

*Eurytrema coelomaticum* (GIARD ET BILLET, 1892) LOOSS, 1907  
EM *Bradybaena similaris* (FERUSSAC, 1821) - ROTA  
DE MIGRAÇÃO E CONSEQUÊNCIAS DO PARASITISMO  
SOB OS ENFOQUES BIOLÓGICO E HISTOLÓGICO

SOLANGE VIANA PASCHOAL

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

*Eurytrema coelomaticum* (GIARD ET BILLET, 1892) LOOSS, 1907  
EM *Bradybaena similis* (FERUSSAC, 1821) - ROTA  
DE MIGRAÇÃO E CONSEQUÊNCIAS DO PARASITISMO  
SOB OS ENFOQUES BIOLÓGICO E HISTOLÓGICO

SOLANGE VIANA PASCHOAL

SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA DRA. SUZANA BENCKE AMATO

TESE SOBMETIDA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MEDICINA  
VETERINÁRIA-PARASITOLOGIA VETERINÁRIA.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

ABRIL, 1991


*Eurytrema coelomaticum* (GIARD ET BILLET, 1892) LOOSS, 1907  
EM *Bradybaena similaris* (FERUSSAC, 1821) - ROTA  
DE MIGRAÇÃO E CONSEQUÊNCIAS DO PARASITISMO  
SOB OS ENFOQUES BIOLÓGICO E HISTOLÓGICO

AUTORA

**SOLANGE VIANA PASCHOAL**

APROVADA EM: 10/04/1991

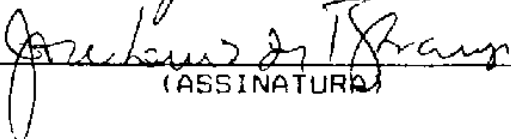
SUZANA BENCKE AMATO

  
\_\_\_\_\_  
(ASSINATURA)

NADJA LIMA PINHEIRO

  
\_\_\_\_\_  
(ASSINATURA)

JOSÉ LUIZ DE BARROS ARAÚJO

  
\_\_\_\_\_  
(ASSINATURA)

AOS MEUS PAIS, SAMUEL E EDITH, PELO  
EXEMPLO DE AMOR E RESPEITO, PELO  
CARINHO E COMPREENSÃO SEMPRE  
CONSTANTES.

## **AGRADECIMENTOS**

Desejo expressar minha gratidão a pessoas que muito contribuíram para a realização desta Tese.

A Dra. Suzana Bencke Amato, professora do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, pela orientação segura, apoio e incentivo constantes, durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. José Felipe Ribeiro Amato, professor do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, por ter me recebido em seu laboratório, ainda durante a graduação, possibilitando-me a iniciação na pesquisa e pelos conhecimentos a mim transmitidos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária, UFRRJ, pelas informações transmitidas no decorrer do curso.

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

A Área de Histologia e Embriologia, UFRRJ, pelo apoio recebido e utilização do laboratório.

Enfim, meus agradecimentos a todos que, durante esses anos, fizeram-se presentes no meu dia-a-dia e contribuíram de uma forma ou de outra, para esta conquista.

## **BIOGRAFIA**

Solange Viana Paschoal, filha de Samuel Pinto Paschoal e Edith Viana Paschoal, nascida aos 29 de janeiro de 1963, no Estado do Rio de Janeiro.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em março de 1983, onde graduou-se em Licenciatura em Ciências com Habilitação em Biologia, em dezembro de 1986. Ainda durante a graduação, iniciou-se na pesquisa, trabalhando na linha de "Relacionamento de larvas de helmintos e seus hospedeiros intermediários" Em março de 1986, recebeu Bolsa de Iniciação Científica do CNPq., para estudar o relacionamento de estágios larvais de Acanthocephala e seu hospedeiro intermediário, sob a orientação do professor Dr. José Felipe Ribeiro Amato.

Durante o ano de 1987, continuou nesta linha de pesquisa, porém utilizando um outro sistema parasito/hospedeiro. Como bolsista de Aperfeiçoamento do CNPq., passou a estudar o "Relacionamento de estágios larvais de trematódeos

digenéticos e seus hospedeiros intermediários", sob a orientação da professora Dra. Suzana Bencke Amato. Em março de 1988, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária, da UFRRJ, no nível de Mestrado.



## CONTEÚDO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	iii
BIOGRAFIA	v
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO	xviii
SUMMARY	xxi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
1. Rota de migração intramolusco e eliminação dos es- tágios larvais de trematódeos digenéticos	4
2. Condições ambientais e fisiológicas dos hospedei- ros e a duração do desenvolvimento larval intramo- lusco de trematódeos digenéticos	6

3. Alterações histopatológicas nas gônadas de moluscos, como resultado do parasitismo por trematódeos digenéticos	8
4. Influência do parasitismo por trematódeos digenéticos sobre a composição química e metabolismo dos moluscos	9
5. Morfologia e composição química do esporocisto expelido de <i>Eurytrema</i>	10
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
1. Estabelecimento da colônia de <i>Bradybaena similaris</i> em condições de laboratório	14
2. Registro da temperatura	17
3. Obtenção de ovos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	17
4. Determinação do número de ovos de <i>E. coelomaticum</i> eliminados nas soluções salinas fisiológicas utilizadas	19
5. Infecção experimental de <i>B. similaris</i> com ovos embrionados de <i>E. coelomaticum</i>	20
6. Acompanhamento da rota de migração dos estágios larvais de <i>E. coelomaticum</i> em <i>B. similaris</i>	21
7. Acompanhamento do ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de <i>E. coelomaticum</i>	22
8. Determinação do consumo de oxigênio pelos moluscos infectados e não-infectados	23

9. Determinação quantitativa de cálcio nas conchas de moluscos infectados e não-infectados	24
10. Processamento histológico dos moluscos infectados e não-infectados e dos esporocistos expelidos de <i>E. coelomaticum</i>	25
11. Análise estatística	29
12. Fotomicrografias	30
<b>RESULTADOS</b>	32
1. Papel de algumas soluções salinas fisiológicas na eliminação de ovos por <i>E. coelomaticum</i>	32
2. Infecção experimental de <i>B. similaris</i> com ovos embrionados de <i>E. coelomaticum</i>	33
3. Temperatura e duração do desenvolvimento larval de <i>E. coelomaticum</i> em <i>B. similaris</i>	34
4. Rota de migração e emergência dos esporocistos de segunda geração de <i>E. coelomaticum</i> em <i>B. similaris</i>	37
5. Influência do parasitismo por <i>E. coelomaticum</i> sobre o armazenamento de glicogênio e cálcio na glândula digestiva de <i>B. similaris</i>	44
5.1. Glicogênio nas células da glândula digestiva de <i>B. similaris</i>	44
5.2. Deposição de cálcio nas células da glândula digestiva de <i>B. similaris</i>	44

6. Alterações histopatológicas no ovotestis de <i>B. similaris</i> , como resultado do parasitismo por <i>E. coelomaticum</i>	45
7. Determinação do ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de <i>E. coelomaticum</i>	47
8. Influência do parasitismo por <i>E. coelomaticum</i> sobre o consumo de oxigênio por <i>B. similaris</i>	50
9. Influência do parasitismo por <i>E. coelomaticum</i> sobre a deposição de cálcio nas conchas de <i>B. similaris</i>	54
10. Morfologia e composição química do esporocisto expelido de <i>E. coelomaticum</i>	62
<b>DISCUSSÃO</b>	67
i. Papel de algumas soluções salinas fisiológicas na eliminação de ovos por <i>E. coelomaticum</i>	67
2. Infecção experimental de <i>B. similaris</i> com ovos embrionados de <i>E. coelomaticum</i>	68
3. Temperatura e duração do desenvolvimento larval de <i>E. coelomaticum</i> em <i>B. similaris</i>	70
4. Rota de migração e emergência dos esporocistos de segunda geração de <i>E. coelomaticum</i> em <i>B. similaris</i>	71
5. Influência do parasitismo por <i>E. coelomaticum</i> sobre o armazenamento de glicogênio e cálcio na	

glândula digestiva de <i>B. similaris</i>	74
5.1. Glicogênio nas células da glândula digestiva de <i>B. similaris</i>	74
5.2. Deposição de cálcio nas células da glândula digestiva de <i>B. similaris</i>	76
6. Alterações histopatológicas no ovotestis de <i>B. similaris</i> , como resultado do parasitismo por <i>E. coelomaticum</i>	77
7. Ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de <i>E. coelomaticum</i>	79
8. Influência do parasitismo por <i>E. coelomaticum</i> sobre o consumo de oxigênio por <i>B. similaris</i>	80
9. Influência do parasitismo por <i>E. coelomaticum</i> sobre a deposição de cálcio nas conchas de <i>B. similaris</i>	81
10. Morfologia e composição química do esporocisto expelido de <i>E. coelomaticum</i>	82
<b>CONCLUSÕES</b>	85
<b>LITERATURA CITADA</b>	86

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1	- Corte histológico da região anterior do trato digestivo de <i>B. similaris</i> infectada experimentalmente, mostrando um ovo de <i>E. coelomaticum</i> , aos 15 minutos após o contato inicial com os OVOS	39
2	- Corte histológico da região anterior do trato digestivo de <i>B. similaris</i> infectada experimentalmente, mostrando um miracídio de <i>E. coelomaticum</i> livre, no lúmen do trato digestivo do molusco, uma hora após o contato inicial com OS OVOS	39
3	- Corte histológico, mostrando um miracídio de <i>E. coelomaticum</i> dentro de uma célula da parede do trato digestivo de <i>B. similaris</i> , duas horas após o contato inicial com os ovos	40
4	- Corte histológico, mostrando um esporocisto de	

	Pág.
primeira geração de <i>E. coelomaticum</i> fixado na serosa da parede do intestino de <i>B. similis</i> , aos 10 dias após a infecção	40
5 - Corte histológico, mostrando vários esporocistos de primeira geração de <i>E. coelomaticum</i> , em diferentes estágios de desenvolvimento, espalhados pelo tecido peri-intestinal e ao redor da glândula digestiva de <i>B. similis</i> , aos 25 dias pós-infecção	41
6 - Corte histológico, mostrando esporocistos de segunda geração jovens de <i>E. coelomaticum</i> , migrando pelo espaço hemolinfático, localizado próximo ao intestino de <i>B. similis</i> , aos 53 dias pós-infecção	41
7 - Corte histológico, mostrando vários esporocistos de segunda geração de <i>E. coelomaticum</i> , em diferentes estágios de desenvolvimento, ao redor da glândula digestiva de <i>B. similis</i> , aos 60 dias pós-infecção	42
8 - Corte histológico, mostrando esporocistos de segunda geração de <i>E. coelomaticum</i> totalmente desenvolvidos, migrando entre os órgãos internos de <i>B. similis</i> , aos 70 dias pós-infecção	42
9 - Corte histológico, mostrando uma região do pneumóstoma de <i>B. similis</i> , contendo um esporocisto	

- de segunda geração de *E. coelomaticum*, pronto para ser expelido, aos 79 dias pós-infecção 43
- 10 - Corte histológico de uma região do ovotestis de *B. similis* infectada experimentalmente com *E. coelomaticum*, mostrando o estado degenerativo do tecido gonadal 46
- 11 - Corte histológico de uma região do ovotestis de *B. similis* não-infectada, mostrando o estado perfeito da gônada 46
- 12 - Ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* por um espécime de *B. similis* infectado experimentalmente em novembro/1989, relacionado com a temperatura do interior do laboratório 49
- 13 - Ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* por um espécime de *B. similis* infectado experimentalmente em março/1990, relacionado com a temperatura do interior do laboratório 49
- 14 - Consumo de oxigênio por *B. similis* infectada experimentalmente em novembro/1989 com *E. coelomaticum* e por moluscos não-infectados 53
- 15 - Consumo de oxigênio por *B. similis* infectada experimentalmente em março/1990 com *E. coelomaticum* e por moluscos não-infectados 53



- 16 - Relação entre tamanho e peso das conchas de *B. similaris* infectada experimentalmente com *E. coelomaticum* 58
- 17 - Relação entre peso das conchas e concentração de cálcio nas conchas de *B. similaris* infectada experimentalmente com *E. coelomaticum* 60
- 18 - Relação entre tamanho e peso das conchas de *B. similaris* não-infectada 59
- 19 - Relação entre peso das conchas e concentração de cálcio nas conchas de *B. similaris* não-infectada 61
- 20 - Corte histológico, mostrando o início da separação entre o endocisto e o saco membranoso, no esporocisto de segunda geração de *E. coelomaticum* em desenvolvimento 65
- 21 - Relação de tamanho entre o esporocisto expelido e o endocisto de *E. coelomaticum* 65
- 22 - Corte histológico do esporocisto expelido de *E. coelomaticum*, mostrando o aspecto degenerativo da estrutura celular da parede do esporocisto 66

## LISTA DE TABELAS

TABELA		Pág.
I	- Composição química da ração Nuvicol	16
II	- Composição química das soluções salinas fisiológicas utilizadas para a obtenção de ovos de <i>E. coelomaticum</i>	19
III	- Etapas do processamento histológico até a inclusão em parafina, seguindo-se o corte com micrótomo, a coloração e a montagem em bálsamo do Canadá	28
IV	- Eliminação de ovos por <i>E. coelomaticum</i> em diferentes soluções salinas fisiológicas	33
V	- Infecção experimental de <i>B. similaris</i> com ovos embrionados de <i>E. coelomaticum</i>	34
VI	- Duração do desenvolvimento larval de <i>E. coelomaticum</i> em <i>B. similaris</i> sob condições de laboratório	35

VII -	Temperatura do laboratório relacionada com a infecção realizada em novembro/1989	36
VIII -	Temperatura do laboratório relacionada com a infecção realizada em março/1990	36
IX -	Consumo médio de oxigênio por <i>B. similaris</i> infectada experimentalmente com <i>E. coelomaticum</i> em novembro/1989 e por moluscos não-infectados	51
X -	Consumo médio de oxigênio por <i>B. similaris</i> infectada experimentalmente com <i>E. coelomaticum</i> em março/1990 e por moluscos não-infectados	51
XI -	Concentração de cálcio nas conchas de <i>B. similaris</i> infectada experimentalmente com <i>E. coelomaticum</i> , em função do tamanho e peso das conchas	55
XII -	Concentração de cálcio nas conchas de <i>B. similaris</i> não-infectada, em função do tamanho e peso das conchas	56

## RESUMO

Para o acompanhamento do desenvolvimento larval de *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892 Looss, 1907 em *Bradybaena similis* (Férussac, 1821), através de infecções experimentais, foram estabelecidas três classes de tamanho para os moluscos, com base no diâmetro da concha: classe A - 13,3 a 10,2 mm; classe B - 9,2 a 6,2 mm; e classe C - 5,8 a 3,0 mm. Apenas os moluscos das classes A e B adquiriram a infecção.

Para obtenção de ovos de *E. coelomaticum* foram testadas três soluções salinas fisiológicas: a solução de Earle, a solução de Locke e a solução salina fisiológica a 0,85%. A solução salina que induziu uma maior eliminação de ovos foi a solução de Locke. Observação comprovada com o teste de Tukey (L = 1%).

A rota de migração dos estágios larvais de *E. coelomaticum* através da massa visceral de *B. similis* foi estabelecida com acompanhamento histológico. A emergência dos

esporocistos de segunda geração ocorreu via pneumóstoma do molusco, sempre durante a noite. O ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração mostrou uma correlação positiva com aumento da temperatura.

A duração mínima do desenvolvimento larval, intramolusco, do *E. coelomaticum*, culminando com a primeira eliminação dos esporocistos de segunda geração, foi de 79 dias para a infecção realizada em novembro/1989 e 107 dias para a infecção realizada em março/1990.

Durante o desenvolvimento larval, intramolusco, do *E. coelomaticum* foram registrados e analisados estatisticamente, o consumo de oxigênio por moluscos infectados e não-infectados e a deposição de cálcio nas conchas dos moluscos infectados e não-infectados. Os resultados relativos ao consumo de oxigênio foram analisados estatisticamente pelo teste "T" de Student ( $L = 5\%$ ) e pela regressão linear simples, tendo ambos mostrado que a infecção não alterou o consumo de oxigênio pelos moluscos. Entretanto, a regressão linear simples mostrou uma correlação positiva ( $r = 0,105$ ) entre o tempo pós-infecção e o consumo de oxigênio pelos moluscos do grupo controle (não-infectados), na infecção de março/1990. Com relação à deposição de cálcio nas conchas, a análise de regressão linear simples mostrou uma correlação negativa ( $r = -0,277$ ) entre o peso das conchas e a concentração de cálcio nas conchas dos moluscos infectados, quando comparados aos não-infectados. Estudo histoquímico entre moluscos infectados

e não-infectados, evidenciou um aumento na quantidade de cálcio presente nas células da glândula digestiva dos moluscos infectados, sugerindo a ocorrência de mobilização de cálcio da concha para a glândula digestiva.

Estudo histológico entre moluscos infectados e não-infectados mostrou alterações no ovotestis dos moluscos infectados, sugerindo ocorrência de castração parasitária indireta, nestes hospedeiros. No esporocisto expelido, mostrou que a estrutura celular da parede do esporocisto expelido de *E. coelomaticum* estava desintegrada, com núcleos em degeneração. Glicoconjugados ácidos e neutros foram detectados ao redor das cercárias, sugerindo o início da formação do cisto da metacercária. Glicogênio foi detectado no parênquima do esporocisto, entre as cercárias.

## SUMMARY

To follow the larval development of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907, in *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) three size classes of molluscs were established, according to the shell diameter of the molluscs used during the experimental infections: Class A - 13.3 to 10.2 mm; Class B - 9.2 to 6.2 mm; Class C - 5.8 to 3.0 mm. Only the molluscs belonging to classes A and B acquired the infection. In order to obtain eggs of *E. coelomaticum* three physiological solutions were tested: Earle solution, Locke solution, and physiological saline 0.85%. The physiological solution which induced the best egg release was the Locke solution.

The route of migration of the larval stages of *E. coelomaticum* through the visceral mass of *B. similaris* was followed through histology. The emergence of the second generation sporocysts occurred through the pneumostome, always during the night. The rhythm of elimination of the second

generation sporocysts showed a positive correlation to the increase in temperature.

The minimal period for the intramolluscan development, ending at the expelling of the first sporocysts, was 79 days for the November/1989 infection, and 107 days for the March/1990 infection.

During the intramolluscan development of *E. coelomaticum* data on the oxygen consumption and calcium deposition on shells were collected and statistically analysed for infected and uninfected molluscs. Oxygen consumption was analysed through the Student "T" test ( $L = 5\%$ ) and simple linear regression, indicating that the infection did not alter the mollusc's oxygen consumption. Meanwhile, the simple linear regression showed a positive correlation ( $r = 0.105$ ) between post-infection time and oxygen consumption by molluscs in the control group (uninfected) in the March/1990 infection. In relation to the calcium deposition on the shells, the simple linear regression analysis showed a negative correlation ( $r = -0.277$ ) between the shell weight and the calcium concentration in the infected molluscs, when compared to the uninfected. Histochemistry study of infected and uninfected molluscs showed an increase in calcium content in the cells of the digestive gland of the infected molluscs, suggesting mobilization of calcium from the shell to the digestive gland.

Histological study of infected and uninfected



molluscs showed alteration in the ovotestis of the infected molluscs, suggesting the occurrence of indirect parasitic castration in these hosts, while that of the expelled sporocysts showed that the cellular structure of the sporocyst wall of *E. coelomaticum* was disintegrated with degenerated nuclei. Acid and neutral glycoconjugates were detected surrounding the cercaria, suggesting the beginning of the metacercaria cyst wall formation. Glycogen was detected in the parenchyma of the sporocyst around the cercaria.

## INTRODUÇÃO

As espécies de trematódeos digenéticos pertencentes à família Dicrocoeliidae Odhner, 1910, tanto quanto são conhecidas, necessitam dois hospedeiros intermediários para que seu desenvolvimento larval se complete, e possam chegar à maturidade no hospedeiro definitivo, na maioria das vezes, mamíferos herbívoros.

No Brasil, como um dos representantes desta família, ocorre a espécie *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907, única deste gênero a ocorrer na América do Sul (TRAVASSOS, 1944). Em sua Tese de Mestrado, MATTOS (1987) discutiu a validade da espécie *E. coelomaticum*.

De acordo com MATTOS (1987), o primeiro hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum*, no Brasil, é *Bradybaena similis* (Férussac, 1821). Espécie de gastrópode terrestre bastante comum em nosso território. É mais frequente nos meses quentes e chuvosos do ano. Em seu período de atividade está sempre acima do nível do solo, nos caules e folhas das

plantas, tornando-se alvo fácil para seus predadores (BOFFI, 1979).

