

UFRRJ

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

TESE

**MORFOLOGIA DE ESTRUTURAS SENSORIAIS DE CERCÁRIAS DE
Echinostoma paraensei LIE e BASCH, 1967 (TREMATODA,
ECHINOSTOMATIDAE)**

**FABÍOLA ALMEIDA MATOS DE SOUZA
2018**



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

**MORFOLOGIA DE CERCÁRIAS DE *Echinostoma paraensei* LIE e
BASCH, 1967 (TREMATODA, ECHINOSTOMATIDAE)**

FABÍOLA ALMEIDA MATOS DE SOUZA

Sob a Orientação do Professor Doutor
Jairo Pinheiro da Silva
e Co-orientação do Doutor
Arnaldo Maldonado Júnior

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em**
Ciências Veterinárias, no curso de Pós-
Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A719m Almeida Matos de Souza, Fabíola, 1982-
MORFOLOGIA DE ESTRUTURAS SENSORIAIS DE CERCÁRIAS
DE *Echinostoma paraensei* LIE e BASCH, 1967
(TREMATODA, ECHINOSTOMATIDAE) / Fabíola Almeida Matos
de Souza. - 2018.
73 f.: il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.
Coorientador: Arnaldo Maldonado Jr.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS, 2018.

1. *Echinostoma paraensei*. 2. ultraestrutura. 3.
quetotaxia. 4. estruturas sensorias. 5. microscopia
eletrônica. I. Pinheiro da Silva, Jairo, 1969-
orient. II. Maldonado Jr, Arnaldo, 1957-, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. IV.
Título.

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

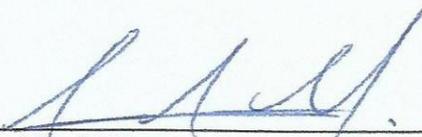
FABÍOLA ALMEIDA MATOS DE SOUZA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

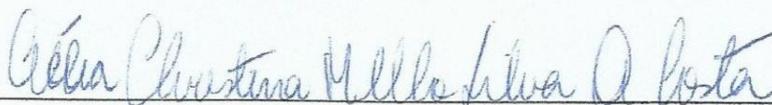
TESE APROVADA EM 28/02/2018.



Jairo Pinheiro da Silva, Dr., UFRRJ (Orientador)



José Luis Fernando Luque Alejos, Dr. UFRRJ



Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa, Dra., FIOCRUZ, RJ



Marta Júlia Faro dos Santos Costa, Dra., FIOCRUZ, RJ



Eduardo José Lopes Torres, Dr., UERJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Jairo Pinheiro da Silva Área de Biofísica, DCFis, ICBS, UFRRJ, pela oportunidade e por, além da orientação, por todo o aprendizado que não se coloca em currículo nenhum, mas que é fundamental para a vida profissional! Agradeço também ao Dr. Arnaldo Maldonado Jr. e ao Dr. Juberlan Garcia Silva, ambos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos e Reservatório, Instituto Oswaldo Cruz – IOC, pelo auxílio sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Agradeço às amigadas que tornaram todo o trabalho mais leve e os momentos difíceis divertidos, Florence, Jaqueline e Mariane. Vocês foram um dos melhores acontecimentos deste doutorado! E também à Lidiane, sem a qual nada disto teria acontecido, que acompanha minha trajetória desde o mestrado sempre pronta à auxiliar.

À Viviane Sant’Anna, Laboratório de Biologia de Helmintos Oto Wucherer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro e à Noêmia Rodrigues, Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo excelente trabalho com a microscopia, e também ao Eduardo da Silva Cinilha Tecnólogo em Design Gráfico - Ilustração e Animação Digital, UVA, 2015, Bolsista do Projeto Preservo, BNDES Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose – Malacologia, Instituto Oswaldo Cruz, pelos belíssimos desenhos, e à Dra. Sthefane D’ávila, professora adjunta do ICB da UFJF, pelo auxílio, estágio e pelo desenho.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa que permitiu o desenvolvimento desta tese.

RESUMO

SOUZA, Fabíola Almeida Matos. **Morfologia de cercárias de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). 2018.** 73 folhas. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Echinostoma paraensei é um trematódeo digenético que parasita o trato digestório mamíferos roedores, cujo ciclo biológico passa por sete estágios evolutivos, os quais são adulto, ovo, miracídio, esporocisto, rédia, cercária e metacercária. Devido à ocorrência de sinônimas aliadas ao desenvolvimento de ferramentas que permitem a descrição morfológica mais acurada, taxonomia dos equinostomatídeos por diversas vezes foi revisada, com alteração de alguns *taxa*. Aspectos que têm impactado a taxonomia desta espécie poderão ser esclarecidos com a realização da (re) descrição da anatomia do parasito, com o auxílio de ferramentas modernas como a microscopia eletrônica, em todas as fases evolutivas, uma vez que a morfologia das larvas é um critério taxonômico tradicionalmente utilizado para este grupo. O objetivo do presente trabalho foi realizar a descrição morfológica de cercárias de *E. paraensei*, através de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, e microscopia de luz, com ênfase na descrição das estruturas sensoriais argentofílicas. As cercárias foram obtidas no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Reservatórios, Fiocruz, RJ, onde o ciclo desse parasito é mantido. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura evidenciaram com detalhes o colar de espinhos característico do grupo dos equinostomatídeos, além de detalhes da estrutura dos *fin folds* e das papilas sensoriais. Já através dos resultados da microscopia eletrônica de transmissão, foi possível observar a presença de células germinativas, inclusões lipídicas, células-flama e perfis mitocondriais, além de figuras de mielina. Através da impregnação das cercárias por nitrato de prata, as estruturas sensoriais foram condizentes com as estruturas observadas externamente através da varredura, e também foi possível observar a inervação das regiões cefálica, corporal e caudal. Os resultados foram coerentes entre si, demonstrando a relação entre as estruturas externas e internas, sendo possível observar diferenças entre as estruturas sensoriais de acordo com a sua localização, como as papilas uniciliadas na região anterior e a presença de papilas não ciliadas na parte interna da ventosa ventral. Tais aspectos evidenciam uma especialização morfológica que adapta o parasito ao seu meio de vida, tornando-o por sua vez, mais eficiente em sua função, que no caso da cercária, é penetrar no segundo hospedeiro intermediário. Tais dados podem ainda fornecer a base para estudos mais detalhados sobre ciclo de vida, ecologia parasitária e para o desenvolvimento de estratégia de controle de parasitos que apresentem semelhanças no ciclo de vida.

Palavras-chave: *Echinostoma paraensei*, morfologia, ultraestrutura, microscopia eletrônica, quetotaxia, estruturas sensoriais.

ABSTRACT

Echinostoma paraensei is a digenetic trematode that parasitizes the digestive system of rodent mammals, whose biological cycle has seven stages, which are, adult, egg, miracidia, sporocyst, rediae, cercariae and metacercariae. The echinostomatids taxonomy was revised several times, with some *taxa* alterations. Aspects that are relevant to the taxonomy of this species will be clarified with the morphological redescription, carried out with accuracy, on the parasite in all evolutionary stages, once that morphology of the larvae is a criteria traditionally employed to this group. The aim of the present work was to improve the morphological description of *E. paraensei* cercariae, using scanning and transmission electronic microscopy, and light microscopy, emphasizing the description of argentofilic sensorial structures and its chaetotaxy. The cercariae were obtained at Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Reservatórios, Fiocruz, RJ, where the cycle of this parasite is maintained. The results of the scanning electron microscopy evidenced with richness of details the spine collar which is characteristic of the echinostomatid group, as well as details of the *fin fold* structure and of the sensorial papillae. Yet through the results of the transmission electron microscopy, it was possible to observe the presence of germ cells, lipid inclusions, flame-cells and mitochondrial profiles, besides myelin figures. By the silver nitrate impregnation of the cercariae, the sensorial structures were consistent to the structures observed in scanning electron microscopy, and also it was possible to observe the innervation of cephalic, body and tail regions. The results demonstrated the correlation among internal and external structures, being possible to see the differences among sensory structures according to its location, as the unciliated papillae in the anterior region and the presence of non-ciliated papillae in the ventral sucker. Such features indicate morphological specializations adapting the parasite to its environment and life cycle, making it more efficient to infect the intermediate host. These data can also provide the basis to more detailed studies on parasites life cycle, parasitic ecology and for development of control strategies of parasites with similar life cycle.

Key words: *Echinostoma paraensei*, morphology, ultrastructure, microscopy, chaetotaxia, sensorial structures.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Classes terapêuticas de fármacos utilizados em medicina veterinária. 2
Fonte: COINF, 2016.
- Figura 2.** Mapa com as localizações de *Echinostoma paraensei* no Estado de Minas Gerais: Na figura estão destacados os municípios onde há registros de ocorrência de *E. paraensei* no país. 4
- Figura 3.** **Figura 3: Mapa com as localizações de *Echinostoma paraensei* no Estado do Rio de Janeiro** Na figura estão destacados os municípios onde há registros de ocorrência de *E. paraensei* no país. 5
- Figura 4.** **Ciclo de vida geral de *Echinostoma* spp.:** (a) helmintos adultos habitam o intestino delgado de vários hospedeiros vertebrados, incluindo humanos; (b) ovos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo; (c) eclosão dos miracídeos em coleções hídricas e infecção ativa em moluscos; (d) esporocistos, (e) rédias mãe e, (f) rédias filhas, são os estágios de desenvolvimento parasitário que ocorrem no interior do primeiro hospedeiro intermediário; (g) cercárias são eliminadas e nadam até localizarem e infectarem o segundo hospedeiro intermediário (gastrópodes límnicos, anfíbios, peixes) na qual encistam transformando em metacercárias; (h) as metacercárias são ingeridas pelo hospedeiro definitivo e desencistam evoluindo para helmintos adultos (Fonte: TUNHOLI-ALVES, 2015). 10
- Figura 5.** **Microscopia de luz DIC de cercária de *Echinostoma paraensei* impregnada com nitrato de prata.** 21
- Figura 6.** **Esquema das estruturas sensoriais argentofílicas de cercárias de *Echinostoma paraensei*.** Papilas (A) e a rede nervosa (B), se estendendo até a cauda da cercária. Barra de escala = 5µm. 22
- Figura 7.** **Esquema e microscopia eletrônica de varredura da região cefálica e do corpo da cercária de *Echinostoma paraensei*.** Região cefálica com sua rede nervosa (A) e a distribuição das papilas (B) e em B1 - imagem de microscopia eletrônica de varredura das papilas unciliadas na ventosa oral. (C) rede nervosa ao redor da ventosa ventral (I) e papilas laterais (II). (C1), Microscopia eletrônica de varredura evidenciando papilas (P) não ciliadas na parte interna da ventosa ventral. 24
- Figura 8.** **Esquema do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei*.** Estruturas argentofílicas formando uma rede interligada com dois cordões principais (um deles indicado por A) e espalhados irregularmente (B). 26
- Figura 9.** **Esquema da cauda de cercária de *Echinostoma paraensei*.** Comissuras principais (P), sendo que estas parecem acompanhar os 27

fin-folds (FF) até o final da cauda e estruturas argentofílicas dispersas (AD).

- Figura 10.** Microscopia Eletrônica de Varredura da região anterior de cercárias de *Echinostoma paraensei*. A- Colar cefálico (CC) semicirculando a região da ventosa oral e papilas (P) circundando a ventosa oral. B- Colar de espinhos semicirculando a ventosa oral e ao fundo, a ventosa ventral (VV). 31
- Figura 11.** Microscopia Eletrônica de Varredura de *Echinostoma paraensei* evidenciando o colar de espinhos e espinhos tegumentares. A- Bainha tegumentar (BT) envolvendo a base dos espinhos e espinho parcialmente retraído (R). B- Espinhos tegumentares. 32
- Figura 12.** Microscopia Eletrônica de Varredura de cercária de *Echinostoma paraensei*. A- Papilas uniciliadas acompanhando a circunferência da ventosa oral e região abaixo da ventosa. B- Ventosa oral com papilas uniciliadas. 34
- Figura 13.** Microscopia Eletônica de Varredura de cercária de *Echinostoma paraensei*. Papilas bulbosas na parte interna da ventosa ventral. 35
- Figura 14.** Microscopia Eletrônica de Varredura da cauda de cercárias de *Echinostoma paraensei* detalhando os seis *fin fold*. A- *fin folds* ventrais (VFF), os *fin folds* laterais (LFF), e os *fin folds* dorsais (DFF); B- *fin folds* ventral e dorsal, observa-se nesta imagem que o *fin fold* dorsal vai até o final da cauda. C - detalhe das estriações dos *fin folds*. 37
- Figura 15:** Microscopia Eletrônica de Transmissão da porção final do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei*. A - *Fin fold* (FF) separado do restante da musculatura do corpo por uma fina capa tegumentar (CT), tecido muscular (TM). B -Tegumento já com perda da formação sincicial e a presença de núcleos apoptóticos (NA). 39
- Figura 16:** Microscopia eletrônica de transmissão do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei* evidenciando depósito de membranas (MP). Presença de depósitos de membrana sendo formados (MP) próximos à célula germinativa (CG). Acima da célula germinativa são visíveis perfis mitocondriais (M). 40
- 41
- Figura 17:** Microscopia Eletrônica de Transmissão de corte do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei*. Presença de gotículas de gordura (IL) e células germinativas (CG). 41
- Figura 18:** Microscopia Eletrônica de Transmissão, do tegumento de uma cercária de *Echinostoma paraensei* evidenciando as camadas do 43

corpo (musculatura), mitocôndrias e inclusões lipídicas. Na imagem pode ser evidenciada a camada tegumentar externa sincicial (CS), apresentando perfis mitocondriais (M) e inclusões eletrodensas (IL). Abaixo desta, encontramos a lâmina basal e, logo após, as camadas musculares, circular (MC) e longitudinal (ML), respectivamente. É possível observar hemidesmosomos (HD) conectado a camada sincicial com a musculatura circular. Barra de escala = 2µm.

- Figura 19** **Microscopia Eletrônica de Transmissão do corpo de cercária de** 44
***Echinostoma paraensei* exibindo neurônio e gotículas de**
gordura. A - Neurônio (NE) em corte transversal evidenciando a
bainha de mielina, ladeado por inclusões lipídicas (IL). B - Figura
de mielina (FM), (elipses concêntricas) e inclusões lipídicas.
- Figura 20** **Microscopia Eletrônica de Transmissão do tegumento de** 46
cercária de *Echinostoma paraensei*. Camada externa com
hemidesmosomos (HD), musculatura longitudinal (ML) e circular
(MC).
- Figura 21** **Microscopia eletrônica de transmissão do corpo de cercária de** 48
***Echinostoma paraensei*, onde observa-se uma célula flama e**
células germinativas. A- Célula flama (CF) com câmara excretora
(CE) e células germinativas (CG). B - Presença célula flama
próximo a uma célula germinativa.
- Figura 22** **Microscopia Eletrônica de Transmissão de cercária de** 50
***Echinostoma paraensei* destacando a presença de envelope**
nuclear (EM) e perfis mitocondriais (M).

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Classificação taxonômica de <i>Echinostoma paraensei</i>	7
2.2 Ciclo biológico de <i>Echinostoma paraensei</i>	9
2.3 Morfologia de <i>Echinostoma paraensei</i>	11
2.4 Larvas de trematódeos como bioindicadores	14
2.5 Quimiotaxia e estruturas sensoriais argentofílicas	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Obtenção de cercárias e impregnação com nitrato de prata	18
4.2 Microscopia de Luz de Contraste Diferencial Interferencial (DIC)	18
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	18
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Descrição de estruturas argentofílicas e quimiotáxicas de <i>Echinostoma paraensei</i>	20
5.2 Descrição de estruturas sensoriais através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em cercárias de <i>Echinostoma paraensei</i>	29
5.3 Aspectos morfológicos de cercárias de <i>Echinostoma paraensei</i> através de microscopia eletrônica de transmissão (MET)	38
6. CONCLUSÕES	51

8. REFERÊNCIAS	52
ANEXO - Artigo aceito para publicação no <i>Brazilian Journal of Biology</i>	60

1 INTRODUÇÃO

O parasitismo é uma relação comum entre os seres vivos, na qual um organismo depende fisiologicamente de outro, normalmente com a ocorrência de algum dano ao organismo hospedeiro (OLSEN, 1977). O parasitismo também apresenta, do ponto de vista evolutivo, vantagens por conta da adaptação entre parasito e hospedeiro, como a construção de genótipos e fenótipos mais adaptados ao meio onde vivem (LAMBRECHTS, 1996). Organismos podem ser considerados parasitos desde que apresentem ao menos uma fase parasítica em seu ciclo de vida, constituindo cerca de metade dos organismos encontrados na Terra, como resultado, afetam o ciclo de vida de quase todos os organismos vivos do planeta (PRICE, 1980). Dentre os grupos de animais que atuam como parasitos, os helmintos são notórios por apresentarem adaptações fisiológicas notáveis em decorrência de seu modo de vida (TRAIL, 1980).

