human schistosomes in Egypt. *Folia Parasitologica (Praha)*, 21: 107-126.

- NASIR, P. 1960. Studies on the life history of *Echinostoma nudicaudatum* n.sp. (Echinostomatidae: Trematoda). The Journal of Parasitology, 46 (1): 833-847.
- NICOLL, W. 1914. The trematode parasites of North Queensland. I. Parasitology, vol. VI(4) : 333-350, 9 figures.
- PRICE, E.W. 1931. Four new species of trematode worms from the muskrat *Onodatra zibethica* with a key to the trematode parasites of the muskrat. Proc. U.S. Natl. Mus. 79: 1-13.
- ROWAN, W.B. 1956. The mode of hatching of the egg of *Fasciola hepatica*. Exptl. Parasitol. 5: 118-137.
- ROWCLIFFE, S.A. & OLLERENSHAW, C.B. 1960. Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 54: 172-181.
- SANDGROUND, J.H. & BONNE, C. 1940. *Echinostoma lindoensis* in the Celebs with an account of its life history and epidemiology. Am. J. Trop. Med., 20: 511-535.
- SENGER, C.M. 1954. Notes on the growth, development, and survival of two Echinostome Trematodes. Experimental Parasitology, 6: 491-496.



- SCHELL, S.C. 1970. How to know the trematodes. Brow, Dubuque, 355p.
- SIRAG, S.B.; CHRISTENSEN, N.O.; FRANDBSEN, F.; MONRAD, J. & MANSEN, P. 1980. Homologous and heterologous resistance in *Echinostoma revolutum* infections in mice. *Parasitology*, 80 (3): 479-486.
- TRAVASSOS, L. 1944. Relatório da excursão do Instituto Oswaldo Cruz, ao Município de Santa Teresa, no Estado do Espírito Santo, em Agosto e Setembro de 1943. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 40(2): 121-128.
- TRAVASSOS, L. 1950. Introdução ao estudo da helmintologia. *Revista Brasileira de Biologia*: 1-173.
- TRAVASSOS, L.; FREITAS, J.F.T. E KOHN, A. 1968. Encontro de *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) em falo de pato doméstico. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, 11(6): 215-216.
- TRAVASSOS, L.; FREITAS, J.F.T. E KOHN, A. 1969. Trematódeos do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Tomo 67 886 pag.

TUBANGUI, M.A. 1932. Observations on the life histories of *Euparyphium murino* Tubangui, 1931, and *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802), (Trematoda). The Philippine Journal of Science, 47(4): 497-513, 3 plates.

VEITENHEIMER-MENDES, I.L. 1982. Cercárias em moluscos planorbídeos de Camaquã Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Brasil. Biol., 42(3): 545-551.

YAMAGUTTI, S. 1934. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 3, Avian trematodes. II. Jap. J. Zool., 5: 83-543.

YAMAGUTTI, S. 1935. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 5, Trematodes of birds. III. Jap. J. Zool., 6: 82-159.