No Brasil, *B. similaris* é encontrada em todos os Estados da União, desde os próximos à linha do Equador até aqueles situados nos limites da Região Sul (ARAÚJO, 1989).

Sobre a biologia de *E. coelomaticum*, conhece-se que a infecção do molusco, bem como dos demais hospedeiros ocorre de forma passiva, pela ingestão dos ovos do helminto eliminados com as fezes dos herbívoros. No interior do molusco, desenvolvem-se duas gerações de esporocistos, e sob a forma de esporocisto de segunda geração deixam os moluscos ficando na pastagem. Estes esporocistos, contendo as cercárias, ficam expostos na vegetação, sendo ingeridos pelo segundo hospedeiro intermediário, o qual de acordo com MATTOS *et al.* (1987), no Brasil, são duas espécies do gênero *Conocephalus* Thünberg, 1815.

O desenvolvimento de *E. coelomaticum* em seu primeiro hospedeiro intermediário, tem sido estudado por vários pesquisadores. Contudo, não há nenhum registro preciso relacionado com a migração dos estágios larvais intramolusco e à emergência dos esporocistos de segunda geração.

TANG & TANG (1977) realizaram um estudo bastante detalhado sobre a biologia de *E. coelomaticum* e concluíram que *B. similaris* é o primeiro hospedeiro intermediário deste helminto na China. Da mesma forma, SAKAMOTO *et al.* (1980), a partir de observações feitas a campo e de infecções experi-

mentais concluíram que no Japão, este molusco é o primeiro hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum*.

O presente estudo teve como objetivos: (1) verificar a eliminação de ovos por *E. coelomaticum* em diferentes formulações de soluções salinas fisiológicas; (2) analisar histologicamente a rota de migração dos estágios larvais de *E. coelomaticum* pela massa visceral de *B. similaris*; (3) relacionar a temperatura do interior do laboratório com a duração do desenvolvimento larval intramolusco de *E. coelomaticum* culminando com a primeira eliminação dos esporocistos de segunda geração; (4) avaliar a influência do parasitismo por *E. coelomaticum* sobre o armazenamento de glicogênio e cálcio nas células da glândula digestiva de *B. similaris*; (5) avaliar a influência do parasitismo por *E. coelomaticum* sobre a deposição de cálcio nas conchas dos moluscos e sobre o consumo de oxigênio pelos moluscos; e (6) analisar histológica e histoquimicamente o esporocisto expelido de *E. coelomaticum*.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Rota de migração intramolusco e eliminação dos estágios larvais de trematódeos digenéticos.

No que se refere à rota de migração intramolusco e à eliminação dos estágios larvais dos trematódeos digenéticos, a maioria dos trabalhos já realizados dizem respeito ao estágio cercária de alguns strigeídeos, havendo poucas informações sobre outros grupos.

BRUMPT (1941) observou cercárias de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 dentro de ovos de *Australorbis glabratus* (Say, 1818) e concluiu que a migração ocorria via duetos genitais. Para DUKE (1952) o "sistema sanguíneo" era a principal rota de migração para as cercárias de *S. mansoni* em seu hospedeiro molusco, e que essa migração ocorreria, principalmente, através do sinus retal.

KENDALL & McCULLOUGH (1951) observaram que as cercárias

de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, passavam para um sítio de emergência, na região contígua ao ânus do molusco.

PROBERT & ERASMUS (1965) verificaram a rota de migração de Cercária x Baylis em *Lymnaea stagnalis* Linnaeus, 1758. Segundo estes autores, a principal rota de migração dos estágios larvais no molusco seria o "sistema sanguíneo". As cercárias penetrariam no espaço hemocelomático por ruptura da tônica própria, atingindo o "vaso venoso principal".

KOZUTSUMI & ITAGAKI (1989) , referência que faz menção à rota de migração intramolusco e à emergência do estágio esporocisto. Segundo estes autores, no molusco *B. similis*, os esporocistos de segunda geração de *E. pancreaticum* (Janson, 1889) migrariam através dos sinus retal e lateral, emergindo para o exterior por perfuração do manto em ambos os lados do pneumóstoma. Nenhum esporocisto de segunda geração foi encontrado emergindo pelo pneumóstoma.

Alguns trabalhos que embora não visassem o entendimento da rota de migração, fazem referência à emergência do estágio esporocisto. TANG (1950), ao dissecar espécimes de *B. similis* infectados com *E. pancreaticum*, após 165 dias de infecção observou que alguns esporocistos de segunda geração já estavam totalmente desenvolvidos emigrando para a porção anterior da abertura respiratória do molusco. TANG & TANG (1977) observaram que o completo desenvolvimento de *E. coelomaticum* em *B. similis* durava seis meses e, que após este período os esporocistos de segunda geração migravam para

o pneumóstoma. SAKAMOTO *et al.* (1980) observaram vários esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* na abertura respiratória de *B. similis*, aos 150 dias pós-infecção, sugerindo que a emergência ocorria via pneumóstoma.

## **2. Condições ambientais e fisiológicas dos hospedeiros e a duração do desenvolvimento larval intramolusco de trematódeos digenéticos.**

Vários fatores têm sido incriminados como variáveis que afetam o desenvolvimento de parasitos em moluscos. O efeito da temperatura, à qual o molusco está exposto sobre o desenvolvimento de trematódeos digenéticos tem sido estudado por diversos pesquisadores. E dessa forma, foi demonstrado que a velocidade de desenvolvimento do helminto é diretamente proporcional à temperatura ambiente, sob a qual o molusco mantido durante o período de infecção (SMYTH, 1966).

CHINONE *et al.* (1976) estudaram o desenvolvimento de *E. pancreaticum* em *B. similis* através de infecções experimentais realizadas em diferentes épocas do ano. Observaram que o período de desenvolvimento larval intramolusco 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 conside-

rado, 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 que havia uma alta prevalência de infecção, para ambos os hospedeiros, no verão, alcançando o pico no outono e diminuindo nos meses de inverno.

Outros fatores importantes que podem influenciar o desenvolvimento dos parasitos são: o estado nutricional, o tamanho e idade do hospedeiro. Uma dieta não-equilibrada, pode deixar de fornecer elementos necessários para o perfeito funcionamento do sistema imunológico do hospedeiro, tornando-o mais susceptível à infecção. Por outro lado e, particularmente, quando mecanismos de resistência não estão claramente envolvidos, o fato de haver uma associação bem sucedida entre parasito/hospedeiro, sugere que o sucesso de um é dependente do sucesso do outro (KENDALL, 1964). Segundo este autor, espécimes de todas as idades e tamanhos são susceptíveis à infecção, quando se trabalha com o hospedeiro adequado. MALEK (1950) in KENDALL (1964) discutiu o efeito da idade do molusco sobre sua susceptibilidade à infecção e, chegou à conclusão de que a idade tem pouco ou nenhum efeito sobre a susceptibilidade do molusco à infecção. Embora tenha observado, espécimes jovens de *Biomphalaria boissyi* (Potiez & Michaud), raramente, infectados com *S. mansoni*.



### **3. Alterações histopatológicas nas gônadas de moluscos, como resultado da infecção por trematódeos digenéticos.**

A presença de certos helmintos, especialmente estágios larvais de trematódeos digenéticos, provocam uma eliminação total ou parcial na produção de ovos pelos moluscos (ETGES & GRESSO, 1965). As alterações causadas por trematódeos digenéticos nas gônadas de seus hospedeiros, de acordo com CHENG *et al.* (1983) podem ser classificadas como castração parasitária química do tipo indireto, quando os estágios larvais não se localizam nas gônadas. Ao contrário da castração parasitária química do tipo direto, observada por CREWS & ESCH (1987), com esporocistos de *Diplostomum scheuringi* (Hughes, 1929) localizados no ovotestis de *Helisoma anceps* (Menke).

PEARSON & CHENG (1985) pesquisaram sobre o agente causador da castração parasitária e, concluíram que esporocistos de *Zoogonus lasius* (Leidy, 1891) liberaram uma substância capaz de causar inibição parcial da espermatogênese. Uma substância de origem endócrina, detectada na hemolinfa de *Lymnaea stagnalis* (Say) infectada com *Trichobilharzia ocellata* (La Valette, 1855), parece ser um forte concorrente ao papel de agente causador da redução da fecundidade nos moluscos infectados (de JONG-BRINK *et al.*, 1988 e JOOSSE & van ELK, 1986).

#### **4. Influência do parasitismo por trematódeos digenéticos sobre a composição química e metabolismo dos moluscos.**

Trabalhando com *Allassostoma* Stunkard, 1917, *Fasciola* Linnaeus, 1758 e *Fascioloides* Ward, 1917, von BRAND (1938) in von BRAND & FILES (1947) observou que estes parasitos armazenavam grande quantidade de glicogênio. WEINLAND & von BRAND (1926) in KENDALL (1964), observaram que *Fasciola* apresentava metabolismo, predominantemente anaeróbico, no qual o glicogênio servia como substância "mãe" para processos produtores de energia.

De acordo com CHENG (1963), a baixa tensão de oxigênio presente na glândula digestiva dos moluscos, associada ao tamanho relativamente grande dos estágios larvais de trematódeos digenéticos, produzem um ambiente essencialmente anaeróbico. Por esta razão, a presença de glicogênio nestes estágios larvais é significativa. Segundo McMANUS (1987) os carboidratos se constituem na maior reserva de energia em muitos helmintos adultos e, o glicogênio em particular, está geralmente presente em quantidades apreciáveis. Sendo essa reserva de energia armazenada nos estágios larvais.

De acordo com BECKER (1970) a localização dos esporocistos na glândula digestiva é bastante estratégica devido, principalmente, à circulação especial de hemolinfa neste órgão. A boa suplementação de nutrientes para os esporocistos,

permite que eles cresçam mais rapidamente na glândula digestiva do que em qualquer outra parte do corpo do molusco. Por isso, os esporocistos perdem sua motilidade na glândula digestiva antes do que em qualquer outro órgão.

A perda de glicogênio pelas células da glândula digestiva dos moluscos, indica que de alguma maneira a quebra deste polissacarídeo até glicose é estimulada pela presença do parasito e, que as moléculas de glicose devem ser utilizadas pelos parasitos para a produção de energia ou para formar novas moléculas de glicogênio (MALEK & CHENG, 1974).

Para ISHAK *et al.* (1975) o acentuado decréscimo na glicogênese nos tecidos de moluscos, em decorrência da infecção por *Schistosoma* pode ser explicado de duas maneiras: (1) a infecção inibe a produção de ATP, fazendo com que haja uma diminuição na atividade do ciclo de Krebs e conseqüentemente, na glicogênese ou, (2) a infecção reduz a oxidação aeróbica do piruvato e provavelmente, diminua a produção de Acetil-Coenzima A requerida para a ativação do ciclo de Krebs. De acordo com estes autores, a fase anaeróbica de utilização da glicose (glicólise) mostrou ser ativada como via alternativa para suprir a energia requerida pelo molusco. A observada diminuição no conteúdo de glicogênio nos tecidos de moluscos infectados, pode resultar também de um aumento na taxa de utilização do glicogênio (glicogenólise).

von BRAND & FILES (1947) observaram que não existe diferença significativa de consumo de oxigênio por moluscos

infectados e não-infectados. LEE & CHENG (1971) observaram através de análise de regressão que a taxa de oxigênio exigida pelos moluscos infectados aumentava em função do tempo, enquanto que a dos moluscos controle diminuía.

Para BECKER (1980) é surpreendente que a conversão total de energia em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infectada com *S. mansoni*, não seja significativamente alterada. Baseado em medidas de consumo de oxigênio, metabolismo aeróbico (von BRAND & FILES, 1947) e em medidas do metabolismo total por microcalorimetria (BECKER & LAMPRECHT, 1977), o autor concluiu que, provavelmente, isto fosse devido a uma excelente adaptação parasito/hospedeiro.

De acordo com WILBUR (1964) a quantidade de cálcio depositada nas conchas dos moluscos é resultante da concentração de cálcio no ambiente e da quantidade de cálcio ingerida pelo molusco. Segundo BURTON (1972) e de WITH & SMINIA (1980), o epitélio do manto e a concha desempenham importante papel no processo regulador de cálcio, no organismo do molusco. O excesso de cálcio na hemolinfa poderá causar uma maior deposição de cálcio nas conchas, e o déficit causará uma transferência de cálcio da concha para a hemolinfa.

CHENG (1971) observou que a glândula digestiva de moluscos infectados por estágios larvais de trematódeos digenéticos, apresenta aumento do número de dois tipos de glóbulos de origem intracitoplasmática, os glóbulos excretores ou fermentativos e os esferitos de cálcio, especialmente quando

a associação parasito/hospedeiro é longa. Dessa forma, quantidades significativas de cálcio podem ser detectadas, quimicamente, na glândula digestiva de moluscos infectados. O cálcio, carregado pela hemolinfa é depositado no manto e incorporado na concha, contribuindo para o aumento do peso das conchas dos moluscos infectados.

WILSON & DENISON (1980) verificaram que as conchas de *Lymnaea truncatula* (Müller) quando infectada com *F. hepatica*, mostravam-se significativamente maiores quando comparadas àquelas dos moluscos não-infectados. CHENG *et al.* (1983) observaram que *Ilyanassa obsoleta* (Say, 1822) quando infectada com *Zoogonus lasius*, apresentava aumento no tamanho da concha. Sugerindo então, que a infecção por *Z. lasius* poderia causar aumento do tamanho da concha em decorrência de uma maior deposição de cálcio, possivelmente, como resultado da castração parasitária. Entretanto, a remoção da demanda de nutrientes das gônadas, ou talvez a eliminação da substância gonadal que regula o crescimento em moluscos castrados, pode causar um aumento na taxa de crescimento. Por exemplo, *Bulinus truncatus* (Audouin), oito semanas após a castração cirúrgica, apresentava aumento do peso total e, conseqüentemente do crescimento (de JONG-BRINK *et al.*, 1979).

##### **5. Morfologia e composição química do esporocisto expelido de *Eurytrema*.**

A estrutura do esporocisto expelido de *Eurytrema* foi estudada por diversos autores, entre os quais: DENTON (1944), TANG (1950), ZDARSKA (1979a e b) e NESTERENKO *et al.* (1980). Estes autores observaram e discutiram a presença de um envelope adicional no interior do esporocisto com função de dar maior proteção às cercárias.

ZDARSKA (1979a) fez estudos histológicos, histoquímicos e ultra-estruturais, analisando em detalhe a parede do esporocisto expelido de *E. pancreaticum*, durante o seu desenvolvimento. Observou a presença de dois sacos, um interno, o endocisto, e um externo que chamou de saco membranoso, os quais inicialmente estavam unidos formando uma parede única, separando-se somente no esporocisto totalmente desenvolvido. De acordo com ZDARSKA (1979b) os dois sacos desempenham funções diferentes durante o desenvolvimento das cercárias.

NESTERENKO *et al.* (1980) através de estudos histológicos e ultra-estruturais, observaram que o endocisto de *Eurytrema* é uma estrutura originada de tecido conjuntivo e formada por células do parênquima da camada interna da parede do esporocisto.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi desenvolvido no laboratório nº 7 (destinado a estudos sobre o relacionamento parasito/hospedeiro, envolvendo moluscos e trematódeos digenéticos) da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### **1. Estabelecimento da colônia de *Bradybaena similaris* em condições de laboratório.**

Os moluscos utilizados para o estabelecimento da colônia no laboratório foram coletados em jardins e hortas localizados nas circunvizinhanças do Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Nos meses mais quentes do ano, as coletas foram realizadas no início da manhã ou no final da tarde, períodos

em que a temperatura era mais baixa e, os moluscos se apresentavam mais ativos, localizando-se sobre as folhas das hortaliças, sendo mais facilmente coletados. Nos meses com temperaturas mais baixas ou em dias chuvosos, a tolerância dos moluscos não foi, obrigatoriamente, feita nestes horários, já que os moluscos apresentavam-se mais ativos o que, consequentemente, facilitava a coleta.

Os moluscos foram criados em terrários feitos de vidro com 55,0 cm de comprimento, 30,0 cm de largura e 30,0 cm de altura. Os terrários receberam uma camada de 10,0 cm de terra vegetal especial\*, utilizada para jardinagem, esterilizada em estufa a uma temperatura aproximada de 80 °C e, foram cobertos por tela de nylon de malha fina, a qual possibilitava uma perfeita aeração do interior do terrário, evitando ainda, a penetração de insetos e a saída dos moluscos. Grupos com, aproximadamente, 30 moluscos foram mantidos no interior desses terrários.

Por serem polifitófagos os moluscos aceitavam bem qualquer variedade de hortaliça. A alimentação básica envolveu o repolho e, esporadicamente, alface e cenoura, além de uma fonte suplementar de nutrientes fornecida pela ração Nuvicol\*\*. A composição química básica da ração Nuvicol, que foi desenvolvida para atender aos helicicultores, está na Tabela I. A ração era fornecida aos moluscos em pequenas placas

\* Marca Adubos Campo Grande Ltda.

\*\* Nuvital Nutrientes Ltda.



de plástico e renovada sempre que o terrário era limpo, ou quando os moluscos a tivessem consumido. Os alimentos eram trocados a cada dois dias e a terra umidecida com água, usando um pulverizador\*, em igual intervalo de tempo.

A limpeza dos terrários, era feita semanalmente, com uma esponja molhada com água. Tal medida foi adotada tendo em vista que estes moluscos deixam seus dejetos nas paredes laterais dos aquários, assim como a mucilagem que liberam para o deslocamento. Os resíduos deixados sobre a terra eram retirados com uma espátula e, a terra renovada mensalmente.

A cada dois dias, examinava-se a terra do interior do terrário, à procura de posturas. Os ovos eram coletados, contados e cada postura era, individualmente, transferida para uma placa de petri pequena, a qual recebia uma etiqueta de identificação, onde constavam o número do terrário de onde a postura procedia, a data da postura e o número de ovos.

Tabela I. Composição química básica da ração Nuvicol.

Componentes	
Ração Nuvicol	Aveia, farinha de soja, milho moído, farelo de trigo, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, sal comum, farinha de algas, farinha de arroz pré-gelatinizado, vitaminas e microelementos minerais.

\* Marca Brudden Equipamentos Ltda.

## **2. Registro da temperatura.**

A temperatura do interior do laboratório foi registrada usando um termômetro\*, para temperaturas máxima e mínima. O registro era feito diariamente, com as anotações realizadas às 10:00 horas da manhã, durante todo o período de experimento.

## **3. Obtenção de ovos de *Eurytrema coelomaticum*.**

Pâncreas de bovinos infectados com *E. coelomaticum* foram obtidos no Matadouro Municipal de Nilópolis, Nilópolis, RJ. O pâncreas era recolhido em recipiente plástico contendo solução salina fisiológica a 0,85% e levado até o laboratório nas dependências da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde a coleta dos helmintos presentes nos ductos pancreáticos era processada.

A coleta dos helmintos era realizada com auxílio de tesoura de ponta fina, estilete e pincel nº 2. Os helmintos eram separados em grupos de 35 espécimes e transferidos para placas de petri contendo solução salina fisiológica, onde permaneciam por 24 horas, à temperatura ambiente, para que eliminassem os ovos. Foram utilizadas diferentes formulações

\* Marca Incotero Indústria de Termômetros Ltda.

de soluções salinas fisiológicas, como: solução de Earle (HUMASON, 1972), solução de Locke (HUMASON, 1972) e solução fisiológica a 0,85%. A composição química de cada solução utilizada, pode ser verificada na Tabela II.

O conteúdo líquido de cada placa, bem como os helmintos, era passado para uma peneira colocada sobre cálices de sedimentação. Sobre o material contido na peneira, derramava-se água destilada, para que todos os ovos eliminados, e os que por ventura estivessem aderidos ao tegumento dos helmintos, passassem para o interior dos cálices. Os helmintos eram retirados destas peneiras e processados de acordo com AMATO (1985). Os cálices de sedimentação permaneciam em repouso por duas horas. Após esse período o sobrenadante era desprezado e o sedimento transferido para pequenos recipientes, contendo água destilada, sendo mantidos no refrigerador até serem utilizados nas infecções experimentais dos moluscos.

Tabela II. Composição química das soluções fisiológicas utilizadas para a obtenção de ovos de *Eurytrema coelomaticum*.