Dentre os helmintos, a Classe Nematoda apresenta o maior número de espécies, sendo sua maioria de vida livre, trazendo impactos significativos na saúde humana e animal. Contudo, espécies do filo Platyhelminthes também ganham destaque ao lado deste primeiro grupo de organismos, apresentando ampla distribuição no nosso planeta, sendo encontrados nos mais diversos habitats e, igualmente, trazendo impacto na saúde humana e animal, consequentemente, resultando em elevadas perdas econômicas seja pela perda de força laboral ou pela perda na produção e conservação da vida animal.

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN, 2017), estima-se que são gastos anualmente cerca de 540 milhões de reais em produtos veterinários para tratamento e combate de doenças parasitárias. O mesmo órgão disponibiliza informações relevantes, como as classes terapêuticas de medicamentos mais utilizados, como ilustra o gráfico abaixo (Fig. 1):

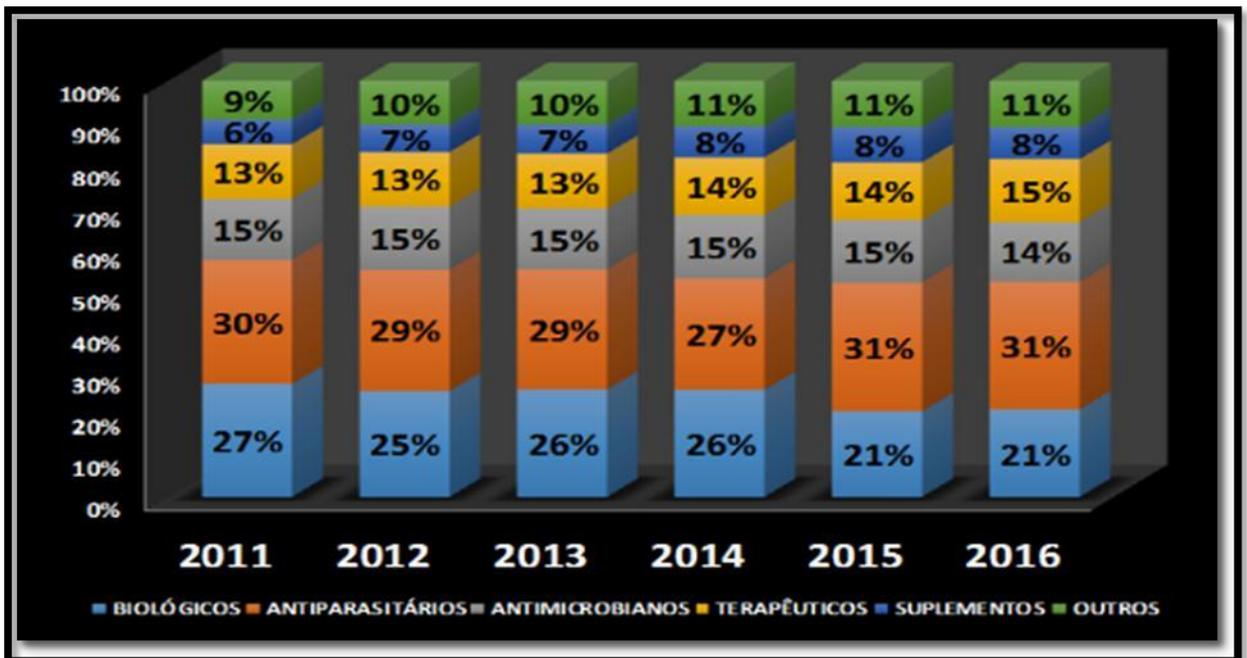


Figura 1: Classes terapêuticas de fármacos utilizados em Medicina Veterinária. Fonte: COINF (2016).

As espécies da Família Echinostomatidae constituem a maior família da Classe Trematoda, e sua utilização em pesquisas básicas, como modelos experimentais em estudos sobre biodiversidade, sistemática e em parasitologia apresenta diversas vantagens, como pela ocorrência de sete estágios evolutivos (podendo assim, fornecer dados mais completos sobre os variados estágios larvais) e fácil manutenção do ciclo em laboratório; tem contribuindo significativamente para inúmeras áreas em parasitologia e biologia (TOLEDO *et al.*, 2014).

Os equinostomatídeos são um grupo que apresentam importância no âmbito da saúde pública por serem parasitos do ser humano e de animais de importância econômica, assim como de animais selvagens, resultando em impactos na ecologia e sobrevivência destes. Dentro deste gênero, o parasito *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967, apresenta ampla distribuição geográfica, que se aloja comumente nos órgãos dos sistemas digestório mamíferos roedores, mas também pode parasitar o homem, apresentando ciclo de vida típico do grupo, com diversas fases larvais, muitas das quais já foram estudadas (KANEV *et al.*, 2000; KOSTADINOVA & GIBSON, 2000; TOLEDO *et al.*, 2007).

Há registros de membros desta família em diversos países, sendo a espécie *E. paraensei* uma espécie descrita nos Estados Unidos, por Lie & Basch (1967) a partir de moluscos naturalmente infectados coletados na região de Minas Gerais, Brasil, com registros em diferentes cidades como Belo Horizonte, Caratinga, Bambuí, MG (Fig. 3); Sumidouro, RJ (Fig. 2) (PINTO & MELO, 2013) .



Figura 2. Mapa com as localizações de *Echinostoma paraensei* no Estado de Minas Gerais: Na figura estão destacados, pelos círculos vermelhos, os municípios onde há registros de ocorrência de *E. paraensei* no país. Fonte: Google Maps. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/>. Acesso em 02/03/2018.

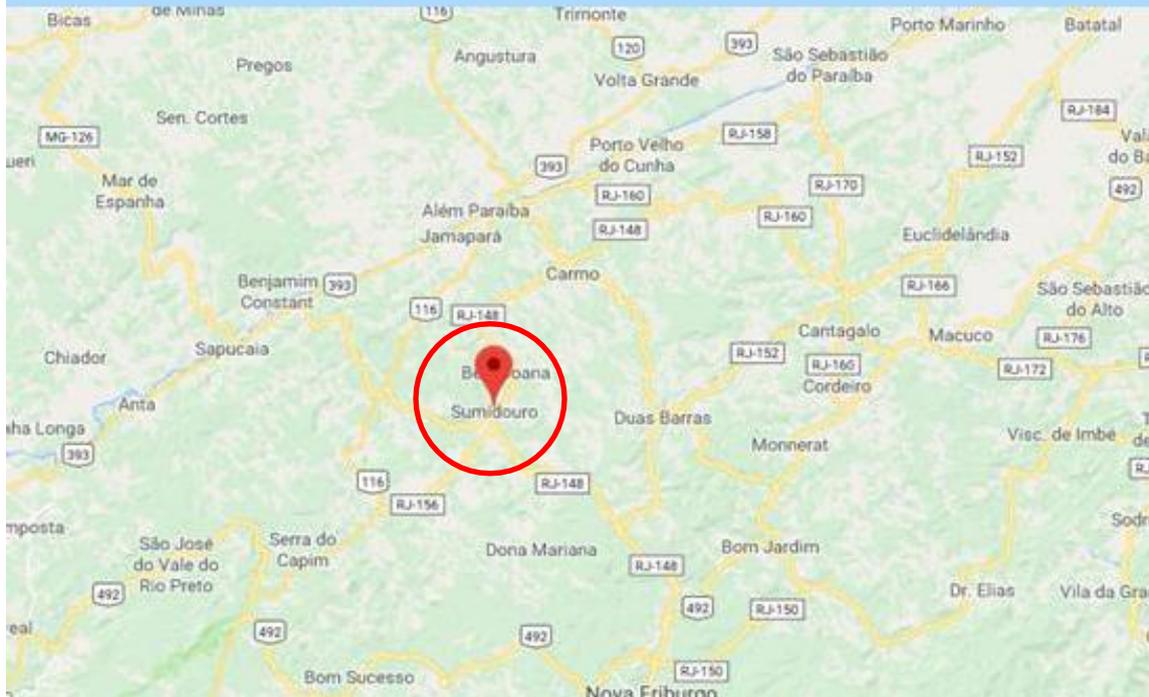


Figura 3: Mapa com as localizações de *Echinostoma paraensei* no Estado do Rio de Janeiro Na figura estão destacados os municípios onde há registros de ocorrência de *E. paraensei* no país. Fonte: Google Maps. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/>. Acesso em 02/03/2018.

Esta ampla distribuição propiciou o estudo dos equinostomatídeos em diversas regiões do globo, com registros que datam desde o século XVIII (TOLEDO *et al.*, 2014), o que propiciou grande desordem na classificação destes trematódeos digenéticos. Estudos filogenéticos e taxonômicos baseiam-se principalmente em dados morfológicos e moleculares, os quais são melhor observados e coletados com o auxílio de ferramentas surgidas posteriormente à diversos estudos de classificação.

Portanto, ferramentas como a microscopia de luz e eletrônica, fornecem importantes informações sobre a morfologia e são valiosos indicadores na elucidação de relacionamentos filogenéticos. Elementos de microscopia eletrônica proporcionam a visualização de características do tegumento e de estruturas sensoriais que são importantes ferramentas taxonômicas (EHLERS, 1985).

Embora o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular atualmente figure prioritariamente nos trabalhos descritivos, em detrimento do uso da morfologia para a identificação e classificação de um helminto, trabalhos embasados em biologia molecular fornecem dados mais concretos quando combinados com os dados morfológicos, sendo essencial que se conheça com profundidade a morfologia, não apenas do trematódeo adulto, mas também das larvas dos helmintos (CRIBB *et al.*, 2001).

Pinto & Melo (2013), em seu trabalho sobre larvas de trematódeos, reafirmam a necessidade de estudos sobre diversidade e ciclo biológico, principalmente sobre as larvas de trematódeos, com o intuito de descrever a ocorrência de novas áreas de transmissão de parasitos já consagrados como problema de saúde pública, como *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) e de outros parasitos que possam adquirir importância médica e veterinária futuramente. Os autores ainda citam a importância desses organismos como bioindicadores, trabalhos os quais são escassos no Brasil.

Já Blasco-Costa & Poulin (2017) realizaram um estudo de revisão onde ressaltam a importância dos estudos de morfologia parasitária. De acordo com os autores, a quantidade de estudos sobre morfologia e ciclo de vida diminuiu o que não é coerente com o número de espécies de parasitos descritos nos últimos anos. Os autores ainda afirmam que a morfologia dos estágios larvais e adultos é a maneira mais simples de se elucidar e identificar aspectos do ciclo de vida de parasitos; enumerando sua importância para as áreas de taxonomia, ecologia aplicada e estudos sobre evolução e dinâmica de populações.

Diante do cenário apresentado, o presente estudo teve por objetivo realizar a descrição da morfologia das estruturas sensoriais de cercárias de *E. paraensei*, correlacionando estas estruturas com a morfologia externa e ciclo de vida.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação Taxonômica de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Filo: Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Echinostomida La Rue, 1957

Família: Echinostomatidae Looss, 1899

Gênero: *Echinostoma Rudolphi, 1809*

Espécie: *Echinostoma paraensei*

No Brasil, os trabalhos pioneiros em sistemática e taxonomia de equinostomatídeos foram realizados por Lauro Travassos, em 1922 e por Adolfo Lutz, em 1924. Foram escritos diversos trabalhos redescrivendo espécies, como os de Komma, 1972, revalidando *Echinostoma erraticum* (Lutz, 1924), por Kohn e Fernandes, 1974 e Viana, 1924, com seu estudo intitulado: Tentativa de catalogação das espécies brasileiras de trematódeos.

Echinostoma paraensei é um trematódeo digenético que apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diversos animais como aves e mamíferos, inclusive o ser humano. Esse parasito aloja-se comumente nos órgãos do sistema digestório (KANEV *et al.*, 2000; KOSTADINOVA & GIBSON, 2000; TOLEDO *et al.*, 2007). Foi descrito no Brasil a partir de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) naturalmente infectadas coletadas no Estado de Minas Gerais, e seu ciclo biológico foi desenvolvido em laboratório, nos EUA, utilizando roedores como hospedeiros definitivos (LIE & BASCH, 1967).

Em um estudo realizado por Maldonado Jr. *et al.* (2001), o roedor silvestre *Nectomys squamipes* (Brant, 1827) foi incriminado como hospedeiro definitivo natural, no Estado do Rio de Janeiro. Os autores identificaram o parasito através de microscopia de luz, microscopia de varredura e sequências moleculares do espaçador ribossomal interno ITS 1-2.

Echinostoma paraensei pertence ao filo Platyhelminthes, cuja filogenia representa uma das áreas mais ativas de pesquisa em biologia. Na classificação tradicional, o Filo incluía quatro classes: Turbellaria, Monogenea, Trematoda, e Cestoda, as quais correspondem geralmente à divisão didática em vermes de vida livre, ectoparasitos, endoparasitos que apresentam em seu ciclo dois ou mais hospedeiros (sendo um deles obrigatoriamente um molusco) e as tênias, respectivamente (LIE & BASCH, 1967; SHOOP, 1988; KANEV 2000).

Segundo Toledo *et al.*, (2014), o estudo da taxonomia dos equinostomatídeos data desde o século XVIII, sendo que no século XX, diversos estudos de revisão taxonômica do grupo foram necessários devido à grande quantidade de informação existente e oriunda de diversas partes do globo, em uma época sem comunicação eficiente entre os pesquisadores.

Embora o parasitismo não seja necessariamente um critério válido para separar táxons, os ditos vermes chatos ou platelmintos parasitos constituem um grupo monofilético, chamado Neodermata, baseado na presença de uma camada de tecido sincicial, a neoderme. Identificando Cestoda e Monogenea como táxons irmãos, assim como Trematoda e Aspidobothrea (EHLERS, 1985).

A classificação atual inclui o parasito na Classe Trematoda, Subclasse Digenea, baseada em características morfológicas, descritas na espécie tipo *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) Looss 1899.

Os helmintos da Subclasse Digenea, em geral, apresentam estágio de miracídio como a primeira fase larval, ciclo de vida com uma ou mais gerações de esporocistos, uma ou mais gerações de rédias, fase de cercária e metacercária. Acrescente-se ainda o estágio de

mesocercária encontrados em ciclos biológicos de certas espécies, como *Allaria* sp. (SHOOP, 1988). As principais ordens de importância médico veterinária são: Paramphistomiformes, Echinostomatiformes, Hemiuriformes, Strigeiformes, Opisthorchiformes, Plagiorchiformes (EHLERS, 1985; GIBSON, 2002).

Publicações acerca dos equinostomatídeos, envolvem principalmente cinco espécies: *Echinostoma caproni* Richard, 1964, *E. paraensei*, *Echinostoma trivolvis* Cort, 1914, *Echinostoma echinatum* Zeder, 1803, e *E. revolutum*. A confusão taxonômica resulta de uma baixa especificidade dos membros desse gênero, principalmente relativamente ao hospedeiro intermediário (GIBSON, 2002), uma peculiaridade deste grupo, uma vez que há uma elevada especificidade dos trematódeos digenéticos, em geral, com relação ao primeiro hospedeiro molusco. Um outro motivo para as divergências taxonômicas pode ser exemplificado pelo ocorrido no trabalho de Estuningsih (1992). Segundo este autor, que realizou um trabalho de identificação de *E. revolutum* em Java, na Indonésia, a identificação deste parasito não segue um padrão taxonômico linear, uma vez que as características biológicas do mesmo variam de acordo com a espécie de hospedeiro definitivo infectada. O autor observou diferenças na duração do período pré-patente e no tamanho dos vermes, também foram observadas diferenças entre os estudos no que concerne à localização dos vermes adultos, as diferenças na morfologia e no ciclo biológico observadas em diferentes hospedeiros podem ser responsáveis por boa parte dos equívocos taxonômicos.

Até o presente momento, os trematódeos apresentam-se subdivididos em duas Subclasses: Aspidogastrea Faust & Tang, 1936 e Digenea Carus, 1863. Os primeiros constituem um grupo pequeno, onde encontramos alguns organismos parasitos de moluscos, peixes e quelônios e reconhecidos pela presença de órgão adesivo na superfície ventral do corpo. A segunda classe constitui um grupo maior, com 2.500 gêneros nominais, cuja maioria utiliza um molusco como hospedeiro intermediário e um vertebrado como hospedeiro definitivo (GIBSON, 2002).