Compostos químicos	Solução de Earle †	Solução de Locke †	Solução Fisiol. a 0,85%
Bicarbonato de Sódio	0,14 g	0,30 g	-
Cloreto de Cálcio	0,20 g	0,24 g	-
Cloreto de Potássio	0,40 g	0,42 g	-
Cloreto de Sódio	6,80 g	8,50 g	8,50 g
Fosfato de Sódio	2,20 g	-	-
Glicose	1,00 g	1,00 g	-
Sulfato de Magnésio	0,10 g	-	-
H <sub>2</sub> O Destilada	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml

† De acordo com HUMASON (1972)

4. Determinação do número de ovos de *Eurytrema coelomaticum* eliminados nas soluções salinas fisiológicas utilizadas.

Com o objetivo de avaliar o estímulo dado pelas soluções fisiológicas, para a eliminação de ovos por *E. coelomaticum*, procedeu-se a contagem dos ovos em alíquotas. Os recipientes contendo os ovos eliminados em cada uma das soluções salinas fisiológicas utilizadas, eram retirados do refrigerador e agitados. Retiravam-se, então, alíquotas de cada recipiente, as quais eram pipetadas em câmaras de McMaster, com um volume conhecido de 0,30 ml, sendo o volume de cada área da câmara 0,15 ml. Com auxílio de microscópio, os ovos presentes em cada área das câmaras eram contados e, somando-se os valores, obtinha-se, o número total de ovos por câmara. Dessa forma, foi feita uma estimativa do número total

de ovos eliminados em cada solução salina fisiológica utilizada. Para cada frasco foram feitas três contagens, calculando-se, então, o valor médio.

### **5. Infecção experimental de *Bradybaena similaris* com ovos embrionados de *Eurytrema coelomaticum*.**

Os moluscos utilizados nas infecções experimentais, foram aqueles nascidos no laboratório, o que garantia estarem livres de qualquer infecção.

Os moluscos foram medidos, com auxílio de paquímetro\*, e separados em grupos. A medida escolhida para avaliar o tamanho dos moluscos\*\* foi o diâmetro da concha. Dessa forma, três classes de diferentes tamanhos, foram estabelecidas. A classe A era formada por moluscos com tamanho variando entre 13,3 e 10,2 mm; a classe B, moluscos com tamanho entre 9,2 e 6,2 mm; e a classe C, moluscos com tamanho entre 5,8 e 3,0 mm.

Para as infecções experimentais, foram utilizadas placas de petri com 10,0 cm de diâmetro por 2,0 cm de altura. Os ovos de *E. coelomaticum* eram pipetados sobre pedaços de folha de repolho, no interior destas placas. Grupos com cinco moluscos, dentro de cada classe de tamanho, foram submetidos

\* Marca Mitutoyo.

\*\* Tamanho da concha não foi relacionado com idade dos moluscos.

ao contato direto com os ovos do helminto.

Os ovos utilizados nas infecções foram aqueles que apresentavam coloração castanho-escuro e com o miracídio desenvolvido em seu interior, de acordo com TANG (1950). Aproximadamente, 50 ovos foram utilizados para cada grupo de moluscos.

O tempo de contato com os ovos do helminto foi de duas horas. Durante esse período os moluscos foram observados para se ter certeza de que estavam se alimentando e, com isso ingerindo os ovos. Terminado o tempo de contato com os ovos, os moluscos foram transferidos para terrários iguais aos utilizados para a manutenção da colônia no laboratório. Em ficha controle foram registrados: a data da infecção, a classe de tamanho a que os moluscos pertenciam, a solução salina fisiológica na qual os ovos foram eliminados, e a data em que os ovos foram eliminados.

## **6. Acompanhamento da rota de migração dos estágios larvais de *Eurytrema coelomaticum* em *Bradybaena similis*.**

O acompanhamento da rota de migração dos estágios larvais de *E. coelomaticum* pela massa visceral de seu hospedeiro molusco, foi feito através de estudo histológico. Os moluscos, infectados experimentalmente, foram fixados ainda vivos, para se evitar qualquer distorção, não somente na for-

ma, como também, nas relações de todas as partes dos tecidos, o que poderia produzir uma imagem irreal. Quando os intervalos de infecção eram muito pequenos (minutos ou horas) os moluscos foram fixados ainda no interior das conchas e, quando os intervalos de infecção eram maiores (dias) os moluscos foram retirados da concha antes de serem fixados.

Os moluscos, infectados experimentalmente, foram dissecados periodicamente, de acordo com o tempo necessário para o desenvolvimento de cada estágio larval de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* no hospedeiro molusco, obtido na literatura consultada (TANG, 1950; TANG & TANG, 1977; SAKAMOTO *et al.*, 1980; MATTOS, 1987 e KOZUTSUMI & ITAGAKI, 1989).

#### **7. Acompanhamento do ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum*.**

Sessenta dias após a infecção, os moluscos foram transferidos para placas de petri iguais àquelas utilizadas nas infecções experimentais. O fundo dessas placas foi revestido com papel filtro umedecido com água. Os moluscos receberam, durante todo o período em que permaneceram nestas placas, alimentação estritamente vegetal e, permaneceram sob condições de temperatura ambiente. Estas placas foram observadas diariamente, pela manhã e ao final da tarde, à procura

dos esporocistos eliminados. A troca do alimento era feita a cada dois dias e, a do papel filtro sempre que necessário.

As placas de petri receberam a mesma identificação dos terrários de onde os moluscos procediam, acrescida de um número individual para cada molusco.

#### **8. Determinação do consumo de oxigênio pelos moluscos infectados e não-infectados.**

Para realizar as determinações do consumo de oxigênio foi utilizada uma modificação do aparelho de Pettekofer (FERRI *et al.*, 1977). As determinações foram feitas semanalmente, utilizando-se em cada determinação cinco moluscos infectados e cinco moluscos não-infectados.

Os moluscos foram colocados em um sistema fechado de frascos ligados a um aerizador, por duas horas. O ar que entrava neste sistema passava primeiramente por dois frascos contendo hidróxido de sódio, para que o gás carbônico que por ventura estivesse presente no ar ficasse retido, através da reação com esta base. De modo que, o ar que chegava até o frasco com os moluscos, estava totalmente isento de gás carbônico. Estes moluscos respirando, liberavam gás carbônico que reagia com o hidróxido de sódio, presente no frasco seguinte, alterando sua concentração.

Através da titulação da solução respirada de hi-



dróxido de sódio, com ácido clorídrico a 0,0977 N, utilizando-se como indicador fenolftaleína 1%, foi possível determinar, o volume de ácido clorídrico gasto nesta titulação, que correspondia á massa de oxigênio consumida pelos moluscos. O número de miliequivalentes de hidróxido de sódio que reagiram com o gás carbônico liberado pelos moluscos na respiração, foi calculado e a partir deste valor foi estabelecido o número de miliequivalentes de gás carbônico. Como um miliequivalente de gás carbônico liberado, equivale a um miliequivalente de oxigênio consumido, o número de miliequivalentes de gás carbônico foi igualado ao número de miliequivalentes de oxigênio e a massa de oxigênio consumida foi calculada e expressa em  $\mu\text{g}$  de oxigênio/molusco.

#### **9. Determinação quantitativa de cálcio nas conchas de moluscos infectados e não-infectados.**

Um grupo de 50 moluscos não-infectados foi mantido em um terrário sob as mesmas condições que os infectados, servindo como grupo controle. A medida que os moluscos foram morrendo, foram retirados dos terrários, suas conchas lavadas em água corrente para que os resíduos de tecido fossem retirados e colocadas para secar em placas de petri. Posteriormente, as conchas foram acondicionadas em envelopes de papel

devidamente identificados.

Para a determinação do carbonato de cálcio, forma na qual o cálcio se encontra nas conchas dos moluscos, foi utilizada uma modificação da técnica de volumetria de complexação (VOGEL, 1961 e McCORNICK, 1973). As conchas previamente pesadas em balança de precisão\*, foram diluídas em 10 ml de ácido clorídrico 12 N. As amostras das conchas solubilizadas foram diluídas a 1:10 em água destilada. Em seguida foram pipetados 25 ml desta solução diluída para um erlenmeyer, aos quais foram adicionados 40 ml de água destilada, 30 ml de hidróxido de potássio a 10% e o indicador murexida, respectivamente. A murexida forma um complexo com o cálcio, de coloração vermelho-cereja. A titulação da mistura foi realizada com uma solução de EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid) 0,01 M, até haver mudança na coloração de vermelho-cereja para lilás. O EDTA remove o cálcio do complexo cálcio-murexida, formando o complexo cálcio-EDTA, liberando o indicador, que livre, apresenta a coloração lilás. A partir do volume gasto de EDTA, nesta titulação, a massa de cálcio sob a forma de carbonato de cálcio foi calculada e expressa em ppm  $\text{CaCO}_3/\text{mg}$  concha.

\* Marca Mettler modelo H31.

## **10. Processamento histológico e histoquímico dos moluscos infectados e não-infectados e dos esporocistos expelidos de *Eurytrema coelomaticum*.**

Os moluscos a serem utilizados nos estudos histológicos e histoquímicos, foram separados em placas de petri contendo papel litro umedecido com água e receberam alimentação exclusivamente vegetal, permanecendo nessas placas por uma semana. Este procedimento foi adotado para que os possíveis grãos de terra que estivessem presentes no trato digestivo destes moluscos pudessem ser eliminados, possibilitando cortes histológicos perfeitos.

Após este período, as partes moles foram retiradas do interior das conchas, sob observação ao estereomicroscópio, através de uma leve pressão, suficiente para quebrar a concha sem prejudicar os tecidos do molusco, e com auxílio de pinças de ponta fina os fragmentos das conchas foram retirados e colocados à parte. A massa visceral do molusco foi distendida sobre uma placa de petri própria para a dissecação de moluscos e, presa por alfinetes finos, feito isso o líquido fixador foi derramado sobre o molusco, até cobri-lo totalmente.

A escolha do fixador foi feita de acordo com os tratamentos subsequentes (métodos de coloração incluindo histologia e histoquímica) a serem utilizados. Em virtude disso,

na fixação foram utilizados: formalina a 10% (LUNA, 1968), líquido de Bouin (LUNA, 1968), formol cálcio (LUNA, 1968) e líquido fixador Dubosq-Brasil modificado (Etanol 80°GL - 600 ml; Acido acético glacial - 150 ml e Formalina comercial-250 ml). Quando a fixação foi feita com Bouin, houve a necessidade de remover o ácido pícrico, com lavagens sucessivas em etanol 70°GL. Os esporocistos expelidos foram retirados das placas de petri e fixados com formalina 10%. Passado o tempo de fixação, os moluscos e os esporocistos expelidos foram transferidos para etanol 70°GL, onde permaneceram até serem processados histologicamente.

Considerando-se a estrutura delicada dos tecidos dos moluscos e dos esporocistos, a desidratação bem como, as demais etapas que antecederam à inclusão em parafina, foram realizadas progressivamente. As etapas do processamento histológico dos moluscos e esporocistos expelidos, com as respectivas substâncias utilizadas e o tempo de duração de cada etapa podem ser observados na Tabela III.

Tabela III. Etapas do processamento histológico até a inclusão em parafina, seguindo-se o corte com micrótomo, a coloração e a montagem em bálsamo do Canadá.

ETAPAS	FINALIDADES	DURAÇÃO
1. Fixação: Líquido de Bouin, Formalina a 10%, Formol Cálcio ou Dubosq-Brasil modificado.	Preservar a morfologia e a composição química dos tecidos, encontrados nos moluscos vivos e esporocistos.	Cerca de duas horas como o líquido Bouin, podendo chegar a 12 horas com os demais fixadores.
2. Desidratação: Série alcoólica crescente, indo do etanol 70 °Gl até o etanol absoluto.	Remover a água dos tecidos.	Cerca de 20 a 30 minutos, dependendo do tamanho do material.
3. Diafanização: Xilol, começando por uma mistura de etanol absoluto/xilol 1:1, seguindo dois banhos em xilol puro.	Embeber o material em xilol, substância miscível com a parafina.	Cerca de 20 a 30 minutos, dependendo do tamanho do material.
4. Impregnação: Parafina misturada com cera de abelha, realizada em estufa a 58 °C.	A parafina penetra nos espaços intercelulares e mesmo no interior das células, impregnando todo o tecido.	Cerca de 20 a 30 minutos, dependendo do tamanho do material.
5. Inclusão: O material foi colocado em um molde contendo parafina e deixado fora da estufa para que esta solidificasse.	Obtenção do bloco de parafina, contendo o material incluído.	O tempo necessário para que a parafina solidificasse.
6. Corte: Realizados em micrótomo Spencer "820" da American Optical Co.	Obtenção de cortes seriados com 7 µm de espessura.	Esta etapa não teve duração pré-determinada.

Para o acompanhamento da rota de migração dos estágios larvais de *E. coelomaticum* pela masa visceral de *B. similis*, análise comparativa da morfologia do ovotestis de moluscos infectados e não-infectados, e o estudo da morfologia dos esporocistos expelidos foi utilizada a técnica de to-

loração Hematoxilina-Eosina (LUNA, 1968).

Para o estudo histoquímico comparativo entre moluscos infectados e não-infectados e dos esporocistos expelidos foram utilizadas as seguintes técnicas de coloração: Para detecção de glicoconjugados (mucopolissacarídeos) foram utilizados o Alcian Blue em pH 2,5 (LUNA, 1968), para glicoconjugados ácidos, Alcian Blue/Acido Periódico de Schiff (PAS) (LUNA, 1968) e PAS (LUNA, 1968), para glicoconjugados neutros. Como reação de bloqueio ao PAS foi utilizada a técnica Amilase + PAS (COOK, 1977). Para glicogênio foi utilizado o Carmim de Best (LUNA, 1968). Para detecção de cálcio foram utilizados os métodos de Dahl (LUNA, 1968) e von Kossa modificado (MALLORY, 1941) in (LUNA, 1968).

#### **11. Análise estatística.**

A eliminação de ovos por *E. coelomaticum*, nas três soluções salinas fisiológicas utilizadas, foi submetida à análise estatística pelo teste de Tukey, para comparação de médias, com nível de significância de 1% (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

A temperatura registrada no interior do laboratório, foi relacionada com a duração mínima do desenvolvimento larval intramolusco de *E. coelomaticum*, nas duas épocas de infecção estudadas, e submetida à análise estatística, pelo

teste "F" de Snedecor, com nível de significância de 5% (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

A duração do desenvolvimento larval intramolusco de *E. coelomaticum*, culminando com a primeira eliminação dos esporocistos de segunda geração, nas duas épocas de infecção estudadas, foi analisada estatisticamente, pelos testes "T" de Student para populações heterocedásticas e Qui-Quadrado, com nível de significância de 5% (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

O ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração pelos moluscos, foi relacionado com a temperatura (máxima e mínima) do interior do laboratório, nas duas épocas de infecção estudadas, e analisado estatisticamente, pelo teste de Regressão Linear Simples; o consumo de oxigênio por moluscos infectados e não-infectados, foi analisado estatisticamente, pelos testes "T" de Student com nível de significância de 5%, e de Regressão Linear Simples; e a concentração de cálcio nas conchas dos moluscos infectados e não-infectados, analisada estatisticamente, pelo teste de Regressão Linear Simples (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

## 12. Fotomicrografias.

As fotomicrografias dos cortes histológicos dos moluscos infectados e não-infectados e dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* foram feitas com filme

Panatomic - X da Kodak, em microscópio WILD M 20, com câmera fotográfica acoplada, e uma do esporocisto de segunda geração expelido de *E. coelomaticum* em estereomicroscópio Wild, com lente Makrozon 1:5 e câmera fotográfica acoplada.



## RESULTADOS

### 1. Papel de algumas soluções salinas fisiológicas na eliminação de ovos por *Eurytrema coelomaticum*.

Entre as três soluções salinas fisiológicas testadas, a que possibilitou uma maior eliminação de ovos foi a solução de Locke, em todas as determinações realizadas. Seguida da solução salina de Earle e da solução salina fisiológica a 0,85%, respectivamente, conforme pode ser observado na Tabela IV. Após 24 horas, período em que os espécimes de *E. coelomaticum* permaneceram nas soluções salinas fisiológicas, os helmintos ainda estavam vivos, porém, apresentaram movimentos letárgicos.

Tabela IV. Eliminação de ovos por *Eurytrema coelomaticum* em diferentes formulações de soluções salinas fisiológicas.

Soluções salinas	Número de ovos eliminados por determinação†						Totais
	I	II	III	IV	V	VI	
Earle	200	80	478	376	248	446	1828
Locke	800	680	792	856	494	854	4476
Fisiol. a 0,85%	-	400	206	198	124	239	1167
Totais	1000	1160	1476	1430	866	1539	7471

† Foram utilizados 35 espécimes de *E. coelomaticum* em cada determinação.

O teste de Tukey para comparação de médias, demonstrou, ao nível de significância de 1%, que os resultados obtidos com a solução salina de Locke diferiram significativamente, daqueles obtidos com as outras soluções e, que as soluções salina de Earle e fisiológica a 0,85%, estatisticamente, apresentaram o mesmo resultado.

## 2. Infecção experimental de *Bradybaena similis* com ovos embrionados de *Eurytrema coelomaticum*.

A Tabela V mostra os resultados da infecção experimental de 194 moluscos, divididos nas três classes de tamanho pré-estabelecidas. Apenas os moluscos das classes tamanho A e

B adquiriram a infecção. A classe A foi a que apresentou maior número de moluscos infectados (52,7% e 45%), para as infecções realizadas em novembro/1989 e março/1990, respectivamente. Na classe C nenhum molusco adquiriu a infecção, nas duas épocas de infecção estudadas. Comparando-se os resultados percentuais totais para as duas épocas de infecção estudadas, verifica-se que não existe diferença significativa entre eles.

Tabela V. Infecção experimental de *Bradybaena similaris* com ovos embrionados de *Eurytrema coelomaticum*.

Classe de Tamanho	No. de moluscos utilizados		No. de moluscos infectados		Porcentagem (%) de infecção	
	Nov./89	Mar./90	Nov./89	Mar./90	Nov./89	Mar./90
A	36	40	19	18	52,7	45,0
B	28	30	6	8	21,4	26,6
C	30	30	0	0	0	0
Total	94	100	25	26	26,6	26,0

Classe A - moluscos com diâmetro de concha de 13,3 a 10,2 mm

Classe B - moluscos com diâmetro de concha de 9,2 a 6,2 mm

Classe C - moluscos com diâmetro de concha de 5,8 a 3,0 mm

### 3. Temperatura e duração do desenvolvimento larval de *Eurytrema coelomaticum* em *Bradybaena similaris*.

Para as infecções realizadas em novembro/1989, o tempo mínimo de desenvolvimento nos moluscos, desde a ingestão dos ovos até a primeira eliminação dos esporocistos de segunda geração foi de 79 dias. Para as infecções realizadas em março/1990, o tempo mínimo de desenvolvimento nos moluscos foi de 107 dias. A duração individual do período parasitário, assim como a duração mínima e a média para as duas épocas de infecção estudadas podem ser verificadas na Tabela VI. As temperaturas médias mensais registradas para as duas épocas de infecção, podem ser verificadas nas Tabelas VII e VIII.

Tabela VI. Duração do desenvolvimento larval de *Eurytrema coelomaticum* e, *Bradybaena similis* sob condições de laboratório.

Início da infecção	Duração Individual (dias)	Duração Mínima (dias)	Duração Média (dias)
Novembro/89	79, 79, 80	79	79
Março/90	107, 108, 109, 113, 128, 180	107	124

A análise estatística dos resultados relacionados com a duração do desenvolvimento larval intramolusco de *E. coelomaticum*, para as duas épocas de infecção, pelos testes "T" de Student para populações heterocedásticas e Qui-Quadrado, revelou que havia uma diferença significativa, ao nível de significância de 5%, na duração do desenvolvimento

larval intramolusco nas duas épocas de infecção estudadas.

Tabela VII. Temperatura do laboratório relacionada com a infecção realizada em novembro/1989.

Período de Infecção (meses)	Temperatura (°C)	
	Máx.	Mín.
Novembro/89	29,9	25,7
Dezembro/89	30,4	27,1
Janeiro/90	31,3	28,0
Fevereiro/90	30,9	26,3

Tabela VIII. Temperatura do laboratório relacionada com a infecção realizada em março/1990.

Período de Infecção (meses)	Temperatura (°C)	
	Máx.	Mín.
Março	30,2	24,9
Abril	30,1	26,7
Maior	25,5	22,5
Junho	25,4	20,7

A variação da temperatura no laboratório, nas duas épocas de infecção estudadas, foi analisada estatisticamente pelo teste de Análise da Variância, ficando demonstrado que a

temperatura não variou significativamente, nas duas épocas de infecção, ao nível de significância de 5%.

#### **4. Rota de migração e emergência dos esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* em *Bradybaena similaris*.**

Os espécimes de *B. similaris* utilizados para este estudo, foram aqueles infectados experimentalmente em novembro/1989. Através de cortes histológicos seriados, estabeleceu-se a rota de migração de *E. coelomaticum* pela massa visceral do molusco.