A Ordem Echinostomida La Rue, 1957 é caracterizada pela presença de acetábulo no adulto, na região mediana do corpo, espinhos no corpo e útero localizado entre o ovário e o acetábulo; rédia com apêndice e colar. A cercária, que pode deixar o molusco e encistar no substrato, tem poro excretor primário na metade anterior da cauda e poro excretor secundário terminal. Adulto sem vesícula seminal externa, com acetábulo no terço anterior do corpo e com colar junto à ventosa oral; cercária com poro excretor primário no terço anterior da cauda (KANEV, 2000).

A Família Echinostomatidae Looss, 1899 abrange indivíduos que apresentam corpo alongado e tegumento espinhoso, ventosa oral, com ou sem colar cefálico, bolsa do cirro presente; testículos ovais ou ligeiramente lobulados; ovário pré-testicular, glândulas vitelogênicas desenvolvidas (DAWES, 1968).

Já o Gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 é representado por indivíduos com corpo alongado e espinhoso, ventosa oral com colar cefálico de dupla fileira de espinhos; ventosa ventral maior que a oral; testículos situados na metade posterior do corpo, um anterior ao outro, podendo estar ligeiramente deslocados da linha mediana; ovário na linha mediana ou levemente deslocado desta, glândulas vitelogênicas situadas lateralmente (KANEV, 2000). O Gênero *Echinostoma* é um dos que abrange o maior número de espécies e maior quantidade de espinhos no colar cefálico variando de 27 a 51 (MALDONADO Jr. & LANFREDI, 2009). A morfologia externa, muito utilizada em taxonomia para a classificação desses parasitos, é caracterizada pela presença de dois colares compostos por espinhos envolvendo a região oral e interrompidos na face ventral. O padrão em que os espinhos se encontram organizados e o tamanho dos mesmos é utilizado para a identificação de família e gênero (KOSTADINOVA & GIBSON, 2000).

2.2 Ciclo Biológico de *Echinostoma paraensei*

Em geral, os trematódeos digenéticos possuem ciclo biológico composto por sete fases evolutivas: adulto, ovo, miracídio, esporocisto, rédia, cercária e metacercária, com um hospedeiro intermediário e um definitivo. Os hospedeiros definitivos são animais vertebrados dentro dos quais se desenvolvem os vermes adultos. Os hospedeiros intermediários são moluscos límnicos, principalmente *Physa* Draparnaud, 1801, *Lymnaea* Lamarck, 1799, *Helisoma* Swainson, 1840 e *Bulinus* Müller, 1781 nos quais se desenvolvem os esporocistos, rédias e cercárias. Os segundos hospedeiros intermediários, quando presentes, são alguns anfíbios e moluscos límnicos nos quais as metacercárias se formam (KOSTADINOVA & GIBSON, 2000; DAVIS, 2005; DETWILER & MINCHELLA, 2009). Porém, as metacercárias podem se encistar no ambiente sobre substratos como vegetais e outros, não havendo nestes casos, como em *F. hepatica*, um segundo hospedeiro intermediário.

A penetração ou a ingestão do ovo contendo o miracídio pelo primeiro hospedeiro, leva ao desenvolvimento das fases de reprodução assexuada do parasito, com a ocorrência das larvas: esporocisto, rédia e cercária. A perda de um destes estágios larvais pode ser observada em determinadas espécies de trematódeos, como o *S. mansoni* e *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 que não apresentam rédias em seu desenvolvimento larval intramolusco (SHOOP, 1988). Muitas espécies de trematódeos digenéticos apresentam uma forma cística denominada metacercária, que encista sobre um substrato, como rocha e vegetação, ou encistam no interior de outro hospedeiro, como outro molusco, peixes, larvas de insetos, onde encistam, havendo, neste caso, a presença de um segundo hospedeiro intermediário no ciclo de vida do parasito. A penetração da cercária em seu hospedeiro definitivo vertebrado, ou a ingestão da metacercária pelo mesmo, permite o término do desenvolvimento do trematódeo, o qual atinge o estágio adulto, iniciando a oviposição e dando continuidade ao seu ciclo de vida (SHOOP, 1988). O mesmo autor fala sobre a existência de uma fase larval denominada mesocercária, a qual pode ser transmitida por via transmamária, porém esta não está presente no ciclo de *E. paraensei*.

Os hospedeiros definitivos de *E. paraensei* são mamíferos roedores, dentre os quais, destacam-se espécies utilizadas em modelos experimentais como *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar, muito utilizada em biotérios) e *Mus musculus* (espécie de camundongo também utilizado em laboratório). Também infecta a espécie *Mesocricetus auratus*, popularmente conhecido como hamster-sírio criado como animal doméstico e para fins de pesquisas. Os roedores da espécie *N. squamipes* foram identificados como hospedeiro definitivo natural deste parasito e é a responsável pela manutenção do ciclo silvestre (MALDONADO *et al.*, (2001).

Sianto *et al.*, (2005), relatou a presença de ovos de *Echinostoma* sp. em um corpo mumificado de um indivíduo pré-colombiano no Brasil, sendo este e o registro de Fried & Graczyk (2000) os únicos reportados sobre infecção por equinostomatídeos em seres humanos no país até o presente momento.

A ocorrência de um hospedeiro intermediário no ciclo de helmintos parasitos é um acontecimento evolutivo, resultado da necessidade de alcance de hospedeiro definitivo em níveis tróficos mais altos, representando um elemento a mais para a dispersão das larvas, mas, sobretudo, sendo importante para que se estabeleça um elo entre o primeiro hospedeiro intermediário e o hospedeiro definitivo, uma vez que, nestes casos, o primeiro (HI 1º) não constitui um elemento do hábito alimentar do segundo (HD).

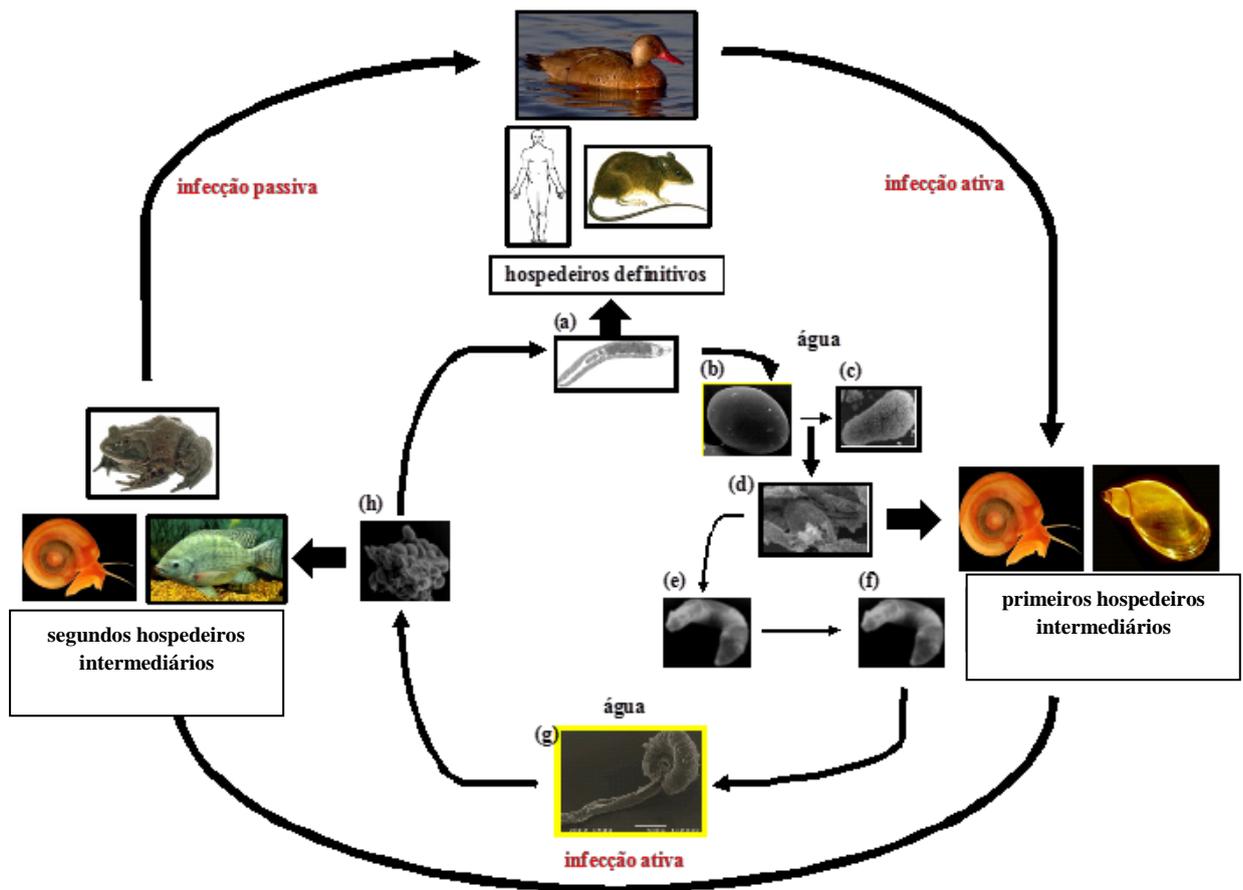


Figura 4: Ciclo de vida geral de *Echinostoma* spp.: (a) helmintos adultos habitam o intestino delgado de vários hospedeiros vertebrados, incluindo humanos; (b) ovos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo; (c) eclosão dos miracídios em coleções hídricas e infecção ativa em moluscos; (d) esporocistos, (e) rédias mãe e, (f) rédias filhas, são os estágios de desenvolvimento parasitário que ocorrem no interior do primeiro hospedeiro intermediário; (g) cercárias são eliminadas e nadam até localizarem e infectarem o segundo hospedeiro intermediário (gastrópodes límnicos, anfíbios, peixes) na qual encistam transformando em metacercárias; (h) as metacercárias são ingeridas pelo hospedeiro definitivo e desencistam evoluindo para helmintos adultos (Fonte: TUNHOLI-ALVES, 2015).

Dentre os helmintos parasitos, é comum a ocorrência de ciclos de vida complexos em todos os grupos de nematoides, cestoides e trematódeos, incluindo frequentemente a transmissão entre os hospedeiros através dos níveis tróficos.

Parasitos, de um modo geral, enfrentam consideráveis desafios para alcançarem um hospedeiro, principalmente quando este hospedeiro é um molusco e envolve adaptações morfológicas e bioquímicas. Os equinostomatídeos conseguem interagir com o sistema de defesa dos moluscos, evitando assim que a infecção seja interrompida pelas reações celulares e humorais deste hospedeiro. Saber dos aspectos de vida e da ecologia de *E. paraensei* permite também o controle da transmissão de outras doenças parasitárias que se constituem um problema de saúde pública e que são igualmente transmitidos por moluscos (COEN *et al.*, 2000).

Benesh *et al.*, (2014) em seus estudos sobre ecologia parasitária observaram que, quanto maior o nível trófico do hospedeiro definitivo, mais hospedeiros intermediários ocorrem no ciclo e conseqüentemente o parasito apresenta mais mudanças em sua morfologia, que também está relacionada às fases de reprodução sexuada e assexuada.

2.3 Morfologia de *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967)

Os trematódeos pertencentes ao gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 são parasitos intestinais de aves e mamíferos com ampla distribuição mundial, existindo atualmente mais de 120 espécies nominais descritas (KOSTADINOVA & GIBSON, 2000; KOSTADINOVA, 2005). O ciclo biológico desses parasitos envolve três hospedeiros. Cercárias são produzidas em moluscos gastrópodes dulcícolas e após emergência formam metacercárias em moluscos ou larvas de anuros, que ao serem ingeridos pelos hospedeiros definitivos desenvolvem-se em parasitos adultos (TOLEDO *et al.*, 2009). Apesar da diversidade de espécies descritas, poucas possuem o ciclo biológico completo conhecido, a maior parte destas contém 37 espinhos no colar cefálico e pertencem ao complexo *Echinostoma revolutum* (FRIED & GRACZYK, 2000).

São organismos que são parasitos de órgãos internos, primariamente de moluscos, onde se desenvolvem larvas assexuadas e, ocasionalmente, adultos sexuais, e vertebrados que albergam estágios adultos sexuais. São, principalmente, parasitos de tecidos em moluscos, mas podem ocorrer em uma ampla variedade de cavidades corporais, tecidos e órgãos nos hospedeiros vertebrados. Os adultos apresentam dois órgãos de fixação (ventosa oral e acetábulo), tegumento de natureza sincicial, onde encontramos especializações, tais como, espinhos e papilas. Aparelho digestório presente, com uma abertura oral, normalmente localizada no interior de um órgão de fixação, pré-faringe, faringe muscular e intestino composto por cecos bifurcados, os quais, geralmente, terminam em fundo cego. São hermafroditas, com raras exceções (GIBSON, 2002).

O estágio de ovo é de grande importância, pois esses entram em contato com diferentes ambientes, como o corpo do parasito, meio aquático ou terrestre; enfrentando diversidades e variações ambientais, viabilizando a continuidade do ciclo de vida dos parasitos (PINHEIRO, 2003). No caso do *E. paraensei*, o ovo é eliminado com as fezes do hospedeiro definitivo e precisa permanecer no ambiente por um período de, aproximadamente, 14 dias para que haja a formação da miracídio em seu interior, uma vez que os ovos são eliminados não embrionados, como ocorre também em *F. hepatica*. O que torna o ovo um elemento mais importante neste caso, pois a sua exposição às condições ambientais (pH, salinidade, temperatura e outros) é maior do que nas espécies de trematódeos que já eliminam o ovo embrionado, com o miracídio formado e pronto para eclodir e infectar o molusco hospedeiro intermediário.

Além disso, contribuem para o diagnóstico laboratorial, quando são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo. A morfologia desse estágio é alvo de estudos importantes como os realizados por Thomas & Poulin (2003), que estudaram a variação no tamanho de ovos de trematódeos hermafroditas, correlacionando estratégias reprodutivas e variáveis bióticas e abióticas do meio. Jurberg *et al.* (2008) realizaram estudos da morfologia de ovos através de microscopia confocal, realizando um detalhado estudo sobre a estrutura interna deste estágio. O estudo de Pinheiro (2003) revelou com riqueza de detalhes a estrutura dos ovos de *E. paraensei*, utilizando as ferramentas de microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão.

As cercárias constituem fase de vida livre que emergem dos moluscos em grande número no ambiente aquático, constituindo um agente de dispersão espacial do parasito, pelo fato de o hospedeiro intermediário secundário ser um molusco aquático. Seu tempo de vida é curto, uma vez que não se alimentam e, portanto, dependem de reservas de glicogênio. Tais circunstâncias levaram a adaptações que aumentam as chances do encontro das cercárias com o hospedeiro final, tais como: grande número de larvas, caracterizando os trematódeos como estrategistas “r”; a liberação em períodos de maior possibilidade de encontro com o hospedeiro, acompanhada de respostas a estímulos ambientais, físicos e químicos e o desenvolvimento de características morfológicas e comportamentais visando à sua atração (PINTO & MELO, 2013; KOEHLER, 2012). Desta forma, as cercárias constituem um importante elemento de dispersão dos trematódeos, seja espacial, devido a sua capacidade deslocamento pela sua atividade natante resultante da presença de uma cauda, seja temporal pela sua capacidade de sobreviver por um certo período de tempo desde a sua emergência a partir do molusco hospedeiro até encontrar seu próximo hospedeiro. Por esta razão, as cercárias livres natantes dos trematódeos têm sido alvo de muitos estudos, pois se tornaram alvo de programas de controle integrado, sobretudo com relação às espécies que parasitam animais de interesse comercial, uma vez que podem ser um ponto de interrupção do ciclo de vida do parasito, antes que este alcance o hospedeiro definitivo vertebrado, resultando em uma produção livre de anti-helmínticos e outras drogas, um objetivo bastante almejado principalmente nos dias atuais nos quais a busca por produtos orgânica tem sido ampliada.