Os ovos de *E. coelomaticum* ingeridos pelos moluscos, foram observados no interior de seu trato digestivo, 15 minutos após o contato inicial (Fig. 1). Miracídios livres foram vistos no lúmen do trato digestivo dos moluscos, uma hora após o contato inicial com os ovos (Fig. 2). Após duas horas da ingestão dos ovos, foi possível observar, em corte histológico, um miracídio dentro de uma célula da parede do trato digestivo do molusco (Fig. 3).

Nas dissecações dos moluscos, realizadas aos 10 dias após a infecção, esporocistos de primeira geração foram observados, fixados na serosa da porção posterior do intestino. Cortes histológicos desta região mostraram que estes esporocistos apresentavam formato oval, contendo em seu interior inúmeras bolas germinativas (Fig. 4).

Aos 25 dias de infecção, foram observados esporocistos de primeira geração contendo em seu interior bolas germinativas, em vários estágios de desenvolvimento, espalhados pelo tecido peri-intestinal e ao redor da glândula digestiva (Fig. 5).

Esporocistos de segunda geração jovens foram vistos migrando no sentido das primeiras voltas da massa visceral do molusco, através do espaço hemolinfático, localizado próximo ao intestino do molusco. Este estágio do desenvolvimento foi observado aos 53 dias pós-infecção (Fig. 6).

Pode-se observar esporocistos de segunda geração em vários estágios de desenvolvimento, ao redor da glândula digestiva, aos 60 dias pós-infecção (Fig. 7).

Os esporocistos de segunda geração, totalmente desenvolvidos, foram observados nas dissecações realizadas aos 70 dias pós-infecção, migrando entre os órgãos internos do molusco, pelos espaços hemolinfáticos, no sentido da volta corporal do molusco (Fig. 8).

Os esporocistos de segunda geração emergiram sempre durante a noite, através do pneumóstoma. A Figura 9, mostra um corte histológico, após 79 dias de infecção, onde pode ser visto um esporocisto de segunda geração, contendo cercárias totalmente desenvolvidas, no pneumóstoma. Este achado se constitui no primeiro registro histológico de esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* no pneumóstoma de *B. similis*.



Figura 1 - Corte histológico da região anterior do trato digestivo de *Bradybaena similis* infectada experimentalmente, mostrando um ovo de *Eurytrema coelomaticum*, aos 15 minutos após o contato inicial com os ovos. Coloração: HE. O - ovo de *E. coelomaticum*; RA - resíduo alimentar. Aumento: 1750x.

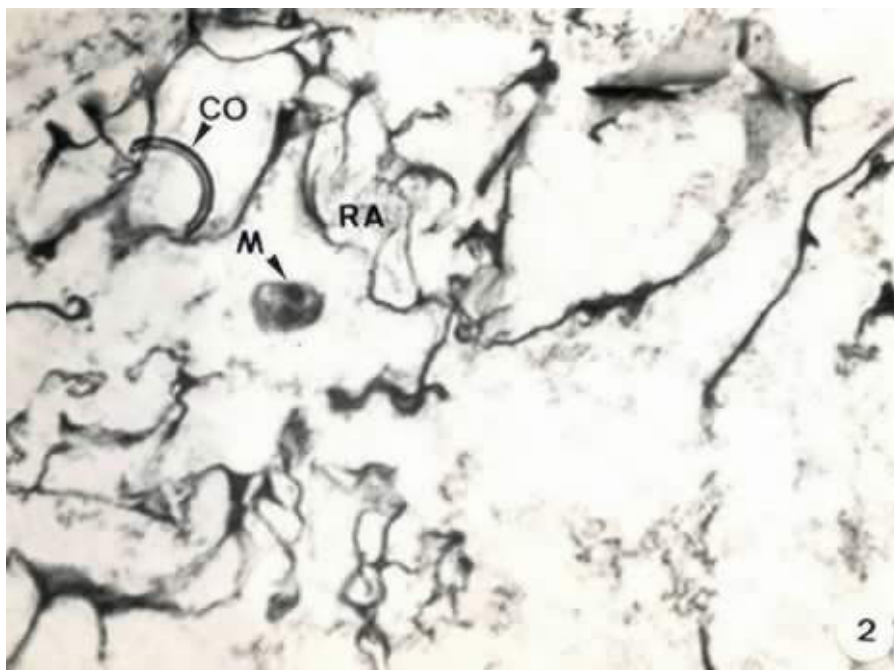


Figura 2 - Corte histológico da região anterior do trato digestivo de *B. similis* infectada experimentalmente) mostrando um miracídio de *E. coelomaticum* livre no lúmen do trato digestivo do molusco) uma hora após o contato inicial com os ovos. Coloração: HE. M - miracídio de *E. coelomaticum*; CO - casca do ovo e RA - resíduo alimentar. Aumento: 1750x.



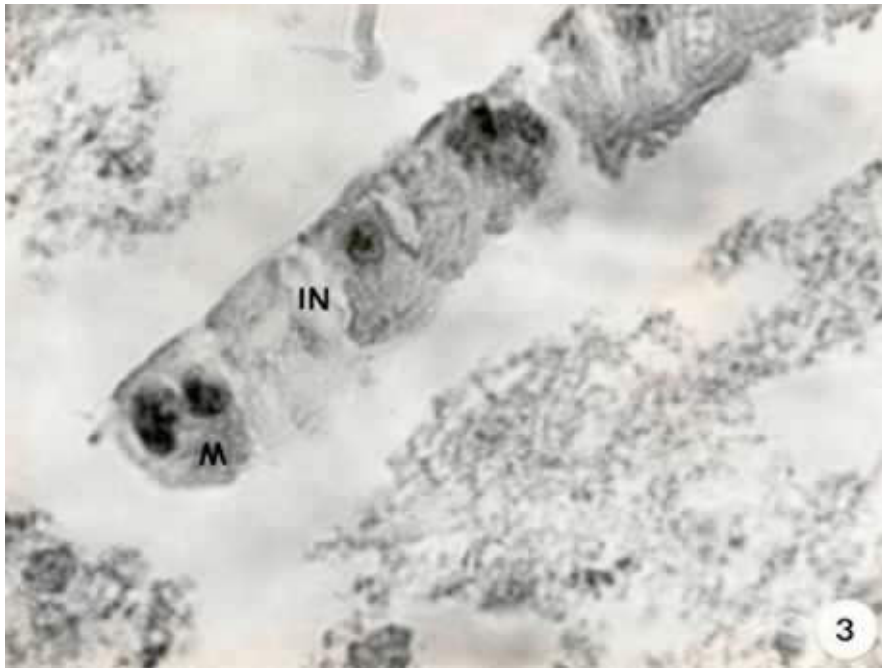


Figura 3 - Corte histológico, mostrando um miracídio de *E. coelomaticum* dentro de uma célula da parede do trato digestivo de *B. similis*, duas horas após o contato inicial com os ovos. Coloração: HE. M - miracídio de *E. coelomaticum* e IN - intestino. Aumento: 1750x.

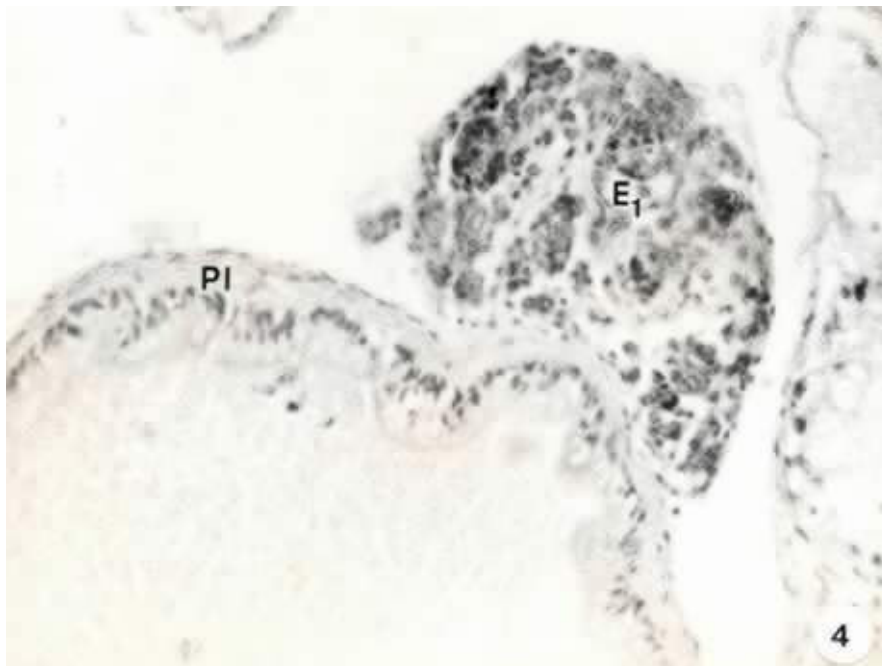


Figura 4 - Corte histológico mostrando, um esporocisto de primeira geração de *E. coelomaticum* fixado na serosa da parede do intestino de *B. similis*, aos 10 dias após a infecção. Coloração: HE. E1 - esporocisto de 1ª geração; PI - parede do intestino. Aumento: 875x.

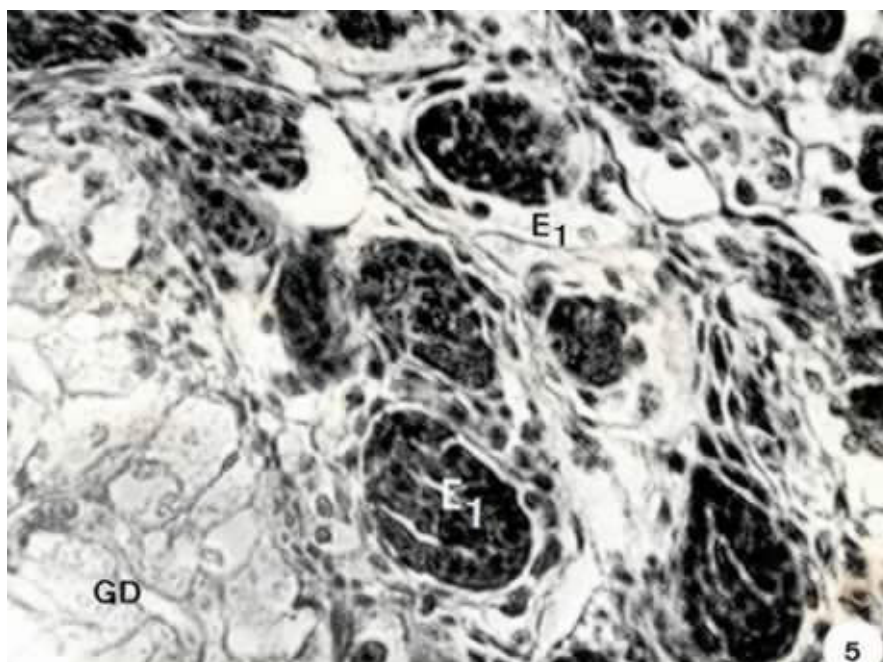


Figura 5 - Corte histológico, mostrando vários esporocistos de primeira geração de *E. coelomaticum*, em diferentes estágios de desenvolvimento, espalhados pelo tecido peri-intestinal e ao redor da glândula digestiva de *B. similaris*, aos 25 dias pós-infecção. Coloração: HE. E1 - esporocisto de 1ª geração e GD - glândula digestiva. Aumento: 875x.

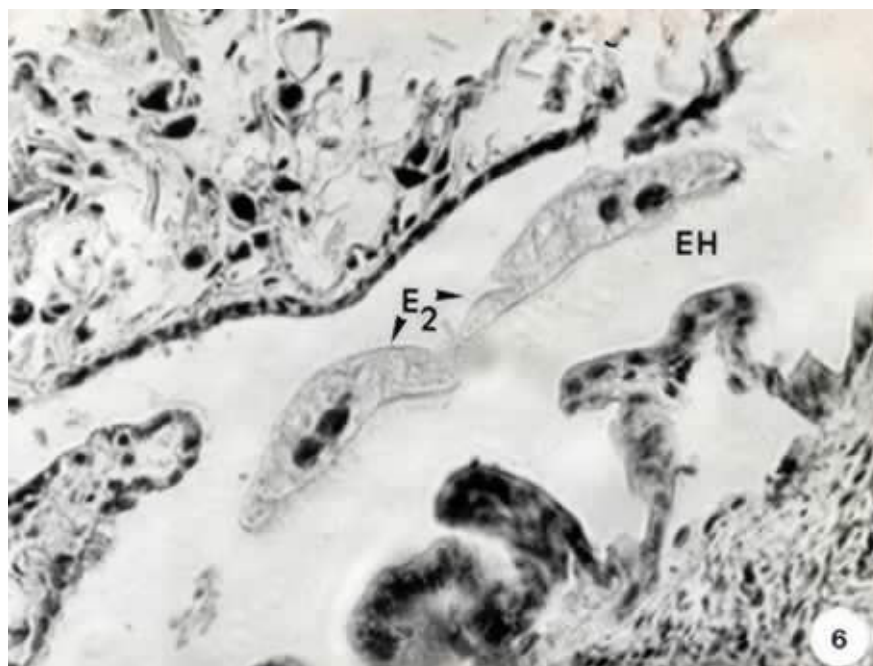


Figura 6 - Corte histológico, mostrando esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* jovens, migrando pelo espaço hemolinfático, localizado próximo ao intestino de *B. similaris*, aos 53 dias pós-infecção, Coloração: HE. E2 - esporocisto de 2ª geração e EH - espaço hemolinfático. Aumento: 1750x.

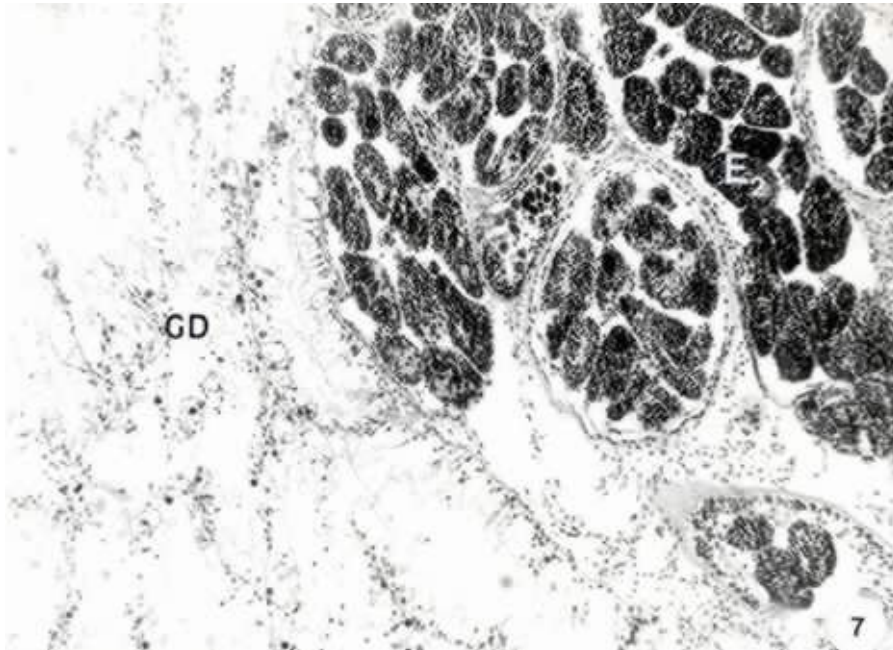


Figura 7 - Corte histológico, mostrando vários esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum*, em diferentes estágios de desenvolvimento, ao redor da glândula digestiva de *B. similis*, aos 60 dias pós-infecção. Coloração: HE. E2 - esporocisto de 2ª geração e GD - glândula digestiva do molusco. Aumento: 875x.

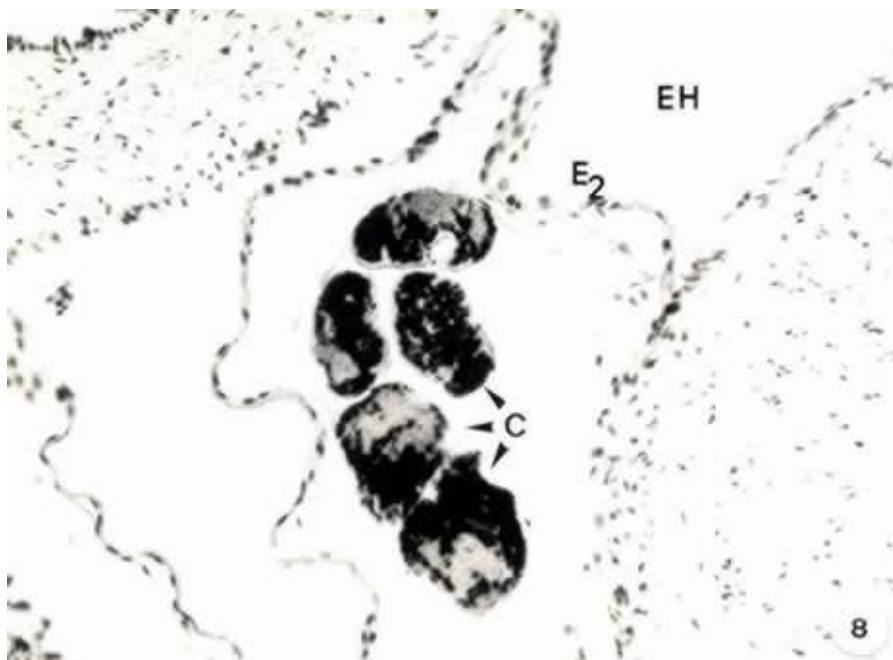


Figura 8 - Corte histológico, mostrando um esporocisto de segunda geração de *E. coelomaticum* totalmente desenvolvido, migrando entre os órgãos internos de *B. similis*, aos 70 dias pós-infecção. Coloração: HE. E2 - esporocisto de 2ª geração; C - cercária e EH - espaço hemolinfático. Aumento: 1750x.

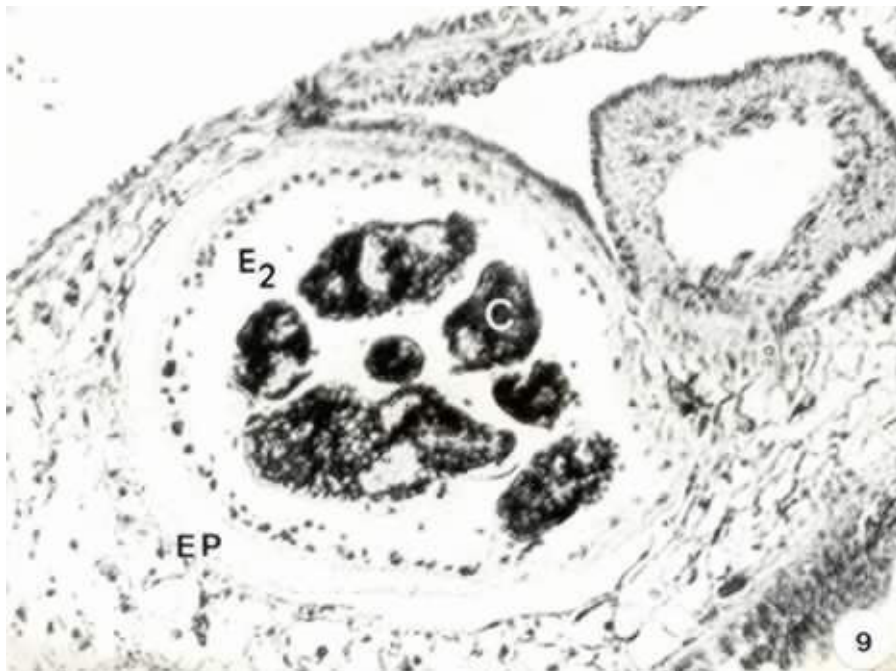


Figura 9 - Corte histológico, mostrando uma região do pneumóstoma de *B. similis*, contendo um esporocisto de segunda geração de *E. coelomaticum*, pronto para ser expelido, aos 79 dias pós-infecção. Coloração: HE. E2 - esporocisto de 2ª geração; C - cercária e EP - epitélio do pneumóstoma. Aumento: 875x.

**5. Influência do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum* sobre o armazenamento de glicogênio e cálcio na glândula digestiva de *Bradybaena similaris*.**

**5.1. Glicogênio nas células da glândula digestiva de *B. similaris*.**

O método do Carmim de Best, para glicogênio, mostrou uma reação positiva para as cercárias e menos intensa para o endocisto e saco membranoso, nos esporocistos de segunda geração em desenvolvimento localizados na glândula digestiva dos moluscos infectados, que apresentaram-se corados em vermelho, porém, o restante do tecido da glândula digestiva, reagiu negativamente ao Carmim de Best. A glândula digestiva dos moluscos não-infectados, mostrou uma reação positiva ao Carmim de Best.