Isso resultou em um grande interesse por parte da comunidade científica em identificar tipos cercarianos, principalmente através de sua morfologia, além de elucidar aspectos comportamentais e biológicos desta fase. King & Van As descreveram o ciclo de vida e a morfologia de cercárias de adultos do echinostomatídeo *Petasiger variospinosus* (Odhner, 1910), através de microscopia de luz e microscopia de varredura. Já Choi *et al.* (2006) descreveram a morfologia de cercárias de *Echinochasmus japonicus* Tanabe, 1926, através de microscopia de luz e eletrônica de varredura, revelando detalhes como espinhos no corpo, papilas ciliadas e não ciliadas nas ventosas. Kostadinova *et al.* (2003), realizaram estudos sobre o gênero *Echinostoma* e gêneros correlacionados através de análises morfológicas e biomoleculares de cercárias, reafirmando as relações filogenéticas entre alguns grupos e sugerindo mudanças em outros Taxa.

O estudo de fases larvais, principalmente o de cercária, pode esclarecer sobre as condições de um ambiente, demonstrando biodiversidade e condições ambientais favoráveis, isso pode ser comprovado pelo trabalho de Fernández *et al.* (2014), realizando em campos de cultivo de arroz na Argentina. Os autores descreveram a presença de três diferentes cercárias do gênero *Echinostoma*, que não haviam sido descritas na região, infectando sapos e aves.

Trabalhos com ênfase na descrição da morfologia foram realizados com os diferentes estágios do ciclo biológico de *E. paraensei*. Pinheiro *et al.* (2004a; 2005) descreveram a morfologia do miracídio de *E. paraensei* através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Dentre os resultados obtidos, a impregnação com nitrato de prata revelou que *E. paraensei* também pode ser considerado pertencente ao grupo taxonômico de

E. revolutum, uma vez que foi observado que o número e arranjo das estruturas argentofílicas idênticas à papilas do miracídio de *E. paraensei* foi semelhante ao deste grupo.

Entre as fases de larvas de vida livre, fatores como a presença do hospedeiro, o qual secreta glicoconjugados em seu muco capaz de atrair os miracídios (KALBE *et al.*, 2000; 1997), e a pressão seletiva do meio influenciam a morfologia.

A morfologia da rédia de *E. paraensei* também foi descrita a partir de estudos em seu hospedeiro intermediário *Lymnaea columela* (Say, 1817). Pinheiro *et al.* (2004) descreveram a morfologia da rédia de *E. paraensei*, com a presença de papilas uniciliadas na ventosa oral, papilas bulbosas e o tegumento sincicial típico da classe neodermata. Foram detalhadas estruturas do tegumento, como a presença de mitocôndrias e corpos secretores na região mais externa do tegumento, indicando que o mesmo possui importante papel na absorção de nutrientes pela rédia (PINHEIRO *et al.*, 2004b).

Souza *et al.* (2011) observaram, com o auxílio de microscopia de luz e confocal, o desenvolvimento do sistema reprodutivo de *E. paraensei* em roedores da espécie *M. auratus* e verificaram que o sistema reprodutivo do parasito se mostrou funcional após 14 dias de infecção. Também foi descrita, pelos autores supracitados, a morfologia do estágio de metacercária, demonstrando diversas semelhanças fenotípicas compartilhadas por *E. paraensei*, *E. trivolvis* e *E. caproni*, além da elucidação de aspectos na formação dos cistos, os quais se constituem uma forma de resistência do parasito. Souza *et al.* (2017) realizaram infecções experimentais em ratos Wistar e em *hamsters* e estudaram o desenvolvimento gonadal de *E. paraensei*, com resultados demonstrando que nos ratos, o desenvolvimento gonadal foi prejudicado desde os estágios larvais, sendo os *hamsters* hospedeiros que permitem o melhor desenvolvimento do parasito.

A presença do colar de espinhos periesofageanos é um caracter taxonômico muito forte no gênero *Echinostoma*, sendo conservado e bastante evidente mesmo nas cercárias, o que define um tipo cercariano, as *echinostome* cercárias. Apesar disso, os autores que descreveram a espécie *E. paraensei* não citaram a presença dessa estrutura (LIE & BASCH, 1967).

Em um estudo com cercárias de *E. revolutum*, Kanev *et al.* (1993) redescreveram a morfologia dos *fin fold* (dobras do tegumento da cercária) que representam um critério de valor taxonômico, também sem citar a presença do colar de espinhos. Já os resultados obtidos por Pinheiro (2003), demonstraram que as cercárias de *E. paraensei* possuem cavidades nos locais onde se desenvolverão os espinhos do colar periesofageano, utilizando apenas microscopia eletrônica de varredura. Os resultados das pesquisas demonstram a importância dos estudos morfológicos na elucidação de aspectos da relação parasito-hospedeiro e do valor taxonômico que a visualização das estruturas através de ferramentas como a microscopia fornece.

A análise ultraestrutural das formas larvais pode revelar aspectos que contribuem para o controle do parasito, contornar a resistência a anti-helmínticos, resistência à infecção, métodos diagnósticos e elaboração de vacinas para o controle da infecção, assim como elucidar aspectos da taxonomia do grupo em questão, sobretudo em grupos que apresentam uma taxonomia tão controversa quanto os equinostomatídeos (PINTO & MELO, 2013). Stillson & Platt (2007), realizaram um estudo correlacionando uma alta densidade populacional e variações morfométricas em *E. caproni*, seus resultados demonstraram um maior efeito da densidade populacional na morfometria das estruturas reprodutivas, e também para outras estruturas diferentes em menor amplitude.

Estudos sobre morfologia podem ainda auxiliar estudos na área de epigenética, que estuda as alterações bioquímicas que ocorrem no DNA sem alterar a sequência de nucleotídeos, alterando, entretanto, expressão dos genes, ou seja, alteram o fenótipo. Essas alterações são causadas pela exposição a agentes externos, como substâncias tóxicas e

mutagênicas, dieta e estresse. A metilação de bases de DNA e modificações pós-traducionais nas histonas são as alterações epigenéticas mais conhecidas, sendo as modificações nas histonas o mecanismo mais comum no que concerne às mudanças epigenéticas em parasitos, assim como a presença de moléculas de RNA não codificadoras, que atuam de forma deletéria sobre proteínas transcritas (YOUNG, 2008; ZAWADZKI *et al.*, 2012). De acordo com Waterland & Jirtle (2003), essas alterações envolvem em grande parte o silenciamento de genes, e estas alterações são suscetíveis à variações ambientais, as quais podem influenciar diretamente nas alterações fenotípicas, através da influência epigenética de substâncias do meio.

O silenciamento de genes já foi utilizado em ensaios laboratoriais para *S. mansoni*, com resultados promissores para a elaboração de novos fármacos no tratamento da esquistossomose. Marek *et al.* (2013) relataram incapacidade para oviposição e Carneiro *et al.* (2014) relataram que o silenciamento de genes através de fatores epigenéticos em *S. mansoni*, além de afetar o sistema reprodutor de fêmeas adultas, teve efeito na viabilidade dos ovos. Outro estudo sobre efeitos de fatores epigenéticos, realizado por Carneiro *et al.* (2015) verificou que a acetilação de histonas se mostrou eficiente no controle das fases imaturas e adultas de *S. mansoni*. Uma das formas de se verificar tais efeitos pode ser constatando a presença de núcleos apoptóticos nos parasitos.

Geyer & Hoffmann (2012) realizaram um levantamento bibliográfico reunindo evidências de que fatores epigenéticos, principalmente a metilação do DNA, modificações pós traducionais de histonas influenciam o desenvolvimento e a biologia dos Platelminotos, agindo sobre a diversidade fenotípica, as relações com hospedeiros e com o ambiente, dentre outros fatores.

Como afirmam Costa & Pacheco (2013), a regulação da expressão gênica em nos organismos eucariontes, de modo geral, apresenta grande complexidade, sendo que uma parte desses mecanismos começou a ser desvendadas recentemente. Assim, a compreensão dos mecanismos epigenéticos ainda pode oferecer um amplo espectro de possibilidades no desenvolvimento de medidas preventivas, diagnósticas e terapêuticas, para uma ampla variedade de patologias, inclusive o parasitismo.

2.4 Larvas de Trematódeos como Bioindicadores

Segundo Goulart & Callisto (2003), devido à intensa degradação ambiental que ocorre em diversas regiões do globo, desenvolveu-se a necessidade de estudos de impactos ambientais. Como os ecossistemas aquáticos são particularmente sensíveis, a avaliação de impactos ambientais em tais ecossistemas se faz de extrema importância, e uma das maneiras possíveis de se realizar tal atividade, é através da utilização de organismos conhecidos como bioindicadores. Bioindicadores são organismos que desenvolvem alterações em sua fisiologia e bioquímica quando expostos à alterações ambientais, podendo estas ser positivas ou, com maior frequência, negativas (HUSPENI & LAFERTY, 2004; HUDSON *et al.*, 2006).

Para tais estudos, os métodos de avaliação de impactos ambientais utilizando organismos bioindicadores incluem: verificar variações nos índices de abundância e riqueza das espécies, abundância de organismos resistentes, perda de espécies sensíveis, ensaios ecotoxicológicos, entre outros (BARBOUR *et al.*, 2009).

De acordo com Bagliano (2012), alguns organismos bioindicadores podem apresentar alterações quanto às suas funções regulares e quanto à simetria do corpo, em organismos que apresentam simetria bilateral, sendo as irregularidades morfológicas um critério de avaliação de impacto ambiental. Essas mudanças recebem o nome de Assimetria Flutuante, podendo estas anormalidades serem adquiridas pela exposição prolongada à agentes ambientais estressores (LIJTEROFF, LIMA, PRIERI, 2008).

Apesar dos efeitos negativos do parasitismo em seus hospedeiros, alguns parasitos, ou fases larvais destes, podem ser considerados como indicadores positivos da saúde ambiental de um ecossistema, uma vez que dependem das populações de hospedeiros, das teias alimentares e das interações entre as comunidades de hospedeiros intermediários e definitivos para completarem seus ciclos de vida (HUDSON *et al.*, 2006; MARCOGLIESE *et al.*, 2005).

Hudson *et al.* (2006) afirmam que a diversidade de trematódeos em moluscos é menor em ambientes impactados. Assim, as cercárias são fases de vida livre, geralmente vivendo por poucas horas, apresentando, portanto, adaptações para uma eficiente dispersão e encontre um hospedeiro. Tais adaptações incluem: a produção de um número elevado de cercárias no primeiro hospedeiro intermediário, liberação das cercárias em períodos onde as chances de encontro com o segundo hospedeiro intermediário sejam maiores, o desenvolvimento de resposta à estímulos do ambiente e emitidos pelos possíveis hospedeiros (COMBES *et al.*, 1994; KOEHLER *et al.*, 2012, MORLEY, 2006). Tais adaptações podem ser alteradas em um ambiente degradado, sendo, portanto, um medidor de qualidade desse ambiente.

2.5 Quimiotaxia e estruturas sensoriais argentofílicas

O estudo de estruturas sensoriais de larvas de trematódeos foi realizado por alguns autores com o auxílio de nitrato de prata, devido à sua afinidade com aquelas estruturas. Os trabalhos realizados associaram os dados obtidos nesses estudos com os de quetotaxia, que é, por definição, o estudo da morfologia e distribuição de estruturas (cerdas, papilas, cílios, etc.) que estão envolvidas com a percepção de estímulos do meio, sejam eles químicos ou mecânicos (BOGÉA & CAIRA, 2001; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; CHERNIN, 1970; ZDARSKA, 1995).

O estudo realizado por Bayssade-Dufour *et al.* (1989), que propôs uma nomenclatura para a quetotaxia de cercárias do gênero Plagiorchyata, foi um dos principais trabalhos realizados nesse sentido, e que é amplamente utilizado por autores como Bogéa e Caira (2001) e Toledo *et al.* (2007), Zdarska (1987), que realizaram trabalhos de quetotaxia em diversos grupos, dentre eles, os dos Equinostomatídeos.

Loy *et al.* (2001) realizaram estudos sobre a quetotaxia de cercárias do tipo equinostoma, identificando a geo e foto orientação das mesmas. Já a quetotaxia de *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932, foi descrita por Kostadinova, 1999. Esses estudos demonstram a importância da interação entre as áreas de morfologia, bioquímica e ecologia, para o controle de parasitos de importância médico veterinária, através do desenvolvimento de estratégias desenvolvidas a partir dos conhecimentos obtidos nesses trabalhos.

Ainda relacionado a estruturas sensoriais, alguns trabalhos têm como foco a atração exercida pelo hospedeiro intermediário sobre as larvas de trematódeos. Magalhães *et al.* (1991) realizou um estudo utilizando três diferentes espécies de hospedeiros intermediários, todos moluscos límnicos, e observaram a atração miraxonal exercida sobre miracídios de *S. mansoni* Sambon, 1907 e verificaram que a água onde os moluscos foram acondicionados exerceu atração sobre os miracídios.

Seguindo o mesmo raciocínio, outros autores realizaram estudos com foco nas larvas de trematódeos e em seus mecanismos para encontrar possíveis hospedeiros intermediários. Haberl *et al.*, (2000), perceberam que miracídios e cercárias de *E. caproni* utilizam sinalizações distintas para identificar as mesmas espécies de moluscos. Isso pode ser explicado pela alteração morfológica e conseqüentemente nas estruturas sensoriais distintas. Já Théron *et al.*, (1998) observaram a escolha de hospedeiros intermediários concernente ao tamanho desses. Ficou demonstrado que a maior parte dos miracídios escolheram moluscos

na fase de jovens adultos, e que esta escolha pode estar relacionada à percepção de diferentes sinalizadores químicos liberados pelos moluscos nas diferentes fases de vida.

Em contrapartida, os hospedeiros intermediários podem desenvolver estratégias protetivas, como a criação de resistência a determinadas linhagens de parasitos como observado por Lie *et al.*, (1979) e Lie *et al.*, (1983) para *B. glabrata* e equinostomatídeos e *B. glabrata* e *S. mansoni*, respectivamente.

Grabda-Kazubska *et al.*. (1991), estudaram a morfologia e quetotaxia de cercárias de *Echinochasmus* sp, revalidando sua descrição como um membro da família Echinochasmidae, sendo assim, um trabalho de valor taxonômico. O estudo de morfologia de rédias e cercárias de *Isthmiophora melis* (Schrunk, 1788) foi realizado e comparado com outros equinostomatídeos e grupos relacionados de trematódeos, com intuito de elaborar um padrão para esses estágios larvais e, conseqüentemente, estratégias de controle eficazes (GRABDA-KAZUBSKA & LASKOWSKI, 1996). Ambos os estudos exemplificam diferentes finalidades para os trabalhos de quimiotaxia, reafirmando sua importância.

3 . OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Analisar a morfologia das cercárias de *E. paraensei*, com ênfase nas estruturas sensoriais.

3.2 Objetivos específicos:

- Descrever as estruturas sensoriais argentofílicas das cercárias de *E. paraensei* através da microscopia de luz de contraste interferencial.
- Descrever a morfologia de superfície das cercárias de *E. paraensei* através da microscopia eletrônica de varredura.
- Descrever a morfologia das cercárias de *E. paraensei* por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de Cercárias e Impregnação com Nitrato de Prata

As cercárias foram obtidas no de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, onde o ciclo de *E. paraensei* é mantido, utilizando *B. glabrata*, como primeiro e segundo hospedeiros intermediários, e ratos Wistar como hospedeiro definitivo (CEUA LW 47/14). Para a obtenção das cercárias, os moluscos infectados experimentalmente, foram mantidos em placas de 24 furos, individualmente, e expostos à luz de uma lâmpada incandescente de 100W de potência. A cada hora de exposição o conteúdo de cada poço era verificado para observar a emergência cercarial e as cercárias eram coletadas com o auxílio de uma micropipeta.

Para a descrição de estruturas sensoriais argentofílicas de cercárias de *E. paraensei* foi realizada através da impregnação com nitrato de prata (AgNO_3), sendo transferidas para um recipiente com solução aquosa de AgNO_3 0,5% a 60°C e observadas ao microscópio estereoscópico. Quando as cercárias se depositaram no fundo do recipiente, estas foram lavadas três vezes em água destilada e transferidas para outro recipiente contendo água destilada e expostas à luz de uma lâmpada de 100W de potência por 3-10 minutos para a redução da prata.

As cercárias assim tratadas foram processadas para sua montagem em lâminas permanentes, através de três lavagens em água destilada, 5 minutos cada, desidratações consecutivas em série etanólica crescente: 10, 30, 50, 70 e 90%, seguida por uma bateria de três desidratações em etanol à 100%, sendo cada uma das baterias com duração de 15 a 30 minutos (AMATO *et al.*, 1991).

Após esse procedimento, as cercárias foram processadas em concentrações de álcool e xilol nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:3, sucessivamente, sendo posteriormente colocadas em duas imersões de xilol puro, com cada procedimento sendo realizado no tempo de 15 a 30 minutos. Após esses procedimentos, as cercárias foram montadas entre lâmina e lamínula utilizando bálsamo do Canadá como meio de montagem e observadas ao microscópio de luz (AMATO *et al.*, 1991).