**5.2. Deposição de cálcio nas células da glândula digestiva de *B. similaris*.**

Os métodos, de Dahl e de von Kossa, utilizados para avaliar a quantidade de cálcio presente nas células da glândula digestiva de moluscos infectados e não-infectados, demonstraram um maior acúmulo de cálcio na glândula digestiva

dos moluscos infectados. Sendo que, o método de Dahl, apresentou resultados mais intensos, do que o método de von Kossa, tanto para moluscos infectados como para aqueles não-infectados.

**6. Alterações observadas no ovotestis de *Bradybaena similaris*, como resultado do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum*.**

Alterações celulares foram observadas na gônada de *B. similaris*, embora nenhum esporocisto de segunda geração de *E. coelomaticum* tenha sido encontrado no ovotestis. Os folículos do ovotestis se apresentaram em estágio degenerativo. A destruição dos tecidos gonadais foi evidenciada, ao compararem-se cortes histológicos de moluscos infectados (Fig. 10) e daqueles não-infectados (Fig. 11). Embora evidenciada, a espermatogênese em moluscos infectados, apresentou-se bastante reduzida. O mesmo, foi observado com relação à ovulogênese, com a produção de ovócitos anormais.

Os moluscos infectados, pertencentes à classe de tamanho A, foram os únicos que realizaram posturas. Entretanto, as posturas apresentaram pequeno número de ovos, sem eclosão aparente de nenhum deles.



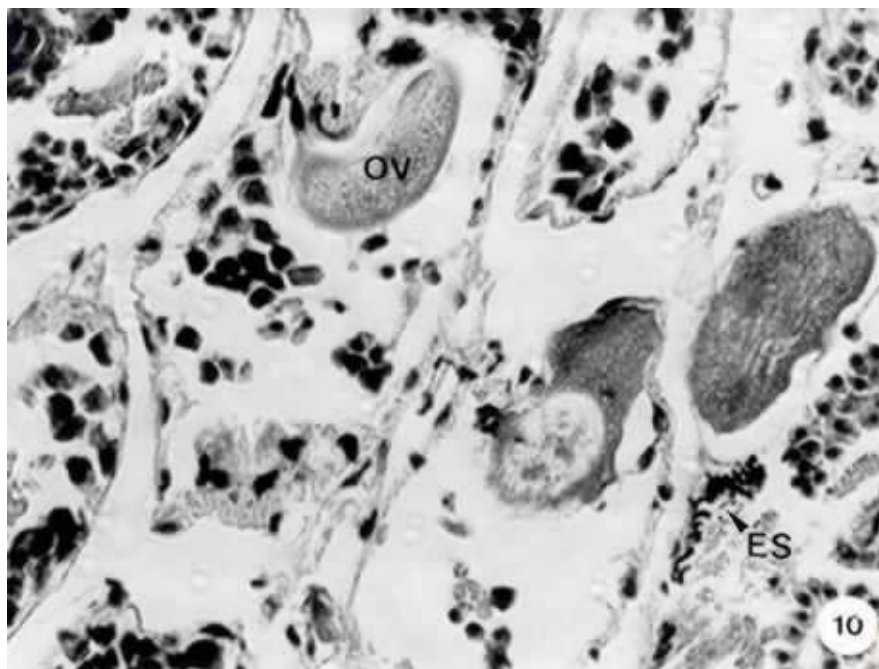


Figura 10 - Corte histológico de uma região do ovotestis de *B. similis* infectada experimentalmente com *E. coelomaticum*, mostrando o estado degenerativo do tecido gonadal. Coloração: HE. OV - ovócito degenerado e ES - espermatozóide degenerado. Aumento: 1750x.

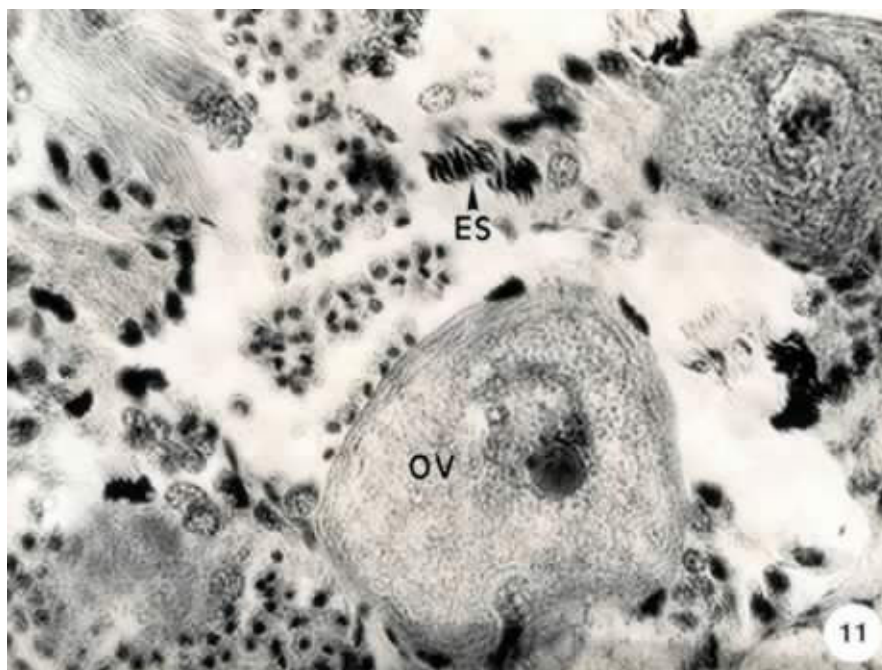


Figura 11 - Corte histológico de uma região do ovotestis de *B. similis* não-infectada, mostrando o estado perfeito da gônada. Coloração: HE. OV - ovócito e ES - espermatozóide. Aumento: 1750x.

## **7. Determinação do ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum*.**

Os esporocistos de segunda geração eliminados pelos moluscos, foram encontrados em grupos ou, isoladamente no caso de somente um esporocisto ter sido eliminado, depositados nas tampas das placas de petri. Esses esporocistos, apresentavam-se envolvidos por uma substância mucilaginosa.

A eliminação ocorreu sempre durante a noite. Embora as placas de petri contendo os moluscos experimentalmente infectados, tenham sido observadas diariamente, no início da manhã e ao final da tarde, apenas nas observações feitas pela manhã foram encontrados os esporocistos.

Não houve constância do intervalo entre uma eliminação e outra, porém as eliminações, em sua maioria, ocorreram em intervalos de 1 a 3 dias.

O período de eliminação de esporocistos foi diferente para as duas épocas de infecção dos moluscos. Para os moluscos infectados em novembro/1989 o período de eliminação foi de 3 semanas e para os moluscos infectados em março/1990 foi de 12 semanas. O número máximo de esporocistos eliminados por molusco foi de 51, enquanto que o número mínimo foi de 24 para os moluscos infectados em novembro/1989. Para os moluscos infectados em março/1990 esses números foram 16 e 1, respectivamente.

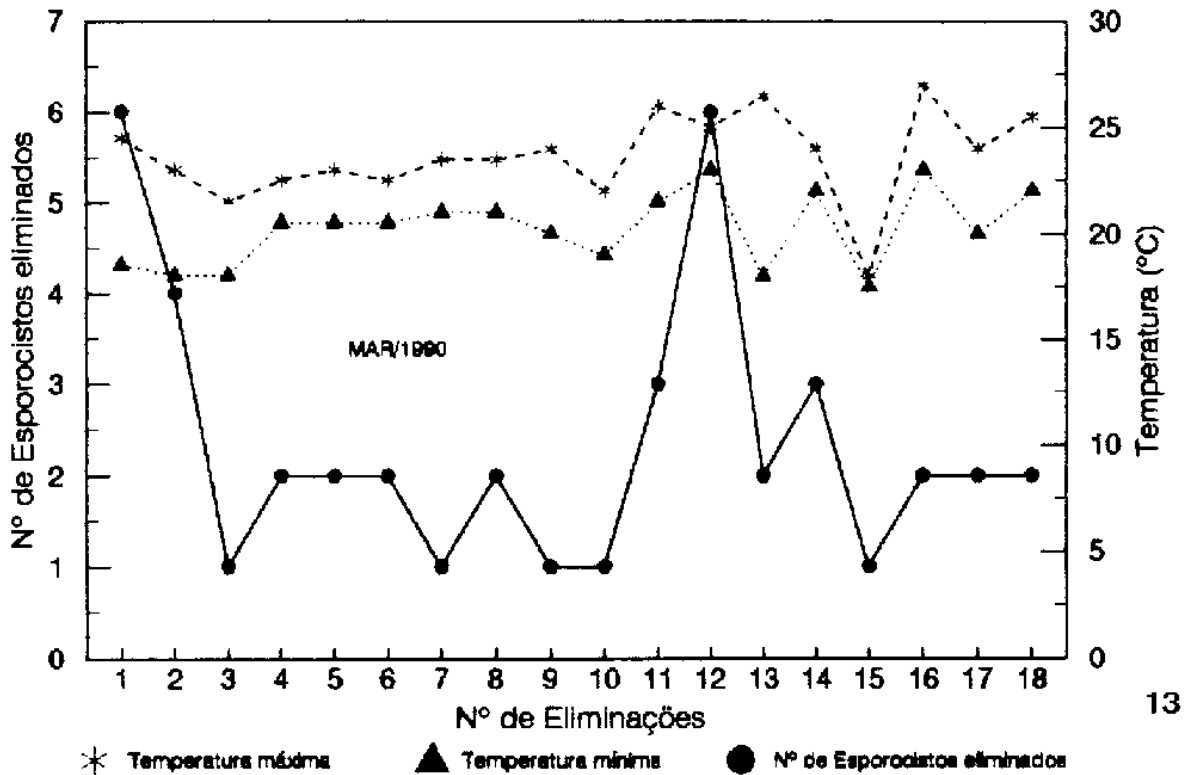
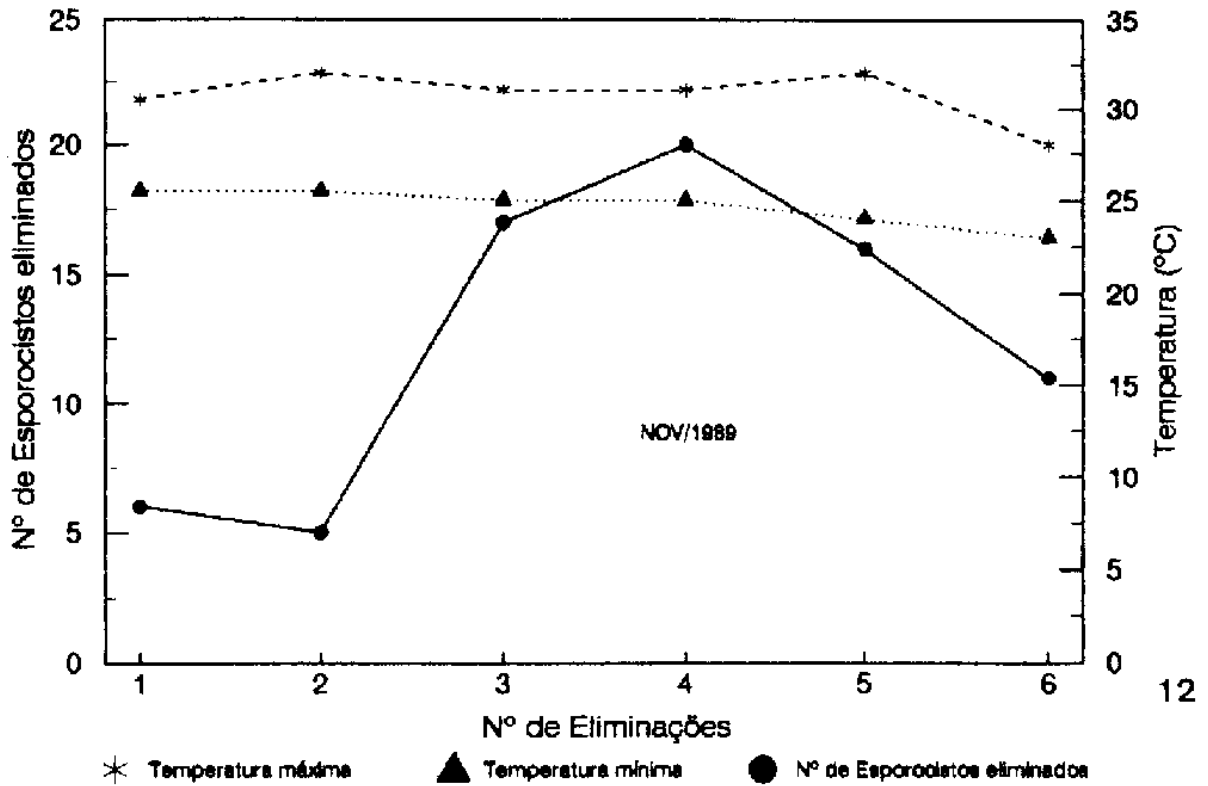


As figuras 12 e 13, mostram a eliminação de esporocistos por moluscos infectados experimentalmente em novembro/1989 e março/1990, respectivamente, representadas por um espécime de molusco escolhido ao acaso, para cada época de infecção.

O ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração foi relacionado às temperaturas (máxima e mínima) registradas durante o período de eliminação. A análise estatística pelo teste de Regressão Linear Simples, mostrou que houve uma correlação positiva entre a temperatura máxima e o número de esporocistos eliminados, nas duas épocas de infecção estudadas. Sendo que esta correlação foi mais evidente com os moluscos infectados experimentalmente em novembro/1989.

Figura 12. Ritmo de eliminação dos esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* por um espécime de *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente em novembro/1989, relacionado com a temperatura do interior do laboratório. N° de esporocistos eliminados -●-; temperatura máxima -◆- e temperatura mínima --▲--.

Figura 13. Ritmo de eliminação dos esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* por um espécime de *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente em março/1990, relacionado com a temperatura do interior do Laboratório. N° de esporocistos eliminados -●-; temperatura máxima -◆- e temperatura mínima --▲--.



8. Influência do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum* sobre o consumo de oxigênio por *Bradybaena similaris*.

Os resultados das observações sobre o consumo médio de oxigênio por moluscos infectados e não-infectados, durante o desenvolvimento dos estágios larvais de *E. coelomaticum* em *B. similaris*, nas duas épocas de infecção estudadas, estão nas Tabelas IX e X, respectivamente.

O consumo médio de oxigênio aferido na primeira semana pós-infecção, para as duas épocas de infecção, foi igual para moluscos infectados e não-infectados, havendo uma variação durante os períodos de infecção subsequentes. Foi possível verificar que na maioria das vezes os moluscos não-infectados consumiram mais oxigênio do que os moluscos infectados (Figs. 14 e 15).

Tabela IX. Consumo médio de oxigênio por *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente com *Eurytrema coelomaticum* em novembro/1989 e por moluscos não-infectados.

Tempo de infecção (semanas)	Consumo de oxigênio ( $\mu\text{g}$ de $\text{O}_2$ /molusco)	
	Infectados	Não-infectados
1	0,02603	0,02603
2	0,07816	0,09378
3	0,01562	0,19420
4	0,02344	0,04688
5	0,01562	0,04688
6	0,07816	0,06252
7	0,01562	0,04688
8	0,01562	0,03126
9	0,01562	0,06252
10	0,06754	0,08175
11	0,01574	0,03657

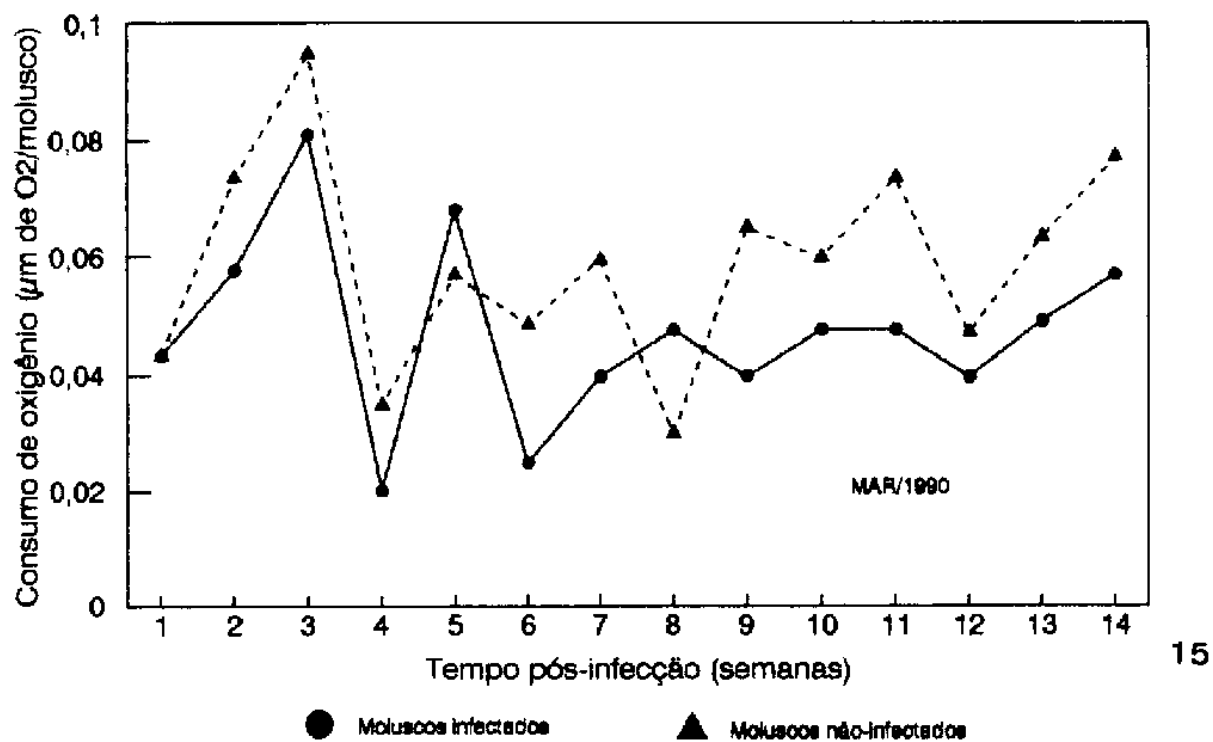
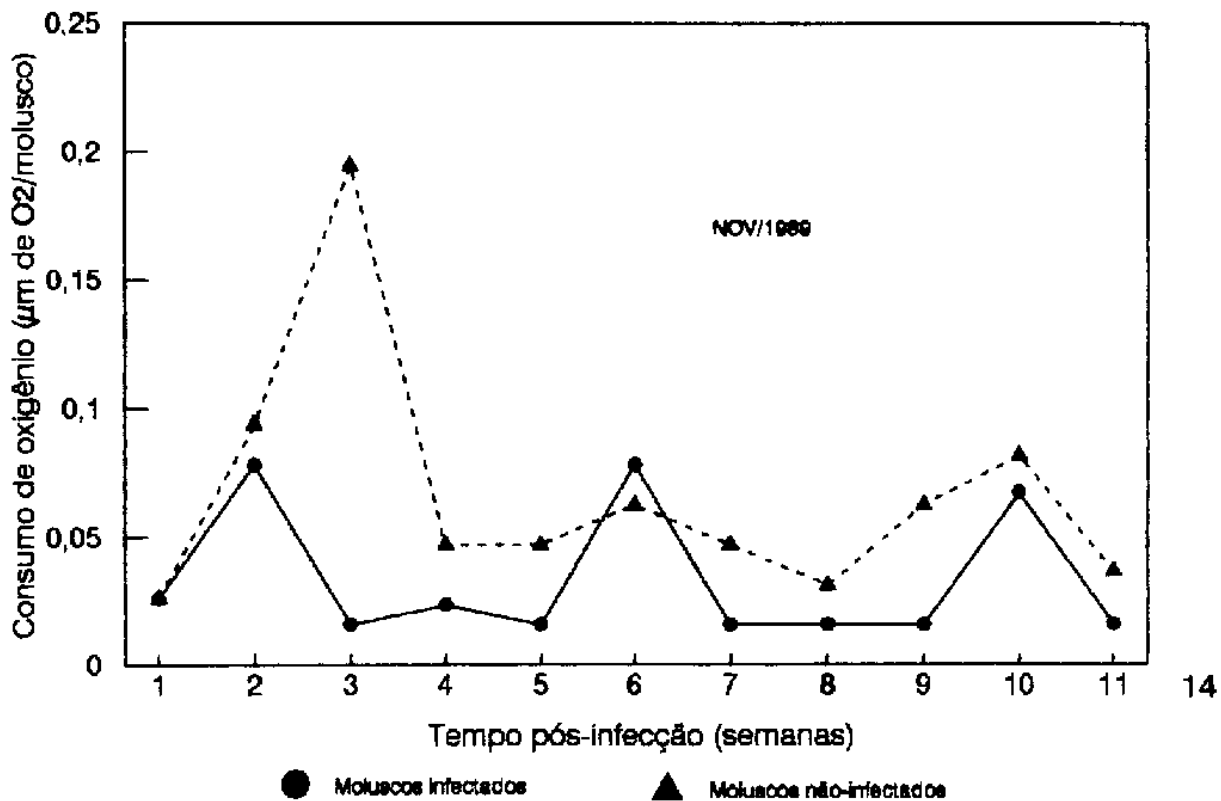
Tabela X. Consumo médio de oxigênio por *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente com *Eurytrema coelomaticum* em março/1990 e por moluscos não-infectados.