4.2 Microscopia de Luz de Contraste Diferencial Interferencial (DIC)

As cercárias foram fixadas com nitrato de prata e colocadas em lâminas com bálsamo do Canadá, sendo observadas, utilizando objetiva de imersão (100x), ocular de 10x e fator de tubo igual a 1,0 em um microscópio Zeiss-Axioplan equipado com DIC Optics (differential interference contrast) e ao qual uma câmera Hamamatsu C2400 CCD foi acoplada. A digitalização das imagens foi feita utilizando o *software* Argus-20 Image Processor (Hamamatsu, Japan) (PINHEIRO, 2003). Após a confecção dos desenhos, montados a partir das fotos obtidas, os mesmos foram submetidos a vetorização no Adobe Illustrator CC 2015.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As cercárias de *E. paraensei* foram fixadas em glutaraldeído [$\text{C}_3\text{H}_6(\text{CHO})_2$] 2,5% em tampão cacodilato ($\text{C}_2\text{H}_6\text{AsO}_2\text{Na}$) 0,1 M, pH 7,4, a 4° C, por 24 horas. O material fixado foi levado para o Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, IBCCF, CCS, UFRJ, onde foram lavadas no mesmo tampão por três vezes, durante 15 minutos cada lavagem, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% e ferrocianeto de potássio [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$] 0,8% por 40 minutos, no escuro. As cercárias foram lavadas, novamente, por três vezes, durante quinze minutos cada lavagem no mesmo tampão e seguiu-se a desidratação em série etanólica

crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 3 x 100%), utilizando quinze minutos para cada concentração de álcool etílico. Após a desidratação, o material foi secado em câmara de ponto crítico CPD Balzers, utilizando CO₂. As cercárias secas foram montadas em suportes metálicos, previamente revestidos com fita dupla face de carbono e cobertas com uma camada de, aproximadamente, 14 nm de ouro (PINHEIRO, 2003).

As cercárias foram observadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 5310, a 20 kV, WD 14 e SS 09 e as imagens digitalizadas através do programa SemAfore.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As cercárias foram fixadas em glutaraldeído [C₃H₆(CHO)₂] 2,5% em tampão cacodilato (C₂H₆AsO₂Na) 0,1 M, pH 7,4, a 4° C, por 24 horas. O material fixado foi levado para o Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, IBCCF, CCS, UFRJ, onde foram lavadas no mesmo tampão por três vezes, durante 15 minutos cada lavagem, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% e ferrocianeto de potássio [K₄Fe(CN)₆] 0,8% por 40 minutos, no escuro. Após esse período foram lavadas, novamente, por três vezes, durante quinze minutos, cada lavagem, no mesmo tampão e seguiu-se a desidratação em série cetônica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 3 x 100%). As cercárias foram infiltradas em misturas de resina epóxi Polybed-812 e acetona, nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3, seguindo-se a infiltração com resina pura, utilizando intervalos de oito horas à temperatura ambiente. As cercárias foram transferidas para cápsulas de polietileno (BEEM – Better Equipment for Electron Microscopy), as quais tiveram seu volume completado com resina e colocadas para polimerizar em estufa seca a 60° C, por 48 horas. Os blocos obtidos foram trimados manualmente e as secções ultrafinas, com 60 nm de espessura, feitas em ultramicrótomo RMC, usando faca de diamante, com três milímetros de gume, Diatome. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de 300 malhas e contrastados em solução metanólica de acetato de uranila [(UO₂CH₃O₂)₂.2H₂O] 2,5%, por 40 minutos, no escuro, sendo, em seguida, lavados três vezes em água destilada, utilizando dez minutos em cada lavagem e transferidos para uma solução aquosa de citrato de chumbo [Pb(C₆H₇O₇)₂] por cinco minutos e, após este tempo, lavados três vezes em água destilada, utilizando, dez minutos em cada lavagem. Os cortes foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Quanta 250, usando 80 kV (PINHEIRO, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição de estruturas argentofílicas e quimiotáxicas de *Echinostoma paraensei*

Trabalhos descrevendo as estruturas sensoriais utilizam como base estudos anteriores que estipulam diretrizes para a descrição dessas estruturas. No presente estudo, o trabalho de Bogéa e Caira (2001) foi utilizado como modelo para a descrição das estruturas sensoriais de *E. paraensei*. Ambas as autoras enfatizam a combinação da utilização do método de impregnação por nitrato de prata (Figura 5), juntamente com técnicas de microscopia, pelo fato de que a impregnação não fornece informações sobre a morfologia dos diferentes tipos de estruturas sensoriais.

No primeiro esquema (Fig. 6) é possível observar toda a rede nervosa e a disposição de papilas ao longo do corpo cercariano.



Figura 5: Microscopia de luz DIC de cercária de *Echinostoma paraensei* impregnada com nitrato de prata.

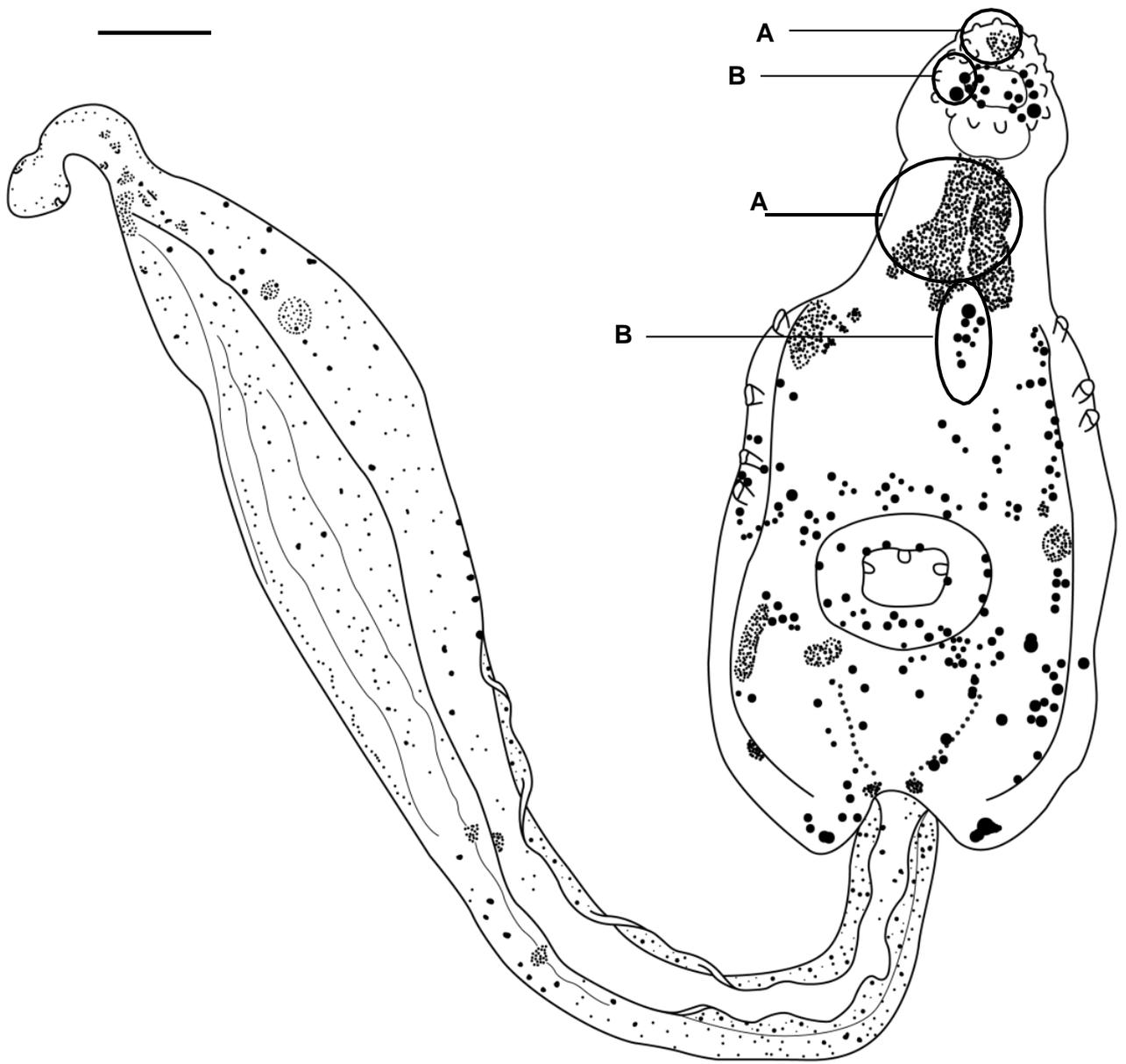


Figura 6: Esquema das estruturas sensoriais argentofílicas de cercárias de *Echinostoma paraensei*. Papilas (A) e a rede nervosa (B), se estendendo até a cauda da cercária. Barra de escala = 5 μ m.

Na Figura 7 é possível observar a presença de um anel nervoso periesofágico e em volta de ambas as ventosas. Isso é compatível com fato dessas estruturas terem a necessidade de reconhecer um tegumento compatível para adesão. A região cefálica apresenta dois tipos possivelmente distintos de terminações nervosas, um aglomerado apical, acompanhando circunferência da ventosa oral e constituindo o anel periesofágico (tipo CI) e dois aglomerados laterais (tipo CII) que se dividem em dez à esquerda e em nove à direita. Esses dois tipos podem ser referentes à duas situações distintas: os receptores ligados à ventosa podem ser utilizados para auxiliar a penetração, atuando juntamente com as papilas demonstradas na Figura 7 (B) como quimiorreceptores, enquanto que os dois conjuntos laterais do tipo CII podem ser mais voltados para a percepção mecânica, podendo estar envolvidos com o processo de adesão e penetração da cercária. Já o anel periesofágico pode estar relacionado à coordenação do movimento de peristaltismo que será realizado pelo órgão quando o adulto for se alimentar.

As papilas demonstradas na Figura 7B estão localizadas formando um círculo em volta da ventosa oral, no detalhe (Fig.7B1) é possível visualizar essas estruturas como papilas uniciliadas, através de MEV.

Na Figura 7C, está demonstrada em I uma rede nervosa envolvendo a ventosa ventral. A mesma distribuição circular e, por estar localizada também em uma ventosa, podemos inferir que essas estruturas sejam do mesmo tipo que aquelas encontradas na ventosa oral em CI², podendo ser estruturas responsáveis pela contração da ventosa para a aderência no hospedeiro. Na parte interna da ventosa, (CIII) estão localizadas três papilas, como papilas não ciliadas de forma convexa. Estas estruturas podem ser responsáveis pelo reconhecimento de adesão no hospedeiro.

Para as estruturas encontradas em II; semelhantes a pequenas ventosas distribuídas lateralmente no corpo da cercária em dois conjuntos, em número de três à esquerda e de quatro à direita.

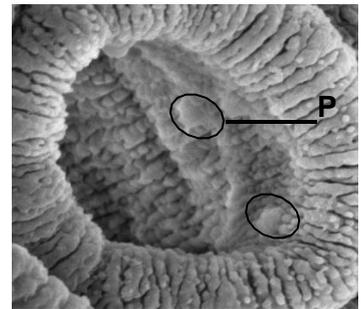
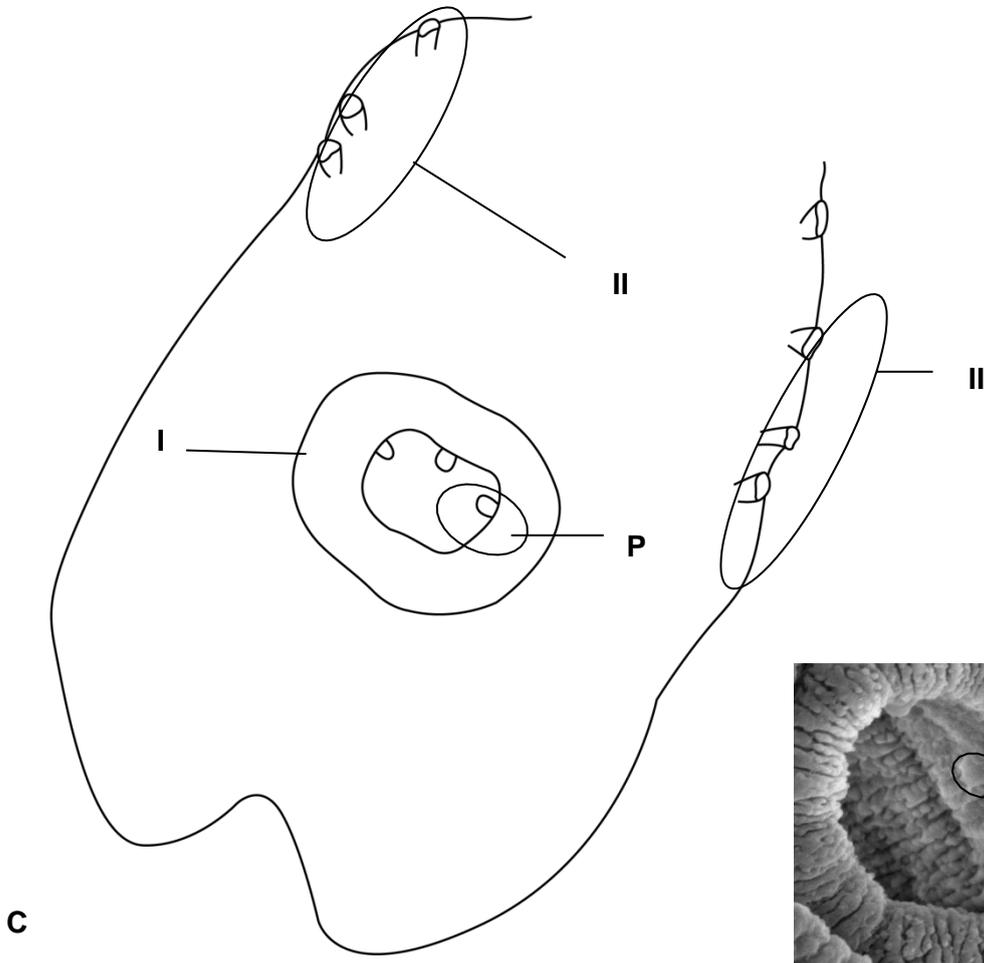
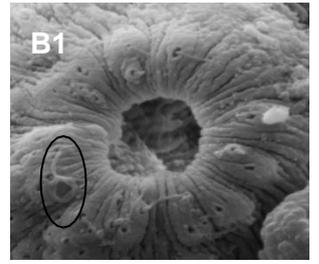
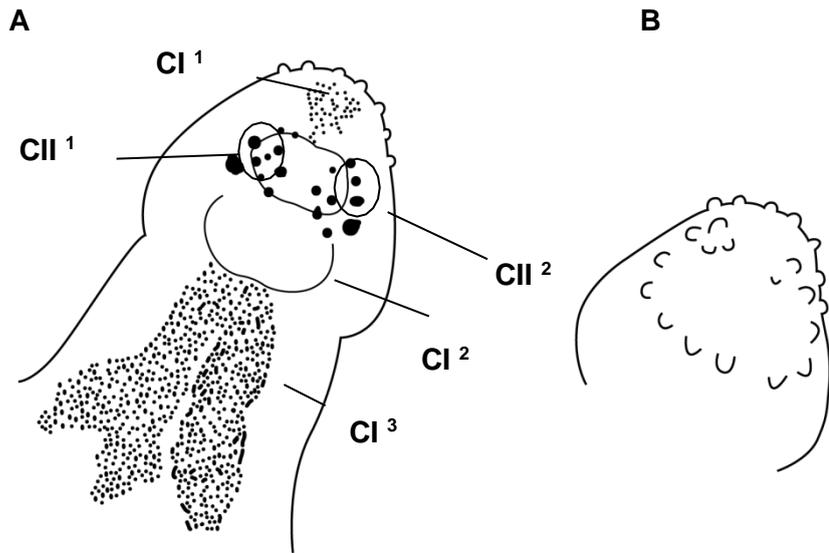


Figura 7: Esquema e microscopia eletrônica de varredura da região cefálica e do corpo da cercária de *Echinostoma paraensei*. Região cefálica com sua rede nervosa (A) e a distribuição das papilas (B) e em B1 - imagem de microscopia eletrônica de varredura das papilas uniciliadas na ventosa oral. (C) rede nervosa ao redor da ventosa ventral (I) e papilas laterais (II). (C1), Microscopia eletrônica de varredura evidenciando papilas (P) não ciliadas na parte interna da ventosa ventral.