Tempo de infecção (semanas)	Consumo de oxigênio ( $\mu\text{g}$ de $\text{O}_2$ /molusco)	
	Infectados	Não-infectados
1	0,04327	0,04327
2	0,05762	0,07342
3	0,08097	0,09478
4	0,02004	0,03475
5	0,06791	0,05679
6	0,02470	0,04851
7	0,03960	0,05947
8	0,04752	0,02975
9	0,03965	0,06496
10	0,04752	0,05978
11	0,04752	0,07346
12	0,03947	0,04694
13	0,04892	0,06328
14	0,05698	0,07695

A análise estatística do consumo de oxigênio por moluscos infectados e não-infectados pelo teste "T" de Student, mostrou que não existe diferença significativa entre o consumo de oxigênio por moluscos infectados e não-infectados, nas duas épocas de infecção estudadas, ao nível de significância de 5%. Entretanto, a análise pelo teste de Regressão Linear Simples, mostrou uma correlação positiva entre o tempo de duração do experimento e o consumo de oxigênio pelos moluscos não-infectados, para a época de infecção março/1990.

Figura 14. Consumo de oxigênio por *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente em novembro/1989 com *Eurytrema coleomaticum* e por moluscos não-infectados. Moluscos infectados -◆- e moluscos não-infectados -▲-.

Figura 15. Consumo de oxigênio por *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente em março/1990 com *Eurytrema coelomaticum* e por moluscos não-infectados. Moluscos infectados -●- e moluscos não-infectados -▲-.





9. Influência do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum* sobre a deposição de cálcio na concha de *Bradybaena similaris*.

Os resultados das determinações da concentração de cálcio nas conchas dos moluscos infectados experimentalmente com *E. coelomaticum* e daqueles não-infectados, pela técnica de volumetria de complexação, constam nas Tabelas XI e XII, respectivamente. Foi possível verificar que a infecção por *E. coelomaticum* provoca uma interferência sobre o metabolismo de calejo de *B. similaris*. Uma vez que os resultados obtidos para o grupo de moluscos infectados, antes mesmo da análise estatística, mostraram uma tendência a uma relação negativa entre peso das conchas e concentração de cálcio nas conchas dos moluscos infectados.

Tabela XI. Concentração de cálcio nas conchas de *Bradybaena similis* infectada experimentalmente com *Eurytrema coelomaticum*, em função do tamanho e peso das conchas.

Identificação do molusco	Tamanho da concha (mm)	Peso da concha (mg)	Concentração de cálcio (ppm)
SVP-523	11,04	4,1	47,16
SVP-524	10,04	31,8	47,79
SVP-525	10,04	34,2	60,23
SVP-526	7,03	9,6	72,91
SVP-527	9,00	32,1	21,62
SVP-528	10,04	22,7	44,93
SVP-535	10,03	8,4	78,57
SVP-537	11,04	62,9	35,60
SVP-538	11,04	39,4	38,57
SVP-539	12,05	45,7	48,14
SVP-540	11,04	59,7	47,90
SVP-541	10,04	50,6	41,50
SVP-542	11,05	56,5	39,64
SVP-543	11,04	58,5	50,94
SVP-544	9,03	43,7	51,71
SVP-545	10,04	58,8	28,91
SVP-546	9,04	43,4	43,77
SVP-548	7,70	21,6	55,09
SVP-549	8,50	23,9	33,47
SVP-550	7,60	22,2	36,94
SVP-551	6,07	20,2	50,49
SVP-552	9,14	37,1	46,36
SVP-556	10,03	33,7	58,75
SVP-p81*	10,60	89,2	39,24
SVP-po5	13,70	239,6	47,25
SVP-po6	12,30	155,1	39,58
SVP-po6'	11,50	136,6	36,88
SVP-p10	10,70	99,0	33,13

Tabela XII. Concentração de cálcio nas conchas de *Bradybaena similis* não-infectada, em função do tamanho e peso das conchas.

Identificação do molusco	Tamanho da concha (mm)	Peso da concha (mg)	Concentração de cálcio (ppm)
SVP-1	10,50	96,6	52,25
SVP-2	13,25	123,3	49,15
SVP-3	13,90	175,0	47,30
SVP-4	13,00	189,7	53,45
SVP-6	12,35	156,0	39,60
SVP-7	12,09	154,9	42,67
SVP-8	12,45	167,1	44,88
SVP-9	11,95	134,1	54,31
SVP-10	13,55	178,0	45,10
SVP-11	13,00	147,4	41,09
SVP-12	13,20	209,0	47,04
SVP-13	13,00	151,2	50,53
SVP-14	13,00	170,0	54,58
SVP-16	14,15	294,5	60,40
SVP-17	10,75	93,7	50,53
SVP-18	10,95	185,9	28,73
SVP-19	13,50	196,9	49,68
SVP-20	11,55	154,7	34,80
SVP-21	11,35	185,2	24,30
SVP-22	11,95	175,4	43,58
SVP-23	11,00	147,5	31,05
SVP-24	11,05	161,1	32,15
SVP-25	11,50	135,7	51,72
SVP-26	10,75	95,1	46,39
SVP-27	11,80	111,4	50,10

Os resultados obtidos nas determinações da concentração de cálcio nas conchas dos moluscos infectados e não-infectados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Regressão Linear Simples. Ficando demonstrado que existe uma correlação positiva entre o tamanho e o peso das conchas, tanto para os moluscos infectados como para aqueles não-infectados, e quando se correlacionou o peso das conchas com

a concentração de cálcio, os moluscos infectados apresentaram uma correlação negativa enquanto que aqueles não-infectados apresentaram uma correlação positiva (Figs. 16-19).

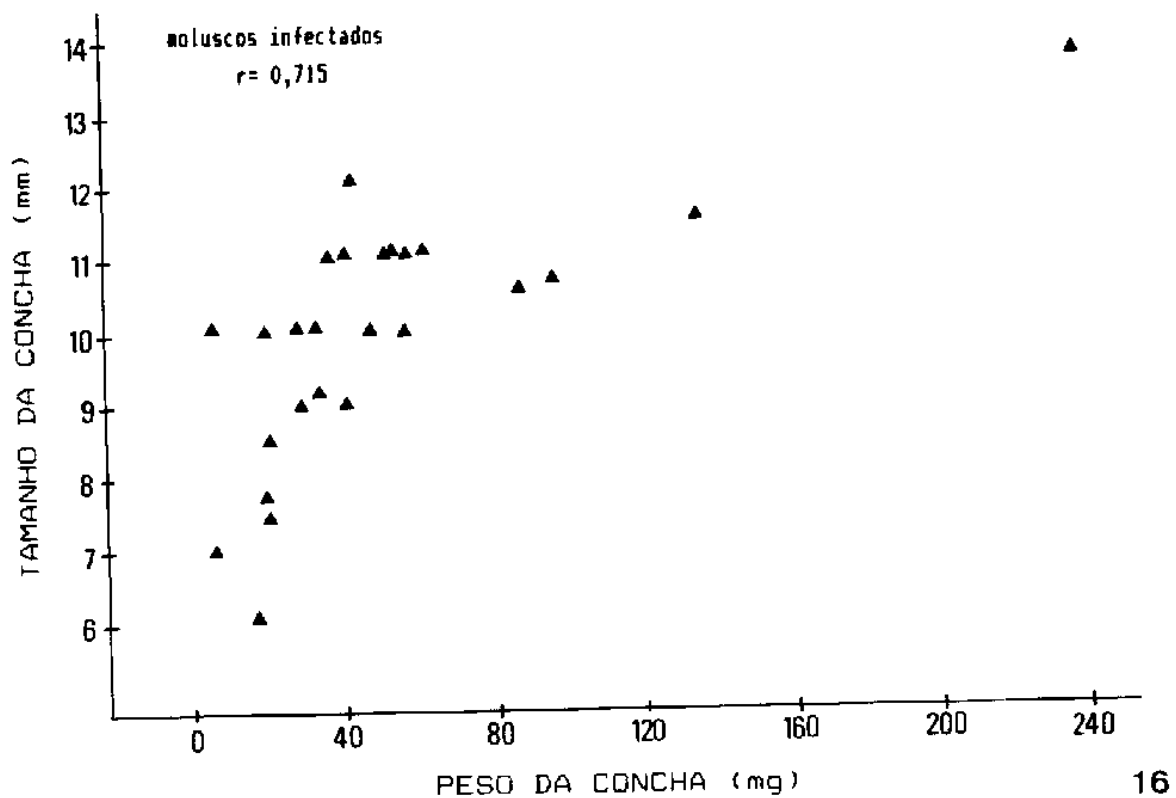


Figura 16. Relação entre tamanho e peso da concha de *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente com *Eurytrema coelomaticum*.

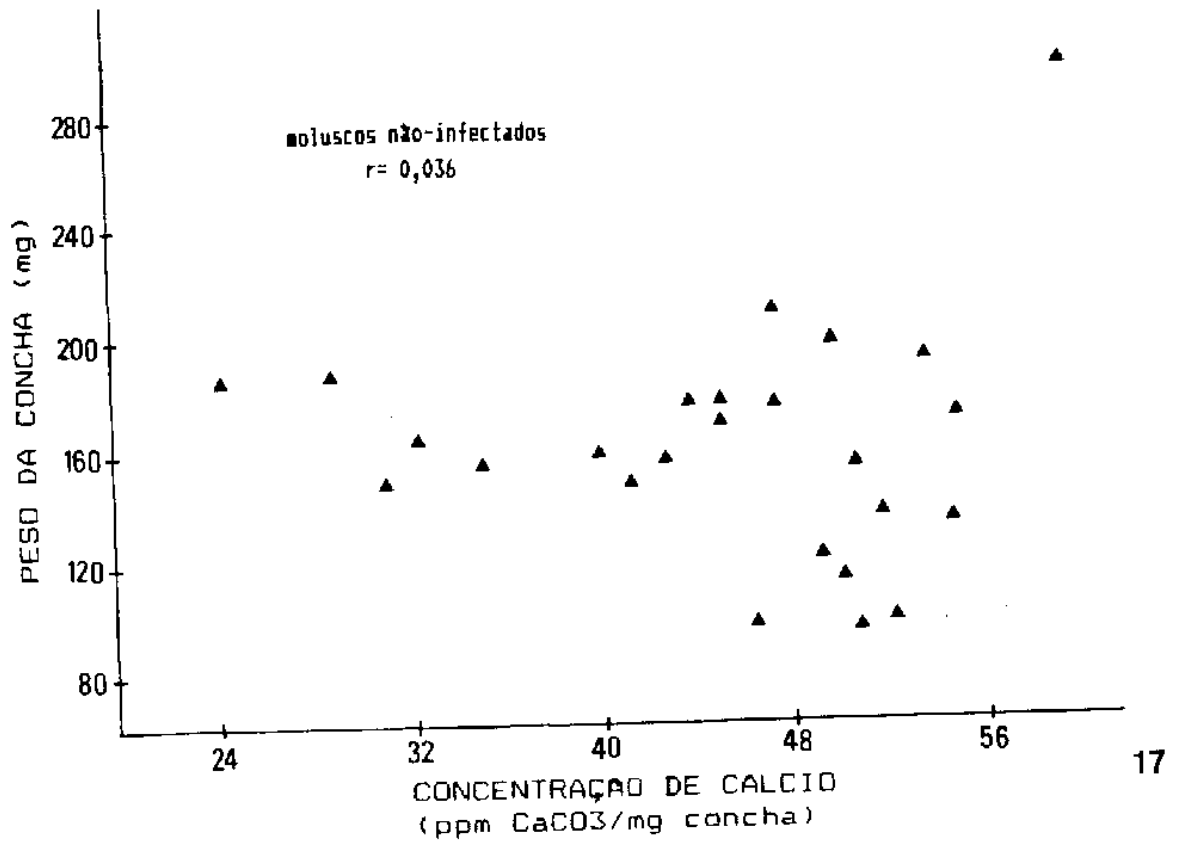


Figura 17. Relação entre peso da concha e concentração de cálcio na concha de *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente com *Eurytema coelomaticum*.

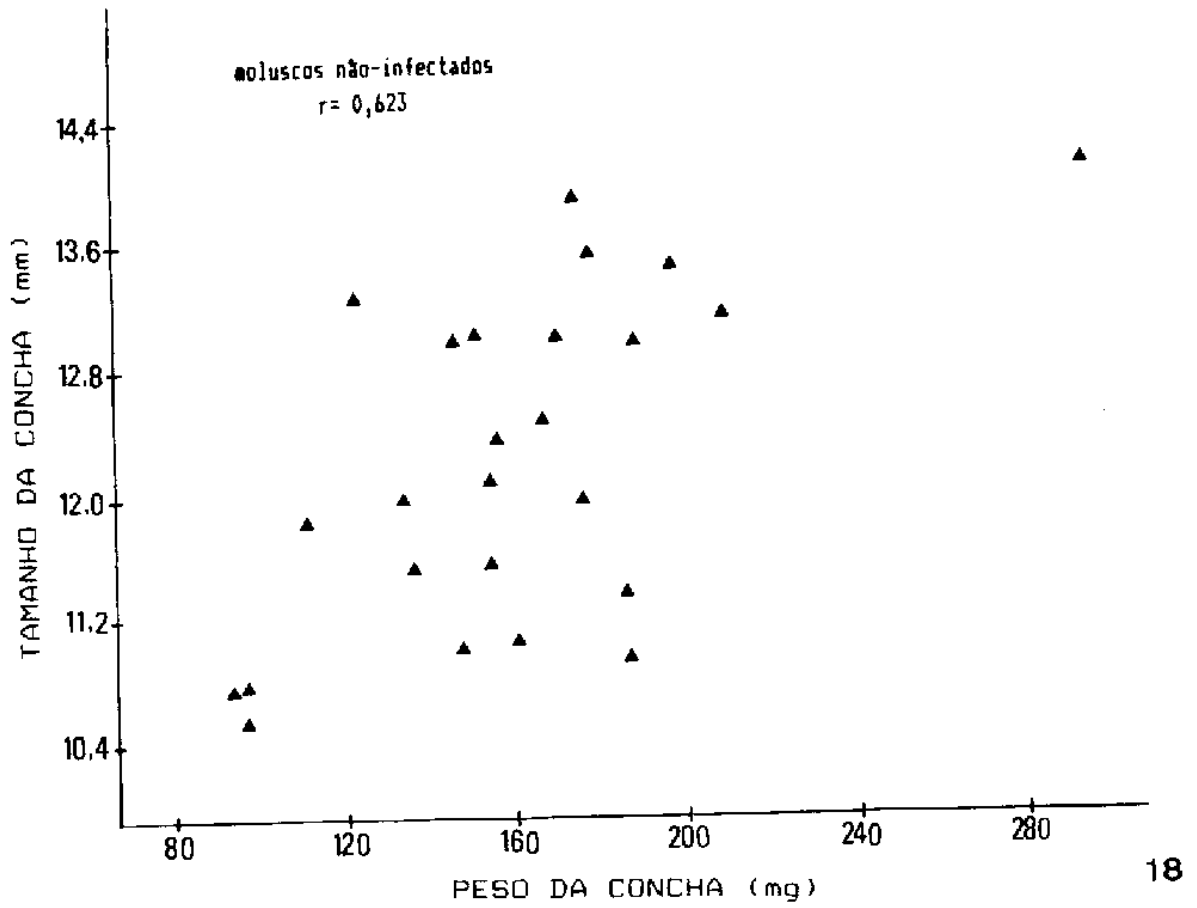


Figura 18. Relação entre tamanho e peso da concha de *Bradybaena similaris* não-infectada.

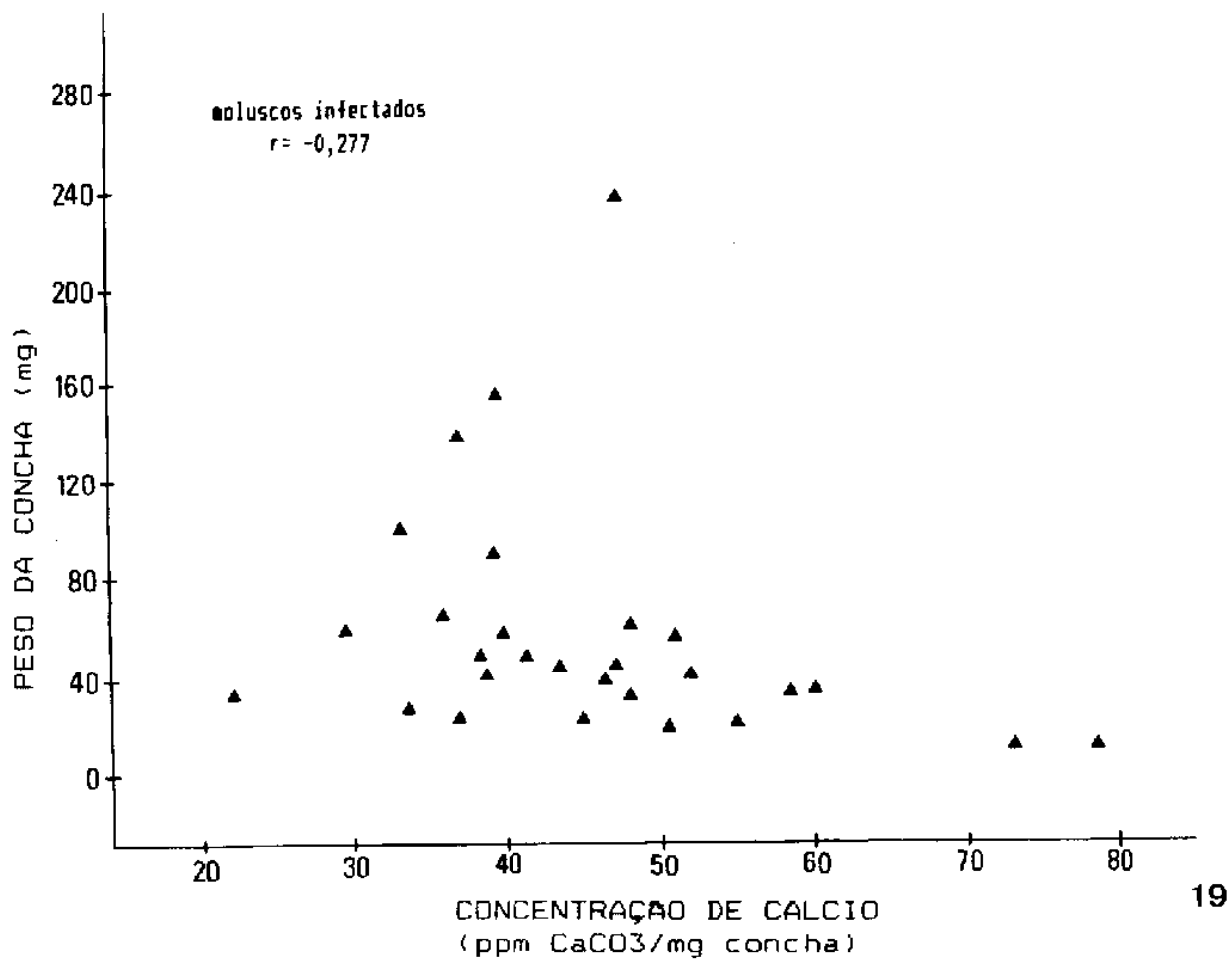


Figura 19. Relação entre peso da concha e concentração de cálcio na concha de *Bradybaena similaris* não-infectada.



## 10. Morfologia e composição química do esporocisto expelido de *Eurytrema coelomaticum*.

A morfologia e a composição de mucopolissacarídeos do esporocisto expelido de *E. coelomaticum* foram estudadas através de métodos histológicos e histoquímicos, com esporocistos expelidos espontaneamente, por moluscos experimentalmente infectados em novembro/1989.

O esporocisto de segunda geração em desenvolvimento apresenta forma alongada, durante o processo de migração no sentido da volta corporal do molusco, vai tornando-se arredondado, até ser expelido pela abertura respiratória do molusco. O esporocisto expelido apresenta uma região anterior formada por um processo longo e uma região posterior sacular, onde estão incluídas as cercárias.