Na Figura 8 é possível ver, pelo aumento, toda a distribuição de terminações sensoriais do corpo da cercária, algumas estruturas estão aglomeradas em localizações distintas no corpo, como demonstrado em I. Outras estão distribuídas de maneira mais uniforme, formando grânulos maiores (II). É possível que estas estruturas acompanhem o sistema excretor e possam atuar como mecanorreceptores. Em A e B, na mesma figura, estão visíveis dois tipos de cordões nervosos. Estes podem ser responsáveis pela inervação principal, coordenando diferentes tipos de estímulos, podendo ser estes motores ou responsivos à pressão.

Já na Figura 9, é possível observar o mesmo padrão para estas estruturas, porém na cauda. Duas comissuras principais (P) acompanham os *fin folds* e estruturas argentofílicas dispersas (AD) ao longo da cauda. A finalidade dessas estruturas pode ser também a coordenação do movimento e de orientação para o batimento.

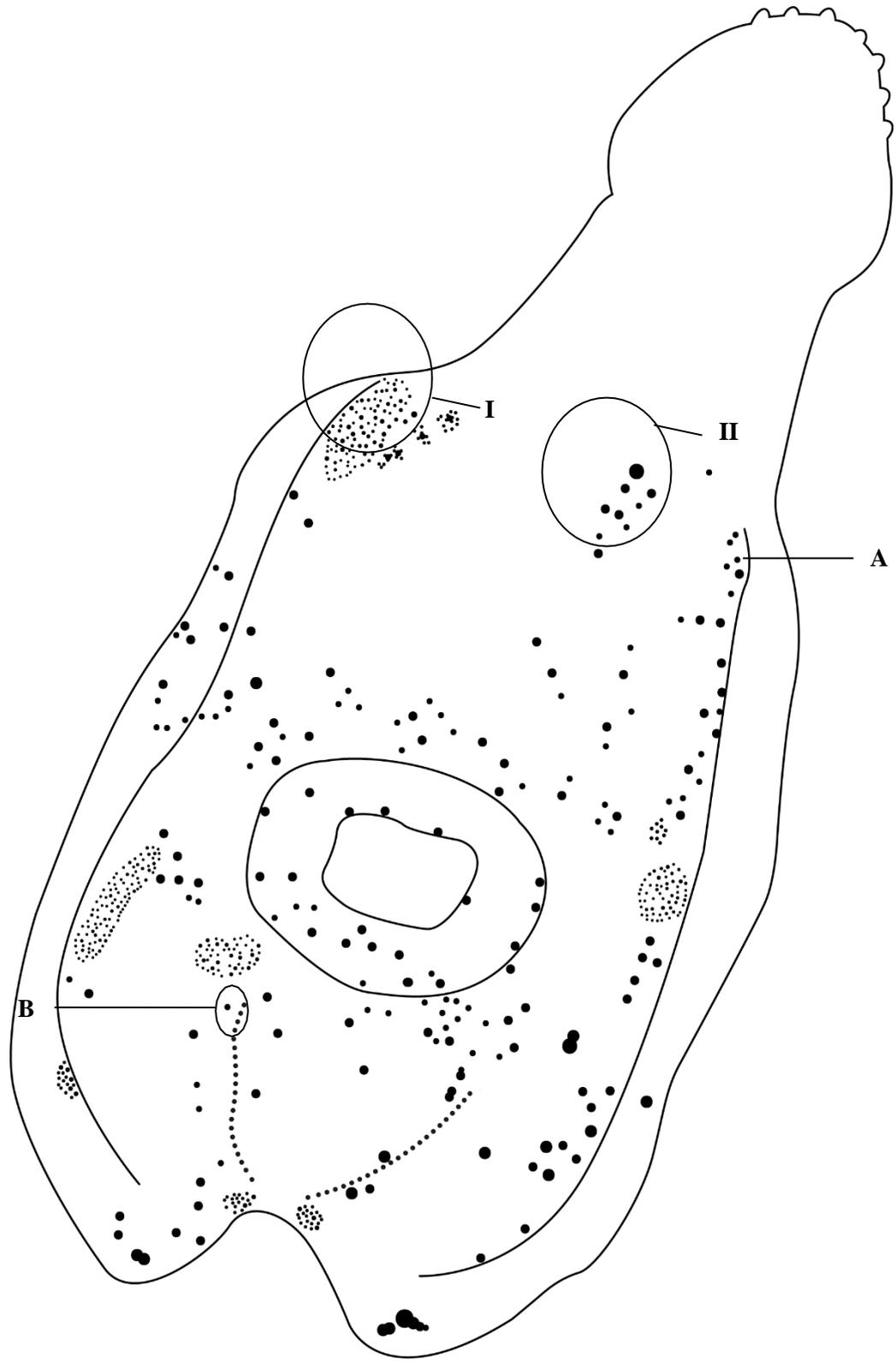


Figura 8: Esquema do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei*. Estruturas argentofílicas formando uma rede interligada com dois cordões principais (um deles indicado por A) e espalhados irregularmente (B).

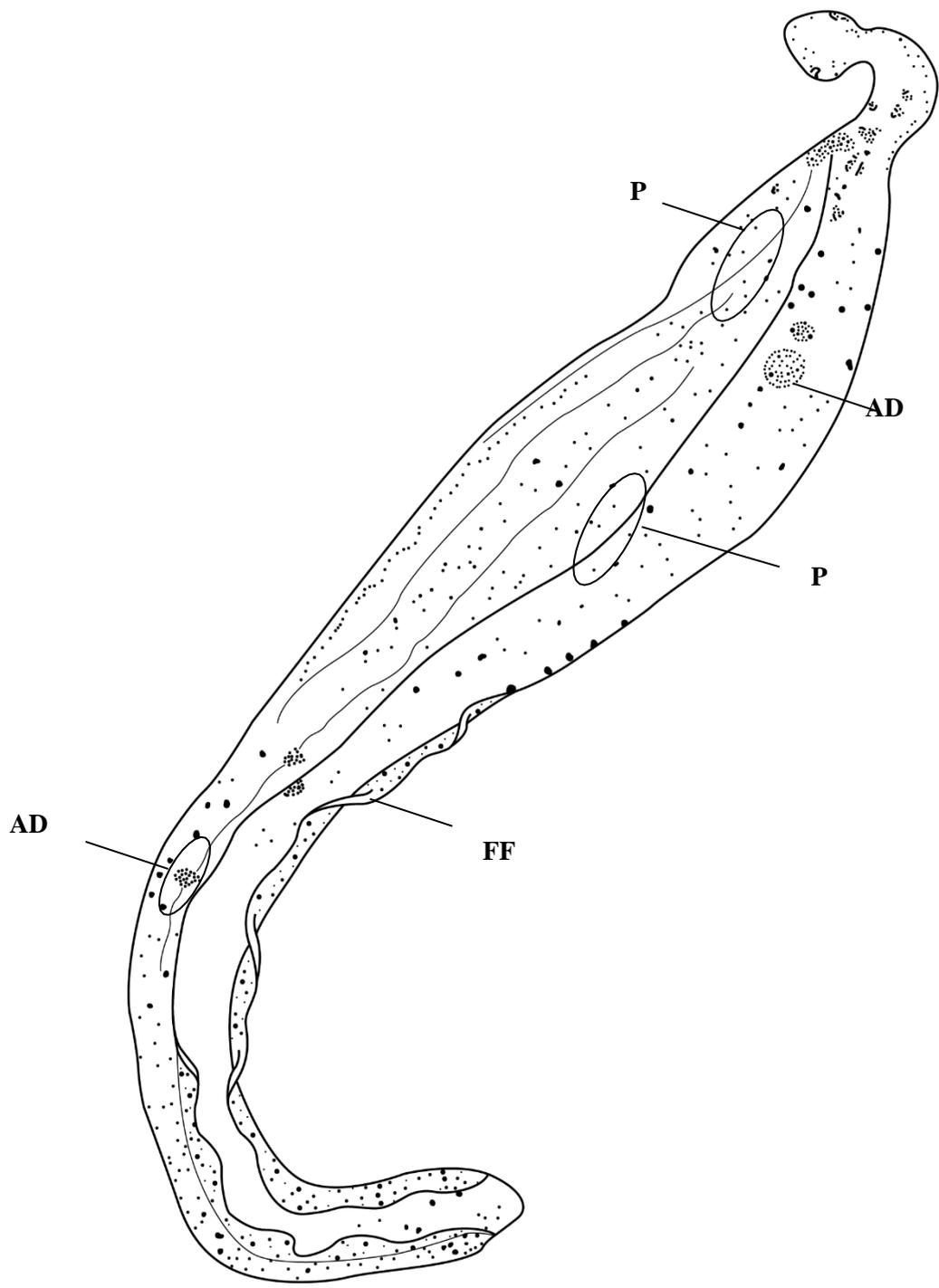


Figura 9: Esquema da cauda de cercária de *Echinostoma paraensei*. Comissuras principais (**P**), sendo que estas parecem acompanhar os *fin-folds* (**FF**) até o final da cauda e estruturas argentofílicas dispersas (**AD**).

A presença desta estrutura nervosa em forma de cordão ao longo de toda a região lateral do corpo da cercaria parece estar relacionada com a atividade contrátil, uma vez que em estudos prévios (PINHEIRO, 2003) todas as imagens das cercárias, obtidas por MEV, mostram larvas em estado contraído, com a região do corpo formando uma concavidade, o que, provavelmente se deu pela contração das musculaturas longitudinal e circular do corpo da larva de forma coordenada resultando nesta posição côncava, o que permite sua melhor adesão aos diferentes substratos e ao corpo do próximo hospedeiro (HI2°), para dar início à sua penetração e prosseguimento do desenvolvimento em seu ciclo de vida. Este formato também pode ser observado nos dados de MEV do presente estudo, corroborando o observado por Pinheiro (2003).

De acordo com Dorsey *et al.*, (2002), em seus estudos sobre as cercárias de *S. mansoni*, esta fase evolutiva é especializada em função locomotora para encontro e penetração no hospedeiro intermediário, sendo assim, é possível supor que as estruturas argentofílicas internas encontradas na cauda da cercária de *E. paraensei* sejam terminações nervosas que inervam toda a extensão da região da cauda, função motora, para coordenar os movimentos da cauda e, conseqüentemente, os movimentos natatórios da cercaria.

Assim, se reunirmos os esquemas 8 e 9, constata-se que as papilas (estruturas sensoriais e superficiais) estão aproximadamente sobrepostas a estes cordões nervosos. Ou seja, as papilas fazem a percepção dos estímulos ambientais externos pela larva e os transmitem para o sistema nervoso, que, ao receber esta informação, dispara a resposta contrátil ao estímulo percebido.

Os resultados encontrados demonstram a presença de dois tipos principais de papilas: as uniciliadas e as sem cílios. As uniciliadas apresentam um cílio longo que emerge de uma região bulbosa. Estruturas semelhantes são descritas no trabalho de Bogéa e Caira (2001). As autoras identificaram através de MEV, papilas uniciliadas em *Bunodera* Railliet, 1896, porém, diferentemente do encontrado neste trabalho, os cílios emergiam de uma bainha tegumentar, e não de um bulbo.

As mesmas autoras relatam a ocorrência de seis a sete tipos básicos de papilas para as cercárias de *Crepidostomum* Braun, 1900 e de *Bunodera* sp., as quais são descritas de acordo com a ausência de colar tegumentar, presença de uma base em forma de domo, um ou dois cílios que podem ser curtos, moderadamente longos ou longos e um colar tegumentar baixo a moderadamente baixo ou alto (BOGÉA & CAIRA, 2001). No presente estudo, podem ser observadas as estruturas uniciliadas com base convexa, e somente as estruturas convexas, sem cílios.

A ultraestrutura das papilas uniciliadas com presença de um cílio moderadamente longo a longo encontradas por Bogéa & Caira, 2001 foram semelhantes às encontradas para as cercárias de *E. revolutum*, o que pode indicar que exercem a mesma função que as encontradas no presente estudo, apesar da diferença na base (colar tegumentar para *E. revolutum* e base convexa para *E. paraensei*). É presumido que essas estruturas tenham função de mecanorreceptores, embora a hipótese de uma dupla função, de mecano e quimiorreceptores, não possa ser excluída (ZDARSKA, 1995; NIEWIADOMSKA & CZUBAJ, 1996; BOGÉA & CAIRA, 2001).

Estudos sobre a quimiotaxia das larvas são importantes, pois auxiliam na elucidação de aspectos da relação parasito-hospedeiro. Barbosa (1995), fala sobre a existência de uma atração dos miracídeos pelo molusco, sendo esta resultante da percepção, pela larva, de substâncias eliminadas pelo molusco na água, as quais seriam percebidas pela larva através de suas terminações nervosas presentes na região cefálica. Chernin (1970), realizou um estudo sobre a resposta de *S. mansoni* e de outros trematódeos a substâncias emitidas por moluscos. Os resultados demonstraram que não há estímulos por parte de outros invertebrados

(oligoquetas, por exemplo), porém, entre os moluscos, as diversas linhagens de *B. glabrata* liberaram substâncias que estimularam os miracídios e, quanto a outras espécies de moluscos, também foi detectada resposta a estímulos liberados pelos mesmos, o que sugere uma não especificidade quanto à espécie de caramujo.

Magalhães *et al.* (1991), realizaram um trabalho sobre a atração miraxonal exercida por *B. straminea*, *L. columela* e *Physa* sp sobre miracídios de *S. mansoni*. Os autores testaram a água onde os moluscos ficaram acondicionados (SCW - do inglês “*snail conditioned water*”), onde foi observada a atração miraxonal de diversas substâncias contidas na SCW e na hemolinfa dos moluscos. Foi constatada também a ocorrência de moluscos que não são vetores, mas que exercem atração sobre os miracídios, sendo um fator que pode alterar o ciclo, pois o miracídio penetraria em um hospedeiro no qual não ocorre o desenvolvimento. Um resultado curioso deste estudo foi a presença de um único exemplar de *B. straminea* que exerceu efeito repulsivo sobre os miracídios.

Ainda nesse sentido, os estudos de Théron *et al.* (1998), verificaram a possibilidade de escolha dos hospedeiros pelo seu tamanho por larvas de trematódeos. Os resultados demonstraram que *S. mansoni* quando apresentados a moluscos de *B. glabrata* de diferentes tamanhos e, conseqüentemente, em estágios evolutivos diferentes, infectaram preferencialmente moluscos na fase de maturação sexual (chamados de sub-adultos no estudo). Haberl *et al.* 1999, verificaram que miracídios e cercárias de *E. caproni* utilizam diferentes sinais para localizar as mesmas espécies de hospedeiros.

Importante ressaltar que entre indivíduos da mesma espécie, mas que habitam regiões diferentes pode haver diferenças na quimiotaxia. Tal fato ocorreu nos estudos de Dimitrov *et al.* (1996), quando realizou estudos comparativos entre cercária de *F. hepatica*, coletadas na Espanha, as quais diferiram das encontradas na Bulgária, pela presença de papilas dorsolaterais.

A idade também pode ser responsável por alterações na quimiotaxia. As cercárias possuem curto período de vida, podendo apresentar degeneração das estruturas, principalmente da cauda, a qual pode ser perdida. Platt & Dowd (2012) realizaram um trabalho sobre a relação entre a fototaxia de cercária de *E. caproni* e a idade, e foi observado que com o passar do tempo, as cercárias amadurecidas desenvolvem preferência pela luz, ou aversão à luz. Isto pode ser devido à degeneração apresentada pelas estruturas como ficou demonstrado pela presença de núcleos apoptóticos evidenciados nas imagens obtidas através de MEV no presente estudo.

5.2 Descrição de estruturas sensoriais através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em cercárias de *Echinostoma paraensei*

As cercárias apresentam corpo alongado com estriações ao longo de toda a circunferência, que provavelmente acompanham o sentido da musculatura. O corpo da cercária de *E. paraensei* apresenta um colar de espinhos bem desenvolvido e em destaque, que circunda parcialmente a ventosa oral, como indicado na Figura 3. Esta ventosa não é destacada do corpo como a ventral, que é protubeante. A cauda é longa e afina no final.

A região perioral apresenta uma sequência de papilas que formam um círculo ao redor dessa região (Fig. 10). A papila emerge de um poro situado em uma protuberância bulbosa (Fig. 10A). Essas papilas são uniciliadas e também estão presentes no colar, circulando o mesmo e completando um círculo na região ventral. É possível observar mais dessas papilas distribuídas no tegumento da região ventral e dorsal; elas diminuem em quantidade ao longo do corpo da cercária até desaparecerem completamente na região do acetábulo. A posição e a estrutura dessas papilas sugerem uma função sensorial.

A bainha tegumentar que envolve a base do espinho provavelmente está relacionada com a retração dos espinhos. A Figura 11 mostra um espinho parcialmente exposto, não mostrando a bainha e um outro espinho completamente retraído. Maldonado Jr. *et al.* (2001) também descreveram uma protusão ao redor do espinho do verme adulto. Essa característica pode representar uma maneira de prevenir a perda de espinhos, considerando que a protração dos mesmos pode protegê-los contra o atrito em superfícies irregulares. Também pode protegê-los da correnteza dos fluidos no intestino do hospedeiro.

Kanev *et al.* (2009) observaram que a determinação incorreta do número de espinhos do colar em espécimes de echinostomatidae podem ocorrer como consequência de espinhos retraídos. “Estes espinhos retraem-se para dentro de ‘bolsos’ no tegumento do colar e não podem ser observados por microscopia de luz, e alguns podem ser parcialmente vistos através de MEV, como no presente estudo.

Hong *et al.* (1996) utilizaram MEV para estudar a cercária de *Neodiplostomum seoulense* (Seo, Rim & Lee, 1964) e descreveram espinhos tegumentares curtos com bases largas, sendo mais concentrados anteriormente e tornando-se esparsos posteriormente e nas margens laterais do corpo. Essa descrição é similar à das estruturas descritas no presente trabalho. Figura 11B mostra espinhos distribuídos ao longo da região ventro-lateral, terminando na região do acetábulo. Esses espinhos são diferentes dos encontrados na região do colar peristômico, como mostrado em detalhe, não apresentam a base bulbosa e parecem emergir diretamente do tegumento.



Figura 10: Microscopia Eletrônica de Varredura da região anterior de cercárias de *Echinostoma paraensei*. A- Colar cefálico (CC) semicirculando a região da ventosa oral e papilas (P) circundando a ventosa oral. B- Colar de espinhos semicirculando a ventosa oral e ao fundo, a ventosa ventral (VV).

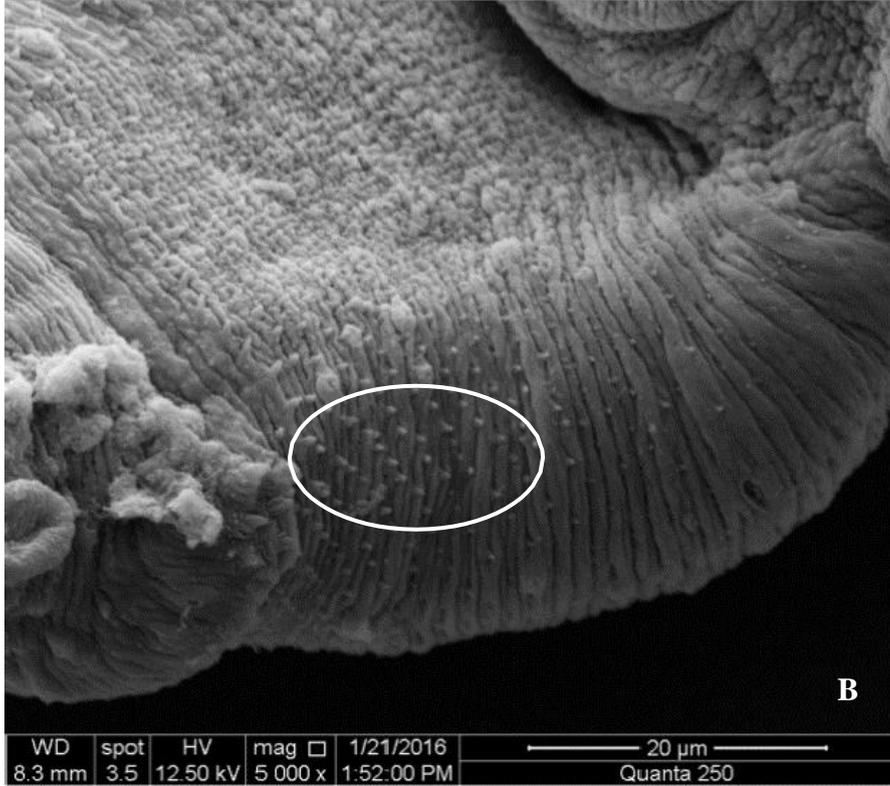
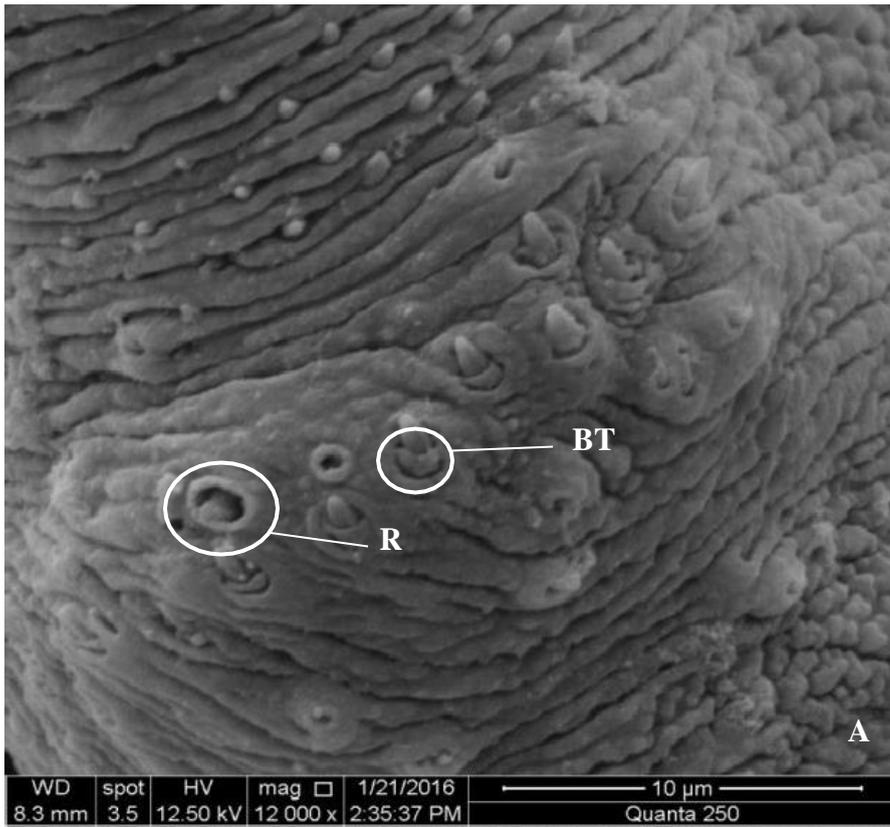


Figura 11: Microscopia Eletrônica de Varredura de *Echinostoma paraensei* evidenciando o colar de espinhos e espinhos tegumentares. A- Bainha tegumentar (BT) envolvendo a base dos espinhos e espinho parcialmente retraído (R). B- Espinhos tegumentares.

As papilas da região oral (Fig. 12) apresentam uma base bulbosa da qual emergem longos cílios. Alguns estudos descreveram diferentes tipos de papilas em trematódeos. Bogéa e Caira (2001) descreveram diferentes tipos de papilas em cercárias de *Allopodocotyle*, sendo algumas papilas ciliadas, mas diferentes das observadas no presente estudo. Já nos estudos realizados por Czubaj e Niewiadomska (1996), a descrição de papilas uniciliadas (tipo IV) foi a que mais se assemelhou à estrutura observada em *E. paraensei*.

Internamente, no acetábulo, pode ser observado um arranjo de papilas como projeções bulbosas, cercando a parte interna da ventosa, como demonstrado na Figura 13. Essas papilas não possuem cílios, mas uma pequena projeção arredondada. A diferença entre as papilas dessas regiões pode estar relacionada às funções que elas desempenham: na região anterior, elas possuem função sensorial, pois são utilizadas para explorar o ambiente, enquanto que na região acetabular, sua função pode ser associada ao reconhecimento e fixação, e a parte frontal deve estar mais envolvida com a percepção e orientação para o parasito se guiar até o hospedeiro intermediário.

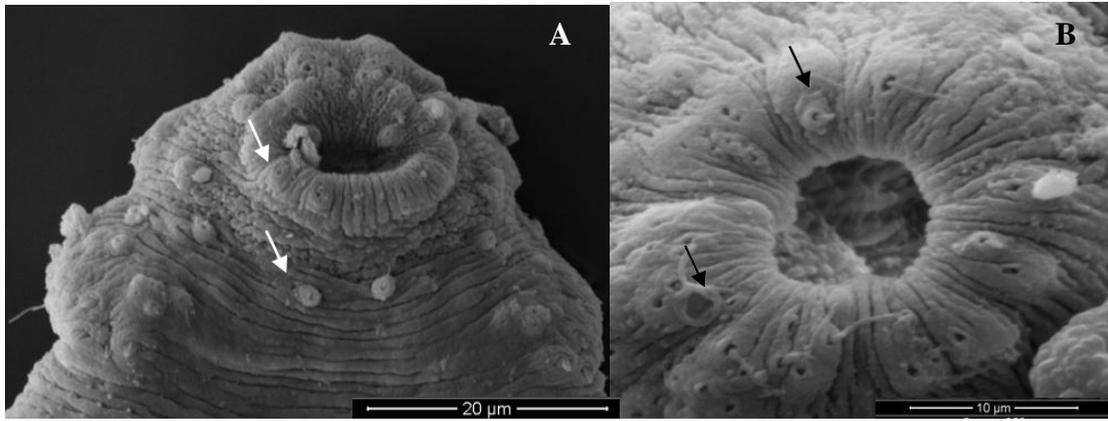


Figura 12: Microscopia Eletrônica de Varredura de cercária de *Echinostoma paraensei*.
A- Papilas uniciliadas acompanhando a circunferência da ventosa oral e região abaixo da ventosa. B- Ventosa oral com papilas uniciliadas.

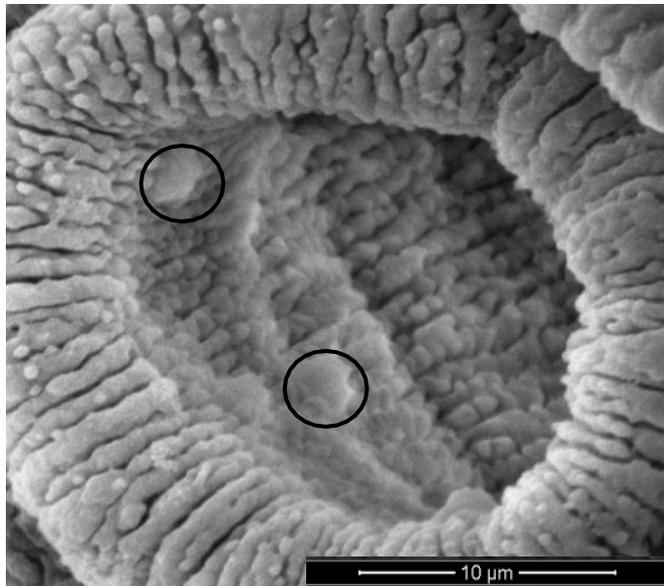


Figura 13: Microscopia Eletônica de Varredura de cercária de *Echinostoma paraensei*.
Papilas bulbosas na parte interna da ventosa ventral.

Fried e Fujino (1987) também estudaram as papilas tegumentares das cercárias de *E. revolutum*. As papilas mais abundantes foram uniciliadas arranjadas bilateralmente no corpo e cauda. A distribuição dessas papilas foi similar à descrita em outras cercárias de equinostomatídeos com colar de 37 espinhos, e a MEV revelou a presença de papilas multiciliadas. Apesar de pertencer ao mesmo grupo, *E. paraensei* mostrou-se diferente, não apresentando papilas na cauda nem papilas multiciliadas.

Utilizando microscopia eletrônica, Zdarska *et al.* (1987) observaram cercárias livres natantes de *E. revolutum* com dois pares de terminais sensoriais multiciliados. Esse tipo de receptor consiste em um feixe de pequenos e cônicos cílios, envolvidos por um colar formando por uma evaginação circular do tegumento em formato de taça. A estrutura se assemelha às observadas em *E. paraensei*, mas com números diferentes de cílios. As diferenças no número de cílios pode ser devido às diferenças nos hospedeiros intermediários podem estar associados à diferenças de habitats.

Para *E. paraensei*, foi demonstrado o padrão de distribuição dos *fin folds* na Figura 7, as dobras teciduais muito utilizadas como características taxonômicas. Na Figura 7 é possível observar dois *fin folds* dorsais, dois ventrais e dois laterais. Também é possível observar uma prega lateral ao final da cauda, possivelmente como consequência de contração muscular durante o processo de fixação. Os *fin folds* apresentam um padrão de estriação longitudinal, diferente do padrão observado para o corpo.

A presença de uma dobra tegumentar na cauda de *Echinostoma revolutum* também foi observada por Lie & Basch (1967), sendo utilizada como critério taxonômico na descrição desta espécie. De acordo com Kanev *et al.* (1993), as cercárias de *E. revolutum* foram descritas com diferentes números e arranjos dos *fin folds*, sendo encontradas descrições de *fin folds* ausentes na superfície da cauda; um *fin fold* pequeno e dorsal; dois *fin folds* longos cobrindo a ponta da cauda, quatro *fin folds* variando em tamanho e posição e sete *fin folds*. Os autores descobriram que as espécies do Grupo *revolutum* apresentam sete *fin folds* independentes na cauda. Estes dados também especulam que a presença de um grande *fin fold* dorsal esteja associado ao nado e, um *fin fold* pequeno, localizado latero-ventralmente e uma pequena papila semelhante a uma dobra tecidual são provavelmente sensoriais.

Há poucos estudos sobre a fase de cercária de *E. paraensei*, assim como descrições de suas estruturas sensoriais externas. Este trabalho descreve essas estruturas pela primeira vez, complementando os estudos sobre parasitos da família Echinostomatidae.

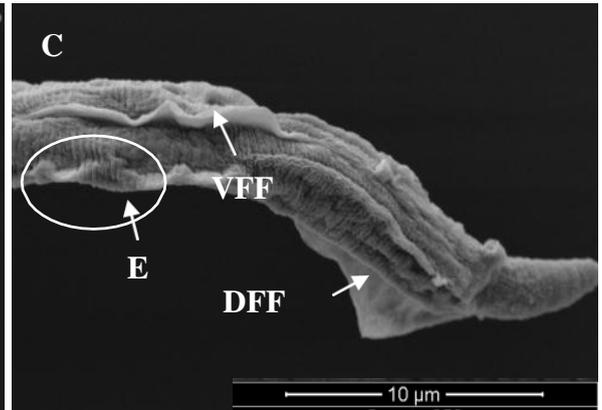
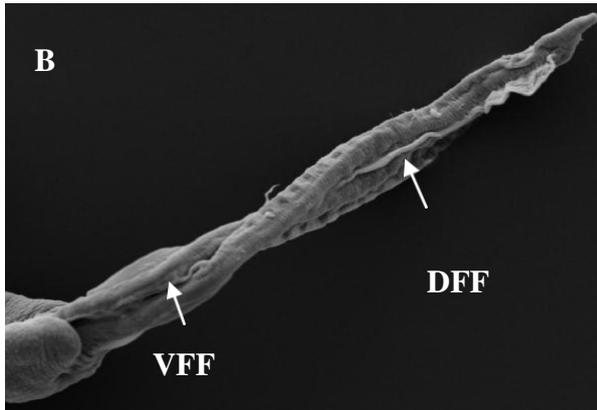
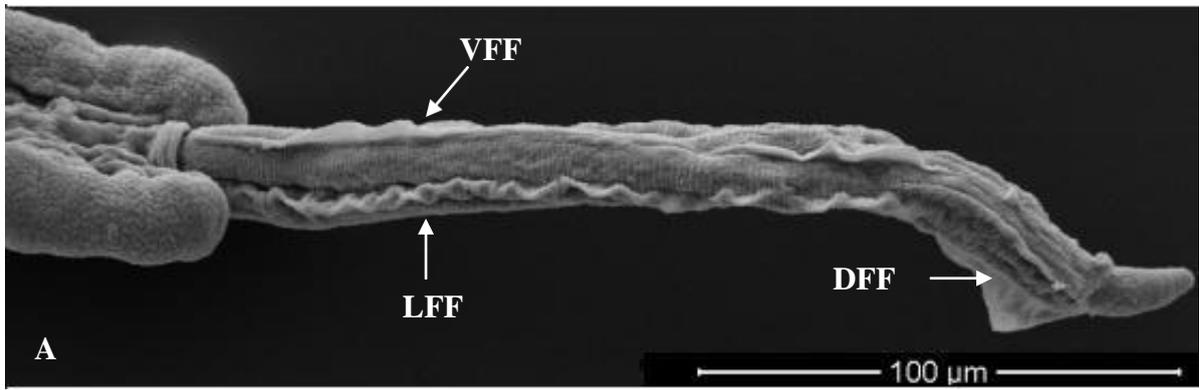


Figura 14. Microscopia Eletrônica de Varredura da cauda de cercárias de *Echinostoma paraensei* detalhando os seis *fin fold*. A- *fin folds* ventrais (VFF), os *fin folds* laterais (LFF), e os *fin folds* dorsais (DFF); B- *fin folds* ventral e dorsal, observa-se nesta imagem que o *fin fold* dorsal vai até o final da cauda. C - detalhe das estriações dos *fin folds*.