No esporocisto em desenvolvimento, os dois envelopes, endocisto e saco membranoso, inicialmente coalescidos formando uma parede única, começam a se separar no esporocisto totalmente desenvolvido, em processo de migração em direção à abertura respiratória do molusco, para ser expelido (Fig. 20).

Os esporocistos são quase transparentes logo que são expelidos e, vão progressivamente, adquirindo uma aparência opaca. O endocisto forma um tubo estreito maior do que a cavidade do saco membranoso e pode ser observado contorcido

em seu interior, contendo as cercárias. Quando retirado do interior do esporocisto, o endocisto é quase três vezes o tamanho da cavidade do saco membranoso (Fig. 21).

A estrutura celular do saco membranoso e do endocisto, mostrou-se desintegrada no esporocisto expelido. Os núcleos, na maioria das vezes, apresentaram-se degenerados (Fig. 22).

Glicoconjugados ácidos foram detectados pelo Alcian Blue em pH 2,5, nas cercárias e no endocisto do esporocisto em desenvolvimento. No esporocisto expelido, foi possível observar uma reação positiva ao Alcian Blue, ao redor das cercárias, no endocisto e saco membranoso.

Nas reações para detecção de glicoconjugados neutros, as cercárias mostraram-se PAS-positivo no esporocisto em desenvolvimento. Entretanto, no esporocisto expelido uma reação positiva ao PAS, foi observada apenas ao redor das cercárias.

O método do Alcian Blue/PAS mostrou uma reação positiva ao Alcian Blue para no endocisto do esporocisto em desenvolvimento, e ao redor das cercárias, no endocisto e saco membranoso do esporocisto expelido, que apresentaram-se corados em azul. Uma reação positiva ao PAS, foi observada ao redor das cercárias do esporocisto em desenvolvimento e no endocisto do esporocisto expelido, que apresentaram-se corados em magenta.

O teste utilizado para a detecção do glicogênio,

Carmim de Best, mostrou um resultado fortemente positivo nas cercárias e menos intenso para o endocisto e saco membranoso do esporocisto em desenvolvimento, que apresentaram-se corados em vermelho. O esporocisto expelido desenvolveu uma reação positiva somente ao redor das cercárias.

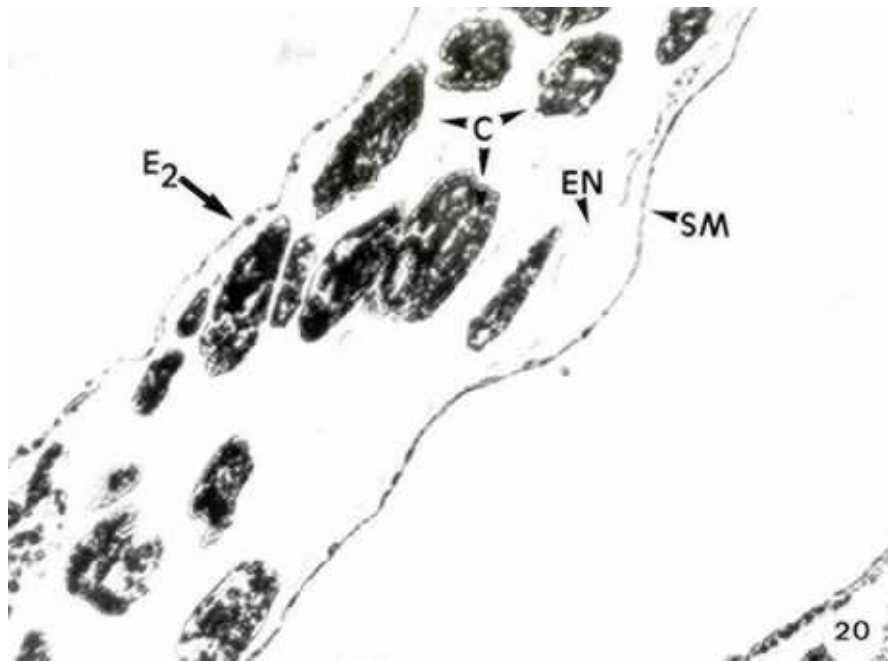


Figura 20 - Corte histológico, mostrando o início da separação entre o endocisto e o saco membranoso, no esporocisto de segunda geração de *E. coelomaticum* em final de desenvolvimento. Coloração: HE. E2 - esporocisto de 2ª geração; EN - endocisto; SM - saco membranoso e C - cer-

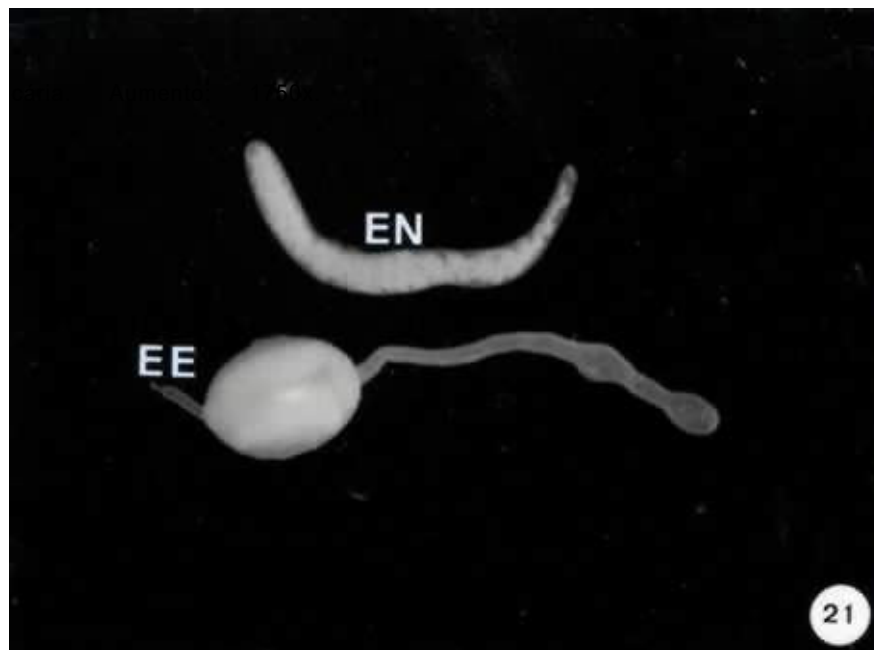


Figura 21 - Relação de tamanho entre o esporocisto expelido e o endocisto de *E. coelomaticum*. Endocisto envolvendo as cercárias e EE - esporocisto expelido. Aumento: 1750x.

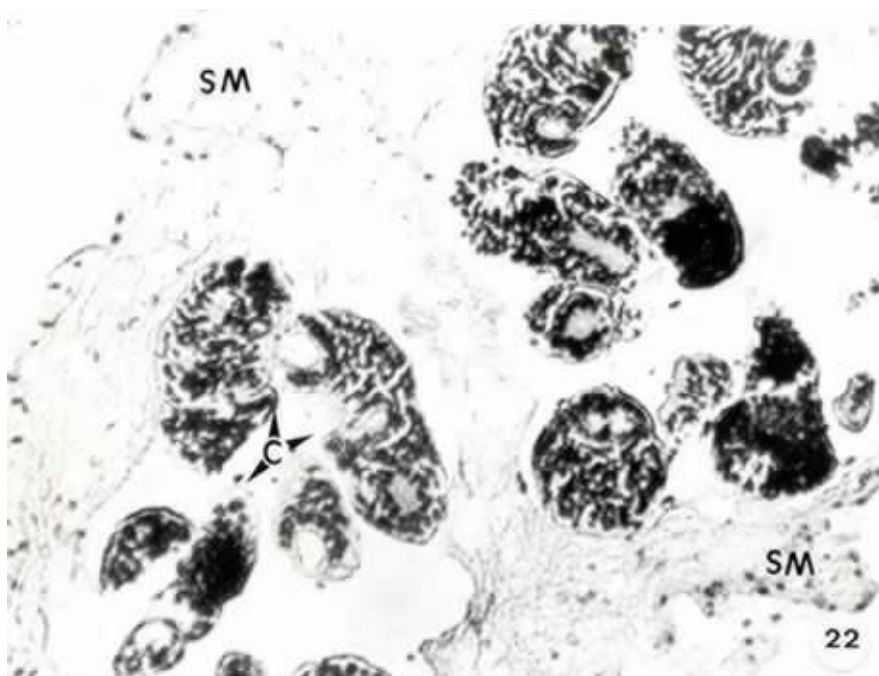


Figura 22 - Corte histológico do esporocisto expelido de *E. coelomaticum*, mostrando o aspecto degenerativo da estrutura celular da parede do esporocisto. Coloração: HE. SH - saco membranoso e C - cercária. Aumento: 1750x.

## DISCUSSÃO

### 1. Efeito de algumas soluções salinas fisiológicas na eliminação de ovos por *Eurytrema coelomaticum*.

A solução salina de Locke apresenta em sua composição 8,5 g de cloreto de sódio, mesma concentração da solução salina fisiológica usada para animais homeotérmicos e seus parasitos. Embora a solução salina fisiológica a 0,85%, apresente a mesma concentração, não dispõe dos demais compostos químicos encontrados na solução salina de Locke. A solução salina de Earle, difere da solução salina de Locke, com relação à concentração de cloreto de sódio, apresentando 6,8 g, ao invés dos 8,5 g. Esta concentração, aproxima-se mais da solução salina fisiológica utilizada para poecilotérmicos, invertebrados e seus parasitos, e ainda, apresenta fosfato de sódio e sulfato de magnésio, que não entram na formulação da solução salina de Locke.

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram que a diferença na concentração de cloreto de sódio existente entre as soluções salinas utilizadas, não foi tão crítica. Uma vez que, em todas as soluções testadas, houve eliminação de ovos. Todavia, na solução salina de Locke onde a concentração de cloreto de sódio era a indicada em soluções salinas fisiológicas para homeotérmicos e seus parasitos, a eliminação foi maior. Quando comparamos os resultados obtidos com solução salina de Locke e com a solução salina fisiológica a 0,85%, pode-se observar que, embora ambas apresentem a mesma concentração de cloreto de sódio, a composição mais enriquecida da solução salina de Locke, possibilitou uma maior eliminação de ovos pelos helmintos.

Entre a eliminação de ovos realizada na solução salina de Earle e na solução salina fisiológica a 0,85%, estatisticamente, não houve diferença significativa. Isto demonstra que houve um certo equilíbrio entre a menor concentração de cloreto de sódio apresentada pela solução salina de Earle e a falta dos demais compostos químicos apresentada pela solução salina fisiológica a 0,85%.

## **2. Infecção experimental de *Bradybaena similaris* com ovos embrionados de *Eurytrema coelomaticum*.**

Em seu trabalho realizado com *F. hepatica*, KENDALL

(1964) observou que com o hospedeiro adequado, indivíduos de todas as idades e tamanhos variados eram susceptíveis à infecção. Entretanto, não foi possível chegar à mesma conclusão com *E. coelomaticum*, que no presente estudo desenvolveu-se apenas em moluscos das classes de maior tamanho. Embora as três classes de tamanho estudadas, tenham recebido o mesmo tratamento. Os resultados do presente estudo, encontram apoio em MALEK (1950) in KENDALL (1964), segundo este autor a idade tem pouco ou nenhum efeito sobre a susceptibilidade à infecção, embora tenha observado que espécimes jovens de *Biomphalaria boissyi*, raramente, apresentaram-se infectados com *Schistosoma mansoni*. De acordo com CHENG (1968), moluscos de diferentes idades apresentam níveis diferentes de susceptibilidade a infecções por estágios larvais de trematódeos digenéticos. A maioria dos trabalhos já realizados, se não todos, estão agrupados neste campo de pesquisa, quando a idade do molusco é estimada por seu tamanho, ou ensaios quantitativos de infectividade. Se tal resistência correlacionada com a idade é devida a algum fator humoral inato, ou até mesmo um fator celular, ainda não se sabe.

Os resultados obtidos para a classe B, no presente estudo, aproximam-se daqueles obtidos por MATTOS (1987). Embora, este autor tenha mencionado que utilizou espécimes de *B. similis* com tamanho superior a 5 mm para as infecções experimentais, não mencionou o tamanho dos moluscos que adquiriram a infecção, ficando difícil qualquer comparação



neste sentido.

### **3. Temperatura e duração do desenvolvimento larval de *Eurytrema coelomaticum* em *Bradybaena similaris*.**

A maioria dos autores concorda que a velocidade máxima de desenvolvimento do parasito ocorre dentro da faixa de temperaturas mais elevadas, desde que não ultrapasse a temperatura máxima tolerada pelo molusco (SMYTH, 1966). Dessa forma, na região onde o presente estudo foi desenvolvido, onde a temperatura é, relativamente, alta durante quase todo o ano, foi possível verificar uma aceleração do desenvolvimento de *E. coelomaticum* em *B. similaris*, nas duas épocas de infecção estudadas. Embora a análise estatística realizada tenha demonstrado que existe uma diferença significativa com relação à duração mínima, do desenvolvimento larval de *E. coelomaticum*, nas duas épocas de infecção estudadas, os resultados obtidos no presente estudo ficaram bem abaixo daqueles encontrados na literatura até o momento.

No presente estudo, observou-se que a duração do desenvolvimento de *E. coelomaticum* em *B. similaris* culminando com a primeira eliminação dos esporocistos de segunda geração foi diferente para as duas épocas de infecção estudadas. Entretanto, como a temperatura não diferiu significativamente, de uma época para a outra, conforme demonstrou a análise es-

tatística, a duração mínima do desenvolvimento larval de *E. coelomaticum* observada em novembro/1989, pode ter sido influenciada indiretamente pela extensão do período de luminosidade durante o dia, que é maior no verão, como foi observado por CHINONE *et al.* (1976), que trabalharam sob condições de temperatura controlada.

A duração mínima do desenvolvimento larval intramolusco observada no presente estudo, mostrou-se bem reduzida quando comparada com a maioria dos trabalhos já realizados (TANG, 1950; TANG & TANG, 1977; SAKAMOTO *et al.*, 1980 e MATTOS, 1987). Entretanto, aproxima-se bastante dos resultados obtidos por CHINONE *et al.* (1976). Os resultados obtidos no presente estudo podem ser um reflexo do excelente grau de nutrição dos moluscos, como foi verificado por KENDALL (1964).

#### **4. Rota de migração e emergência dos esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* em *Bradybaena similis*.**

Trabalhos realizados por vários autores, mesmo aqueles que se referem ao estágio cercária, apresentam um consenso de que a migração se faz via sistema circulatório dos moluscos. Embora estes autores tenham se referido ao "sistema sanguíneo" como principal rota de migração dos estágios larvais de trematódeos digenéticos em seus hospedeiros moluscos

(BRUMPT, 1941; KENDALL & McCULLOUGH, 1951; PROBERT & ERASMUS, 1965 e KOZUTSUMI & ITAGAKI, 1989), o sistema circulatório dos moluscos é semi-aberto e, portanto, a hemolinfa circula também, por espaços (lacunas) existentes entre os órgãos internos dos moluscos e não exclusivamente por ductos ou canais, como foi sugerido por estes autores. Dessa forma, a denominação "sistema hemolinfático" é a mais apropriada para designar o sistema circulatório dos moluscos.

No presente estudo, foi observada a eclosão dos ovos de *E. coelomaticum*, liberando os miracídios, no canal alimentar de *B. similaris*. O mesmo foi observado para outros dicrocoeliídeos (KOZUTSUMI & ITAGAKI, 1989). O miracídio atravessou a parede do trato digestivo, fixando-se na superfície externa do intestino, onde evoluiu até esporocisto de primeira geração, o que está de acordo com TANG (1950) e KOZUTSUMI & ITAGAKI (1989) que trabalharam com *E. pancreaticum* e com MATTOS (1987) que trabalhou com *E. coelomaticum*.

TANG (1950) observou esporocistos de primeira geração de *E. pancreaticum* ao redor da glândula digestiva de *B. similaris*, o mesmo não foi observado para essa mesma espécie por KOZUTSUMI & ITAGAKI (1989). Segundo estes autores, os esporocistos de primeira geração estavam presentes somente na parede do trato digestivo, porém, nunca na glândula digestiva. No presente estudo, foram observados vários esporocistos de primeira geração de *E. coelomaticum* espalhados pelo tecido

peri-intestinal e na porção anterior da glândula digestiva de *B. similaris*.

Os esporocistos de primeira geração produzem em seu interior os esporocistos de segunda geração, a partir das bolas germinativas. A localização dos esporocistos de segunda geração dos dicrocoeliídeos é muito variada: colar do manto (DENTON, 1944); veias da parede da cavidade pulmonar (DENTON, 1944); glândula digestiva e glândula de albumina, pneumóstoma e ao longo do intestino (DENTON, 1944; MATTOS, 1987 e KOZUTSUMI & ITAGAKI, 1989). Essa variedade de localização dos esporocistos de segunda geração, sugere que os esporocistos de diferentes espécies de dicrocoeliídeos migram através dos sinus da cavidade hemocelomática (KOZUTSUMI & ITAGAKI, 1989). No presente estudo, os esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum*, foram observados migrando pelos espaços hemolinfáticos, próximos à porção final do intestino dos moluscos. Essa migração foi realizada tanto pelos esporocistos de segunda geração jovens em direção à glândula digestiva, como também pelos esporocistos totalmente desenvolvidos em direção ao pneumóstoma para serem expelidos.

No presente estudo, os esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* emergiram utilizando a abertura respiratória de seu hospedeiro. TANG (1950), SAKAMOTO *et al.* (1980) e MATTOS (1987), também mencionaram que os esporocistos de segunda geração deixavam o molusco hospedeiro, através do pneumóstoma, entretanto, nenhum deles documentou, fotogra-

ficamente o fato, como foi feito no presente estudo.

KOZUTSUMI & ITAGAKI (1989) observaram que esporocistos de segunda geração de *E. pancreaticum* emergiam de seu hospedeiro através de perfuração do manto de ambos os lados do pneumóstoma, porém, nunca pelo orifício respiratório. Entretanto, uma abertura natural do molusco parece ser mais apropriada para a emergência do que rompimento de tecido. Se pensarmos que vários esporocistos com um tamanho considerável estão sendo eliminados periodicamente pelo molusco, a agressão aos tecidos do hospedeiro seria tão grande que poderia levá-lo à morte, comprometendo a continuação do ciclo biológico do parasito.

## **5. Influência do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum* sobre o armazenamento de glicogênio e cálcio na glândula digestiva de *Bradybaena similaris*.**

### **5.1. Glicogênio nas células da glândula digestiva de *B. similaris*.**

A redução na quantidade de glicogênio nas células da glândula digestiva dos moluscos infectados e o simultâneo aparecimento nas cercárias, no interior dos esporocistos de segunda geração, observada no presente estudo, sugerem que a

quebra de glicogênio até glicose está sendo feita, para que os esporocistos possam obter seu material energético diretamente da hemolinfa circulante na glândula digestiva do molusco hospedeiro, através de absorção pela parede do esporocisto, e que a glicose absorvida é reunida em moléculas de glicogênio no esporocisto, conforme CHENG (1963).

De acordo com CHENG (1963) a baixa tensão de oxigênio presente na glândula digestiva dos moluscos, associada ao tamanho, relativamente grande, dos estágios larvais dos trematódeos digenéticos, produzem um ambiente essencialmente anaeróbico. Por esta razão, a presença de glicogênio nestes estágios larvais é significativa, visto que, provavelmente, o metabolismo deste carboidrato seja a fonte primária de energia nestes estágios larvais. No presente estudo, foi verificada uma acentuada interferência no metabolismo do glicogênio dos moluscos infectados, havendo armazenamento de glicogênio além de glicoconjugados nos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum*. De acordo com ISHAK *et al.* (1975), a fase anaeróbica de utilização da glicose é ativada como via alternativa para suprir a demanda de energia dos moluscos infectados. A perda de glicogênio pelas células da glândula digestiva de *B. similis* infectada, pode estar relacionada com a utilização anaeróbica da glicose para a produção de energia, não havendo dessa forma, condições do glicogênio ser armazenado como reserva energética, na glândula digestiva destes moluscos.

## **5.2. Deposição de cálcio nas células da glândula digestiva de *B. similaris*.**

No presente estudo, foi possível observar que o parasitismo por *E. coelomaticum* causa uma interferência no metabolismo de cálcio de *B. similaris*, tendo sido observada uma menor concentração de cálcio nas conchas dos moluscos e uma maior deposição de cálcio na glândula digestiva dos moluscos infectados. O que está de acordo com MALEK & CHENG (1974). A mobilização de cálcio da concha para a glândula digestiva dos moluscos, segundo BURTON (1972) e de WITH & SMINIA (1980) faz parte de um sistema regulador de cálcio no organismo do molusco e é estimulada pelo deficit de cálcio na hemolinfa circulante. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo, podem ser um reflexo da ativação deste sistema, provocada pelo parasitismo.

De acordo com BANCROFT & STEVENS (1977) os dois métodos comumente empregados para a demonstração de cálcio, von Kossa e Dahl, são distintos na maneira como atuam. O método de von Kossa está baseado na redução da prata, o qual na verdade demonstra ânions fosfato e carbonato, mas desde que as formas demonstráveis destes ânions estejam invariavelmente combinadas com o cálcio, este método pode ser utilizado para demonstração de cálcio. O método de Dahl está baseado no fato de que o cálcio forma um complexo de coloração alaranjada com

o corante Alizarina Red "S", outros cátions produzem colorações variadas com este corante. Este método é aplicado, particularmente, quando pequenas quantidades de cálcio estão presentes, ao passo que o método de von Kossa é utilizado quando se quer detectar grandes quantidades de cálcio. O fato do método de Dahl ser mais apropriado para detectar pequenas quantidades de cálcio, indica sua alta especificidade por este cátion, tornando-o, portanto, mais eficiente que o método de von Kossa. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo, onde uma reação mais intensa foi verificada com o método de Dahl, podem ser explicados pelas propriedades químicas deste método.

**6. Alterações histopatológicas no ovotestis de *Bradybaena similis*, como resultado do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum*.**

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstram que a infecção por *E. coelomaticum* causou castração parasitária em *B. similis*, o que já havia sido registrado por vários autores em outros sistemas parasito/hospedeiro (ETGES & GRESSO, 1965, de JONG-BRINK *et al.*, 1979 e 1988, WILSON & DENISON, 1980, CHENG *et al.*, 1983, PEARSON & CHENG, 1985 e CREWS & ESCH, 1987) e sugerido por MATTOS (1987), que trabalhou com infecções experimentais de *E. coelomaticum* em



*B. similaris.*

Embora vários autores tenham observado aumento de peso e tamanho das conchas em moluscos infectados, como consequência da castração parasitária (de JONG-BRINK *et al.*, 1979, WILSON & DENISON, 1980, entre outros). Para CHENG *et al.* (1983), o aumento do tamanho dos moluscos infectados seria apenas um indicativo mas, de modo algum uma consequência da castração parasitária, uma vez que nem todos os moluscos que sofreram castração parasitária apresentaram aumento de tamanho.

PEARSON & CHENG (1985) demonstraram *in vitro* que um extrato obtido em solução salina, a partir de esporocistos de segunda geração de *Zoogonus lasius*, causava inibição da espermatogênese em *Ilyanassa obsoleta*, sendo esta a primeira evidência experimental de que moléculas produzidas pelos parasitos seriam reponsáveis pela castração de seus hospedeiros. Estes autores concluíram que algum constituinte dos esporocistos de *Z. lasius* estava relacionado com a inibição de algumas espermatogônias, impedindo que estas entrassem na fase "S" do ciclo de vida celular. Os resultados obtidos no presente estudo, estão em concordância com aqueles obtidos por CHENG *et al.* (1983) e PEARSON & CHENG (1985), visto que, embora tenha ocorrido castração parasitária de *B. similaris*, não foi verificado aumento de tamanho dos moluscos infectados experimentalmente. E que, a castração parasitária observada, no presente estudo, pode ter sido produzida por um mecanismo

semelhante ao verificado por PEARSON & CHENG (1985), uma vez que nenhum esporocisto foi encontrado no ovotestis dos moluscos infectados.

### **7. Ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* por *Bradybaena similaris*.**

O horário de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum*, observado no presente estudo, está de acordo com aqueles obtidos por CHINONE *et al.* (1976) e MATTOS (1987). Diferindo dos resultados obtidos por TANG (1950), que verificou eliminação de esporocistos de segunda geração de *E. pancreaticum*, tanto à noite como durante o dia.

Este horário preferencial noturno para a eliminação dos esporocistos, parece estar relacionado com a sincronização do ciclo do parasito aos hábitos do segundo hospedeiro intermediário. Os ortópteros têm seu pico de atividade nas horas frescas do dia (observações de coleta). Dessa forma, sendo os esporocistos eliminados durante a madrugada, quando os ortópteros fossem se alimentar pela manhã teriam acesso a estes esporocistos, infectando-se.

A duração do período de eliminação verificada no presente estudo, diferente para as duas épocas de infecção estudadas, aproxima-se dos resultados obtidos por CHINONE *et*

al. (1976) e MATTOS (1987). Embora esta proximidade seja real apenas para as infecções realizadas em novembro/1989.

O intervalo entre uma eliminação e outra, verificado no presente estudo, aproxima-se bastante dos resultados obtidos por CHINONE *et al.* (1976) e MATTOS (1987), sendo os intervalos encontrados por estes autores de 2 a 2 dias e 2 a 3 dias, respectivamente.

A duração do período de eliminação, assim como também, o número de esporocistos eliminados foram diferentes nas duas épocas de infecção, o mesmo foi observado por CHINONE *et al.* (1976) que também trabalharam com infecções em diferentes épocas do ano. Embora, a análise estatística tenha demonstrado que não houve diferença significativa com relação à temperatura, nas duas épocas de infecção estudadas. Ficou demonstrado que existe uma relação positiva entre temperaturas elevadas, como as observadas no presente estudo, e número de esporocistos eliminados.

#### **8. Influência do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum* sobre o consumo de oxigênio por *Bradybaena similaris*.**

De acordo com von BRAND & FILES (1947) não existe diferença significativa no consumo de oxigênio por moluscos infectados e não-infectados, o mesmo pode ser observado no presente estudo. Embora LEE & CHENG (1971) tenham chegado à

mesma conclusão, observaram que a taxa de consumo de oxigênio exigida pelos moluscos infectados aumentava em função do tempo pós-infecção, enquanto que a dos moluscos não-infectados diminuía. Os resultados obtidos no presente estudo, contrariamente aqueles obtidos por LEE & CHENG (1971), demonstraram uma correlação positiva entre o tempo de duração do experimento e o consumo de oxigênio pelos moluscos não-infectados, o que pode ser explicado pelo metabolismo normal desses moluscos

#### **9. Influência do parasitismo por *Eurytrema coelomaticum* sobre a deposição de cálcio nas conchas de *Bradybaena similaris*.**

CHENG (1971) observou aumento do peso das conchas de moluscos infectados. O mesmo foi observado por WILSON & DENISON (1980) e CHENG *et al.* (1983). Entretanto, de JONG-BRINK *et al.* (1979) verificaram que a remoção de nutrientes e/ou da substância gonadal que regula o crescimento, poderia causar aumento na taxa de crescimento em moluscos castrados cirurgicamente. Dessa forma, fica claro que não se pode creditar aumento de peso do molusco e do crescimento, exclusivamente ao parasitismo. No presente estudo, foi possível observar que *E. coelomaticum* causa castração parasitária em *B. similaris*, contudo os moluscos não apresentaram aumento exagerado de tamanho, e nem aumento de peso das conchas.

No presente estudo, os resultados obtidos com a análise quantitativa de cálcio nas conchas dos moluscos infectados e não-infectados, somados aos obtidos com a histoquímica para cálcio, demonstraram uma mobilização de cálcio das conchas para a glândula digestiva dos moluscos infectados, estimulada pelo parasitismo por *E. coelomaticum*. De acordo com BURTON (1972) e de WITH & SMINIA (1980), o deficit de carbonato de cálcio na hemolinfa estimula sua mobilização da concha para a hemolinfa, sendo o carbonato de cálcio, depositado nas partes moles do molusco, especialmente na glândula digestiva.

#### **10. Morfologia e composição química do esporocisto expelido de *Eurytrema coelomaticum*.**

O esporocisto expelido de *E. coelomaticum* apresentou-se protegido contra a dessecação, no ambiente, por uma estrutura adicional, o endocisto, conforme já havia sido considerado por PANIN (1972) in NESTERENKO *et al.* (1980), como uma característica do nível família.

ZDARSKA (1979a) observou a presença de glicoconjugados neutros no saco membranoso, somente do esporocisto em desenvolvimento, dando resultado PAS-negativo para o esporocisto expelido. No presente estudo, entretanto, uma reação positiva ao PAS foi observada no interior das cercárias ainda

no esporocisto de segunda geração em desenvolvimento. No esporocisto expelido, o endocisto, mostrou-se PAS-positivo, e ao redor das cercárias, observou-se uma camada fina PAS-positiva. Esta camada PAS-positiva ao redor das cercárias pode ter sido produzida por glândulas cistogênicas e poderá vir a ser parte da parede do cisto da metacercária, no segundo hospedeiro intermediário. Estudos histoquímicos da parede do cisto da metacercária, realizados por ZDARSKA *et al.* (1980), demonstraram a presença de glicoconjugados neutros na camada mediana, enquanto que as camadas interna e externa limitantes apresentavam glicoconjugados ácidos.

De acordo com ZDARSKA (1979b), o endocisto e o saco membranoso desempenham funções distintas durante o desenvolvimento das cercárias. Dessa forma, o glicogênio acumulado no endocisto funcionaria como uma reserva de energia para as cercárias e o glicogênio acumulado no saco membranoso seria utilizado para a produção de energia durante a migração até a abertura respiratória do molusco. No presente estudo, foi possível observar uma reação fortemente positiva ao Carmim de Best para as cercárias, e menos intensa para o endocisto e saco membranoso do esporocisto em desenvolvimento, demonstrando que parte do glicogênio acumulado no endocisto já havia sido transferido para as cercárias em final de desenvolvimento e, que a reserva do saco membranoso já estava sendo utilizada durante o processo migratório. Os esporocistos expelidos, mostraram uma reação positiva no parênquima do espo-

rocisto entre as cercárias.

ZDARSKA (1979b) verificou uma reação negativa ao Alcian Blue para o saco membranoso e endocisto no esporocisto expelido. Entretanto, no presente estudo, foi verificada uma reação Alcian Blue positiva para as cercárias e endocisto, no esporocisto em desenvolvimento, sendo positiva para o endocisto e saco membranoso e negativa para as cercárias, no esporocisto expelido. Demonstrando que a reserva de glicoconjugados ácidos evidenciada pelo Alcian Blue, nas cercárias e no endocisto do esporocisto em desenvolvimento, foi utilizada para terminar o desenvolvimento das cercárias, daí o resultado negativo ao Alcian Blue, observado nas cercárias do esporocisto expelido.

## CONCLUSÕES

No processo de migração pela massa visceral de *Bradybaena similaris*, os esporocistos de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* utilizam os espaços hemolinfáticos existentes entre os órgãos internos do molusco, emergindo ao exterior através do pneumóstoma do molusco hospedeiro.

A infecção por *E. coelomaticum* produz castração parasitária indireta em seu primeiro hospedeiro intermediário, *B. similaris*.

O parasitismo por *E. coelomaticum* causa uma interferência no metabolismo de cálcio de *B. similaris*, com mobilização de cálcio da concha para a glândula digestiva do molusco.



## LITERATURA CITADA

- AMATO, J. F. R. 1985. *Platelmintos (Temnocefálidos, 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, 11 p.
- ARAÚJO, J. L. de B. 1989. Moluscos de importância econômica no Brasil. I . Xanthonychidae: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821). (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Styliomatophora). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6: 583-592.
- BANCROFT, J. D. & A. STEVENS. 1977. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, New York, NY, USA, 436 p.
- BECKER, W. 1970. Untersuchungen über die aus der muttersporocyste auswandernden tochtersporocysten von *Schistosoma mansoni*, II. Die wanderung dieser stadien zur mitteldarm-

- druse. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 34: 226-241.
- BECKER, W. 1980. Microcalorimetric studies in *Biomphalaria glabrata*: the influence of *Schistosoma mansoni* on the basal metabolism. *Journal of Comparative Physiology (ser. B)*, 135: 101-105.
- BECKER, W. & I. LAMPRECHT. 1977. Mikrokalorimetrische untersuchungen zum wirt-parasitverhältnis zwischen *Biomphalaria glabrata* und *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 53: 297-305.
- BOFFI, A. 1979. *Moluscos Brasileiros de Interesse Médico e Econômico*. Editora Hucitec, São Paulo, SP, Brasil, 182 p.
- von BRAND, T. & V. S. FILES. 1947. Chemical and histological observations on the influence of *Schistosoma mansoni* infection on *Australorbis glabratus*. *Journal of Parasitology*, 33: 476-482.
- BRUMPT, E. 1941. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 18: 9-45.
- BURTON, R. F. 1972. The storage of calcium and magnesium phosphate and calcite in the digestive glands of the Pulmonata (Gastropoda). *Comparative Biochemistry and Physiology (ser. B)*, 43: 655-663.

- CHENG, T. C. 1963. The effects of *Echinoparyphium* larvae on the structure and glycogen deposition in the hepatopancreas of *Helisoma trivolvis* and glycogenesis in the parasite larvae. *Malacologia*, 1: 291-301.
- CHENG, T. C. 1968. The compatibility and incompatibility concept as related to trematodes and molluscs. *Pacific Science*, 22: 141-160.
- CHENG, T. C. 1971. Enhanced growth as a manifestation of parasitism and shell deposition in parasitized mollusks. In: *Aspects of the Biology of Symbiosis*. (Thomas C. Cheng, ed.). University Park Press, Baltimore, MD, USA, pp. 103-137.
- CHENG, T. C., J. T. SULLIVAN, K. H. HOWLAND, T. F. JONES & H. J. MORAN. 1983. Studies on parasitic castration: soft tissue and shell weights of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca) parasitized by larval trematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42: 143-150.
- CHINONE, S., K. MARUYAMA & H. ITAGAKI. 1976. Development of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda). I. Development in the first intermediate snail host. *Bulletin of Azabu Veterinary College*, 1: 15-22.
- COOK, H.C. 1977. Carbohydrates. In: *Theory and Practice of Histological Techniques*. (J. D. Bancroft and A. Stevens,

- eds.). Churchill Livingstone, New York, NY, USA, pp. 141-167.
- CREWS, A. E. & G. W. ESCH. 1987. Histopathology of larval trematode infections in the freshwater pulmonate snail, *Helisoma anceps*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49: 76-82.
- DENTON, J. F. 1944. Studies on the life history of *Eurytrema procyonis* Denton, 1942. *Journal of Parasitology*, 30: 277-286.
- DUKE, B. O. L. 1952. On the route of emergence of the cercaria of *Schistosoma mansoni* from *Australorbis glabratus*. *Journal of Helminthology*, 26: 133-146.
- ETGES, F. J. & W. GRESSO. 1965. Effect of *Schistosoma mansoni* infection upon fecundity in *Australorbis glabratus*. *Journal of Parasitology*, 51: 757-760.
- FERRI, M. G., M. A. B. ANDRADE & A. LAMBERTI. 1977. *Botânica. Fisiologia. Curso Experimental*. Editora Melhoramentos, São Paulo, SP, Brasil, 116 p.
- HUMASON, G. L. 1972. *Animal Tissue Techniques*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, CA, USA, 641 p.
- ISHAK, M. M., A. M. MOHAMED & A. A. SHARAF. 1975. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails

*Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology (ser. B)*, 51: 499-505.

de JONG-BRINK, M., J. P. ter BORG, M. J. M. BERGAMIN-SASSEN & H. H. BOER. 1979. Histology and histochemistry of the reproductive tract of the pulmonate snail *Bulinus truncatus*, with observations on the effects of castration on its growth and histology. *International Journal of the Invertebrate Reproduction*, 1: 41-56.

de JONG-BRINK, M., M. M. ELSAADANY & H. H. BOER. 1988. *Trichobilharzia ocellata*: interference with endocrine control of female reproduction of *Lymnaea stagnalis*. *Experimental Parasitology*, 65: 91-100.

JOOSSE, J. & R. van ELK. 1986. *Trichobilharzia ocellata*: physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproduction activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. *Experimental Parasitology*, 62: 1-13.

KENDALL, S. B. 1964. Some factors influencing the development and behaviour of trematodes in their molluscan hosts. In: *Host-Parasite Relationships in Invertebrate Host Second Symposium of the British Society for Parasitology*. (A. E. R. Taylor ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, England, pp. 50-73.

- KENDALL, S. B. & F. S. McCULLOUGH. 1951. The emergence of the cercaria of *Fasciola hepatica* from the snail *Lymnaea truncatula*. *Journal of Helminthology*, 25: 77-92.
- KOZUTSUMI, T. & H. ITAGAKI. 1989. Migration and emergence of *Eurytrema pancreaticum* daughter sporocysts from host snail (Trematoda, Dicrocoeliidae). *Japanese Journal of Parasitology*, 38: 290-295.
- LEE, F. O. & T. C. CHENG. 1971. *Schistosoma mansoni*: respirometric and partial pressure studies in infected *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 30: 393-399.
- LUNA, L. G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw-Hill Book Company, New York, NY, USA, 258 p.
- MALEK, E. A. & T. C. CHENG. 1974. *Medical and Economic Malacology*. Academic Press Inc., New York, NY, USA, 398 p.
- MATTOS JR., D. G. de . 1987. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907: Alguns Aspectos do seu Relacionamento com os Hospedeiros Intermediários e Definitivo sob Condições Experimentais. Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, Brasil, 87 p.
- MATTOS JR., D. G. de, S. B. AMATO & S. S. da S. VIANNA. 1987.

- Identificação do segundo hospedeiro intermediário de *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae) na região do Vale do Paraíba, São Paulo. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 10: 69-81.
- McCORNICK, P. G. 1973. Titrations of calcium and magnesium in milk with EDTA. *Journal of Chemical Education*, 50: 136-137.
- McMANUS, D. P. 1987. Intermediary metabolism in parasitic helminths. *International Journal for Parasitology*, 17:79-95.
- NESTERENKO, L. T., V. Ya PANIN & V. M. FEDOSEENKO. 1980. The structure of the endocyst in daughter sporocyst of *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889). *Folia Parasitologica*, 27: 131-133.
- PEARSON, E. J. & T. C. CHENG. 1985. Studies on parasitic castration: occurrence of a gametogenesis-inhibiting factor in extract of *Zoogonus lasius* (Trematoda). *Journal of Invertebrate Pathology*, 46: 239-246.
- PROBERT, A. J. & D. A. ERASMUS. 1965. The migration of *Cercaria* x Baylis (Strigeida) within the molluscan intermediate host *Lymnaea stagnalis*. *Parasitology*, 55: 77-92.
- SAKAMOTO, T., I. KONO, N. YASUDA & C. YAMAUCHI. 1980. Studies on *Eurytrema coelomaticum*. I. Preliminary observations on

- the biological characteres of *E. coelomaticum*. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University*, 16:83-92.
- SMYTH, J. D. 1966. *The Physiology of Trematodes*. Oliver and Boyd, Edinburg and London, England, 256 p.
- SNEDECOR, G. W. & W. G. COCHRAN. 1967. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames, IO, USA, 593 p.
- TANG, C. C. 1950. Studies on the life history of *Eurytrema pancreaticum* Janson, 1889. *Journal of Parasitology*, 36: 559-573.
- TANG, Z. & C. TANG. 1977. 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*, 23: 267-282.
- TRAVASSOS, L. 1944. Revisão de família Dicrocoeliidae Odhner, 1910. *Monografias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2: 357 p.
- VOGEL, A. I. 1961. *A Text-book of Quantitative Inorganic Analysis*. Richards Clay and Company Ltd., Bungay, Suffolk, Great Britain, 1216 p.
- WILBUR, K. M. 1964. Shell formation and regeneration. *In: Physiology of Mollusca* . (K. M. Wilbur and C. M. Yonge, eds.). Vol. I. Academic Press Inc., New York, NY, USA, pp.



243-282.

WILSON, R. A. & J. DENISON. 1980. The parasitic castration and gigantism of *Lymnaea truncatula* infected with the larval stages of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 61: 109-119.

de WITH, N. D. & T. SMINIA. 1980. The effects of the nutritional stage and the external calcium concentration on the ionic composition of the haemolymph and the calcium cells in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (ser. C)*, 83: 217-227.

ZDARSKA, Z. 1979a. Morphology, histochemistry and ultrahistochemistry of the endocyst in developing and expelled sporocysts of *Eurytrema pancreaticum*. *Folia Parasitologica*, 26: 309-312.

ZDARSKA, Z. 1979b. Histochemistry of daughter sporocysts of *Eurytrema pancreaticum*. *Folia Parasitologica*, 26: 313.

ZDARSKA, Z. V. Ya. PANIN & L. G. NESTERENKO. 1980. Morphology and histochemistry of the metacercaria of *Eurytrema pancreaticum*. *Folia Parasitologica*, 27: 150.