5.3 Aspectos morfológicos de cercárias de *Echinostoma paraensei* através de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Como descrito em trabalhos anteriores (MATOS, 2018 - no prelo) cercárias de *E. paraensei* apresentam corpo alongado com estriações musculares ao longo de toda a sua circunferência, que acompanha o sentido da musculatura. Também foram descritas dobras tegumentares na porção final da cauda (*fin fold*), sendo o padrão das estriações dessas estruturas (longitudinal) diferente do padrão encontrado no restante do corpo. Na Figura 6, é possível observar o tegumento separando as camadas externa e interna. Logo abaixo desse tegumento há presença de tecido muscular. Na Figura 8 é possível visualizar o *fin fold* e células com perda da organização sincicial e núcleos apoptóticos, indicando degeneração tecidual.

O fato de o *fin fold* ser uma estrutura acessória para o deslocamento em meio aquático que se encontra projetada para fora do corpo, é uma possível explicação para o fato de ser encontrada separada do resto do corpo por um tegumento. Isso explica a diferença no sentido das estrias, pois os *fin folds* são utilizados para impulsionar a cercária na água, enquanto a musculatura corporal deve contrair-se de forma a auxiliar a penetração cercarial no corpo dos hospedeiros. Kanev *et al.* (1993) redescreveram a morfologia dos *fin folds* de *E. revolutum* visto representam um critério de valor taxonômico, sendo importante sua descrição correta com o auxílio de microscopia.

A presença de núcleos apoptóticos (Fig. 15), condiz com fato de a estrutura da cauda e *fin fold* serem perdidas quando da penetração no hospedeiro definitivo. Uma vez a cercária perde sua cauda quando da penetração no segundo hospedeiro intermediário, não sendo mais necessária à locomoção para impulsionar o parasito. Tal fato é corroborado pelas nossas observações na prática laboratorial, na qual observamos a conexão extremamente lábil da cauda ao corpo da cercaria, com a perda da cauda por muitos espécimes durante a manipulação dos mesmos nos diferentes processamentos para as análises por microscopias.

A presença de células germinativas em proximidade das inclusões lipídicas (Figura 9) é também coerente com a necessidade de reserva energética por estas células para a sua manutenção durante a fase de metacercária, constituindo as formas encistadas contendo a forma infectante para o hospedeiro definitivo e, portanto, representando um agente de dispersão temporal do parasito.

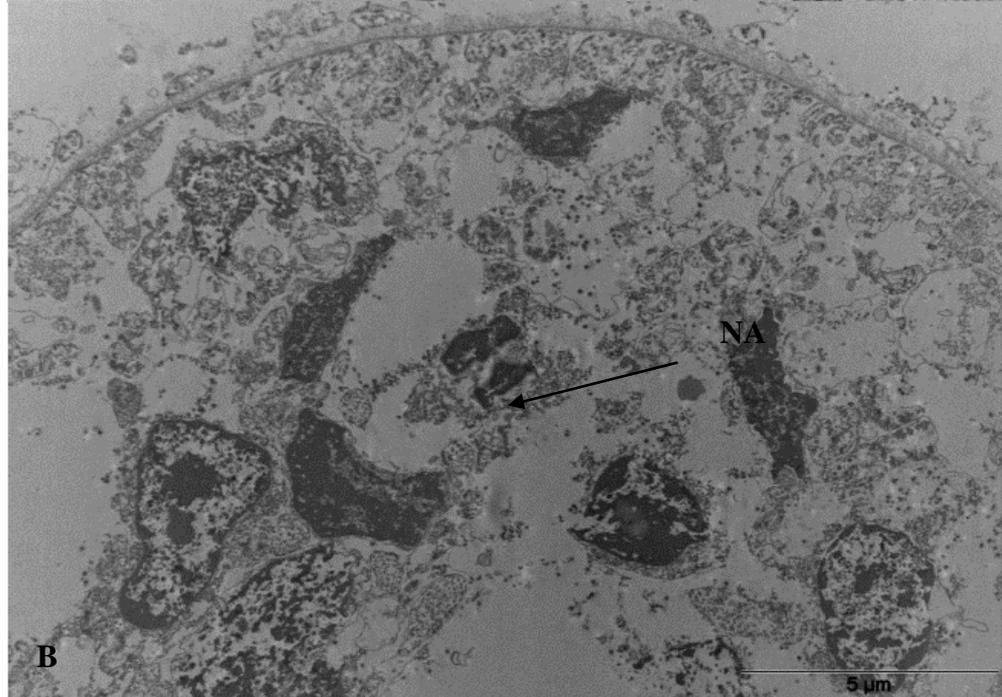
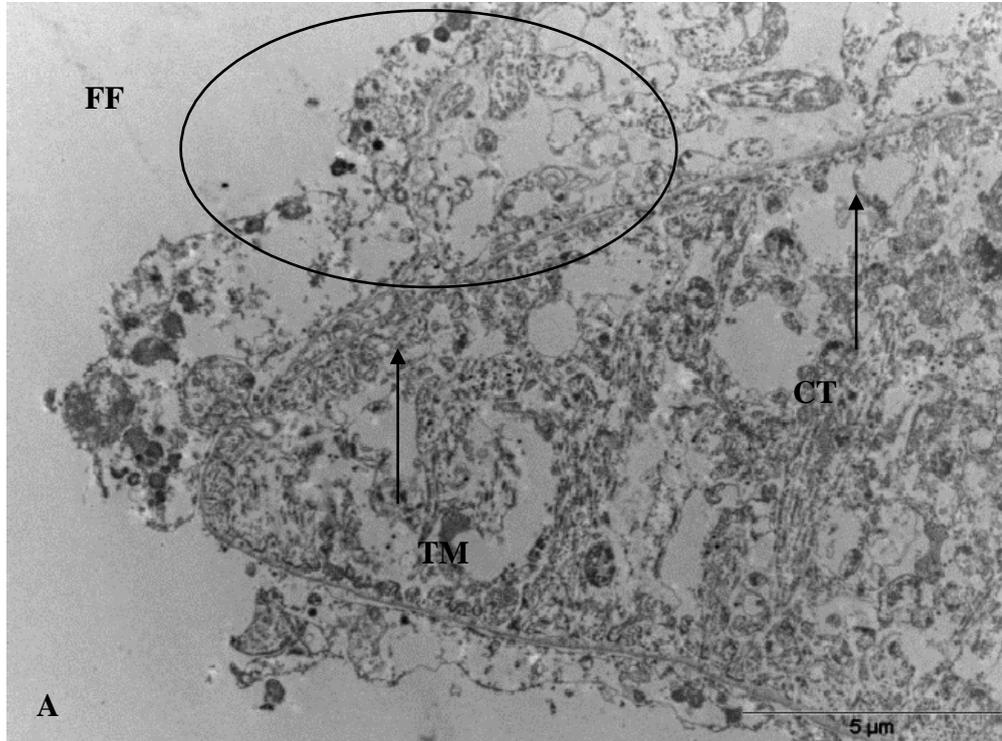


Figura 15. Microscopia Eletrônica de Transmissão da porção final do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei*. A - *Fin fold* (FF) separado do restante da musculatura do corpo por uma fina capa tegumentar (CT), tecido muscular (TM). B - Tegumento já com perda da formação sincicial e a presença de núcleos apoptóticos (NA).

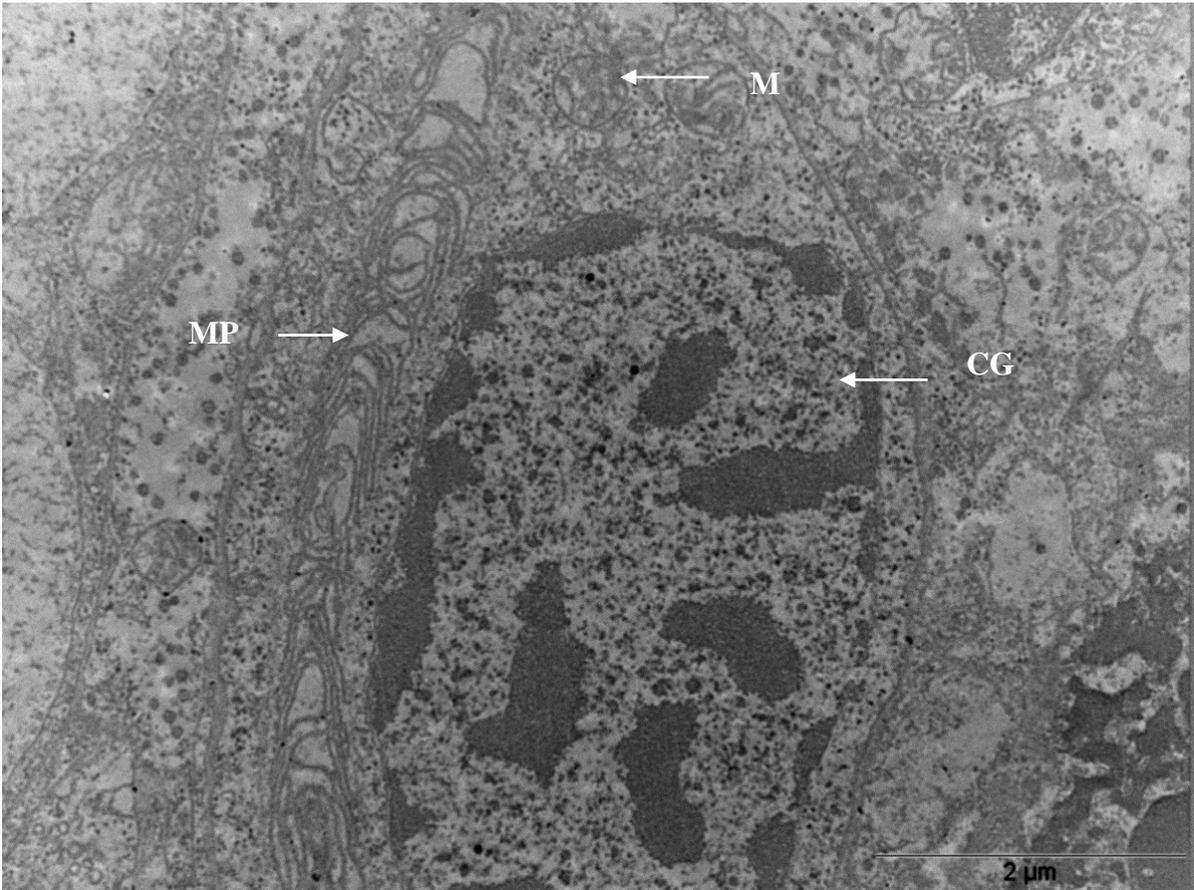


Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei* evidenciando depósito de membranas (MP). Presença de depósitos de membrana sendo formados (MP) próximos à célula germinativa (CG). Acima da célula germinativa são visíveis perfis mitocondriais (M).

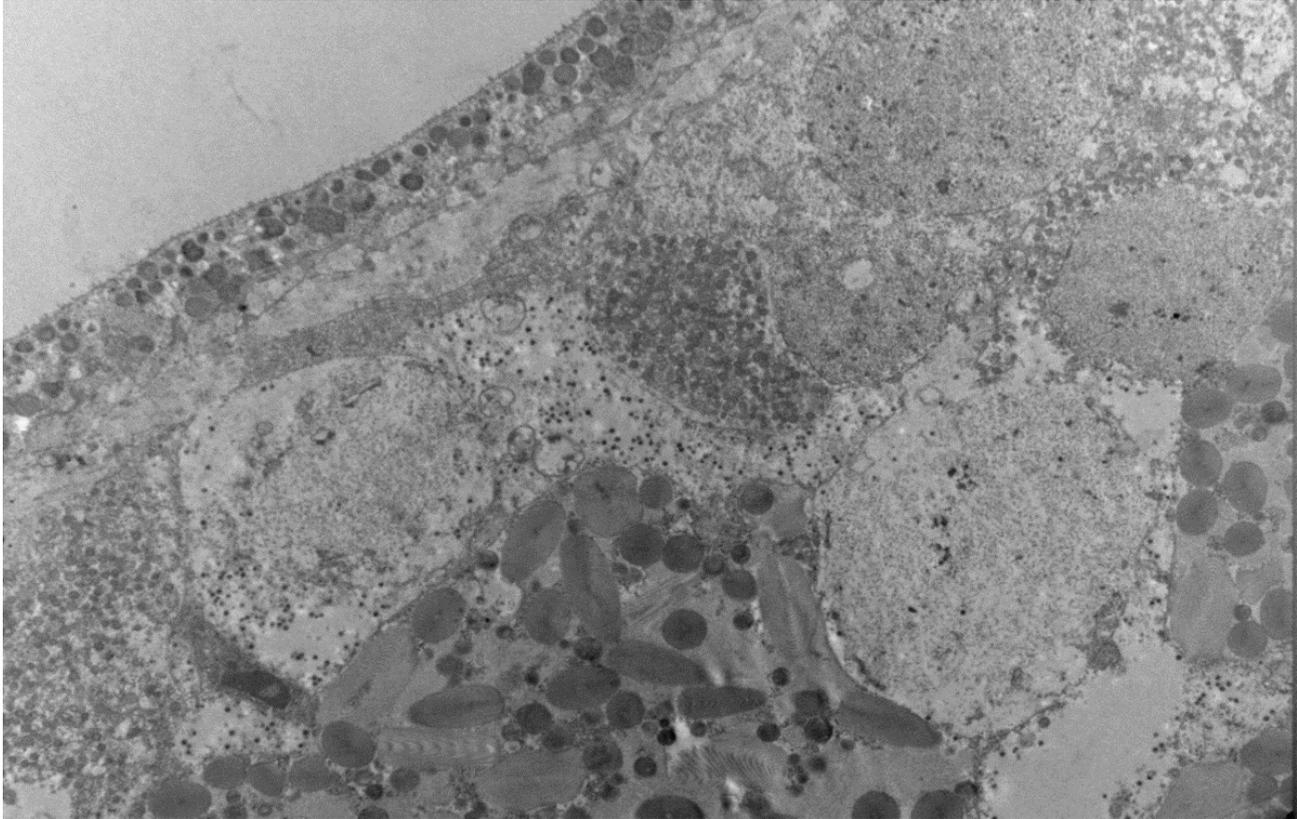


Figura 17: Microscopia Eletrônica de Transmissão de corte do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei*. Presença de gotículas de gordura (IL) e células germinativas (CG).

Na figura 18 é possível observar, em um trecho de corte ultrafino da região do corpo da cercária, grânulos mais eletrondensos, próximos às células germinativas. Tal fato é coerente, pois as gorduras constituem um importante estoque energético, pois permite o armazenamento de maior quantidade de substratos para a obtenção de energia em um menor espaço, uma vez que estes são armazenados em sua forma quase completamente desidratada com pouco ou quase nenhum acúmulo de água. Tal fato, associado à presença de células germinativas pode ser um indicativo da alocação destas reservas lipídicas para o posterior consumo por estas células.

Na Figura 19, aparecem novamente os grânulos escuros que possivelmente são glicogênio próximas a diferentes tipos celulares como células neuronais e germinativas. Ambas necessitam de fonte de energia para sua função, porém, de acordo com Cooper & Van Gundy (1970), larvas de helmintos aquáticos ou que estejam sujeitos a baixas tensões de oxigênio acumulam maior quantidade de glicogênio do que de lipídios. Outra situação relevante é o fato de fases que não se alimentam necessitarem de maior reserva energética endógena. A presença de lipídios nas cercárias de *E. paraensei* também pode ser consequência da necessidade de formação de novas membranas plasmáticas para as futuras larvas que irão se desenvolver a partir das células germinativas maduras.

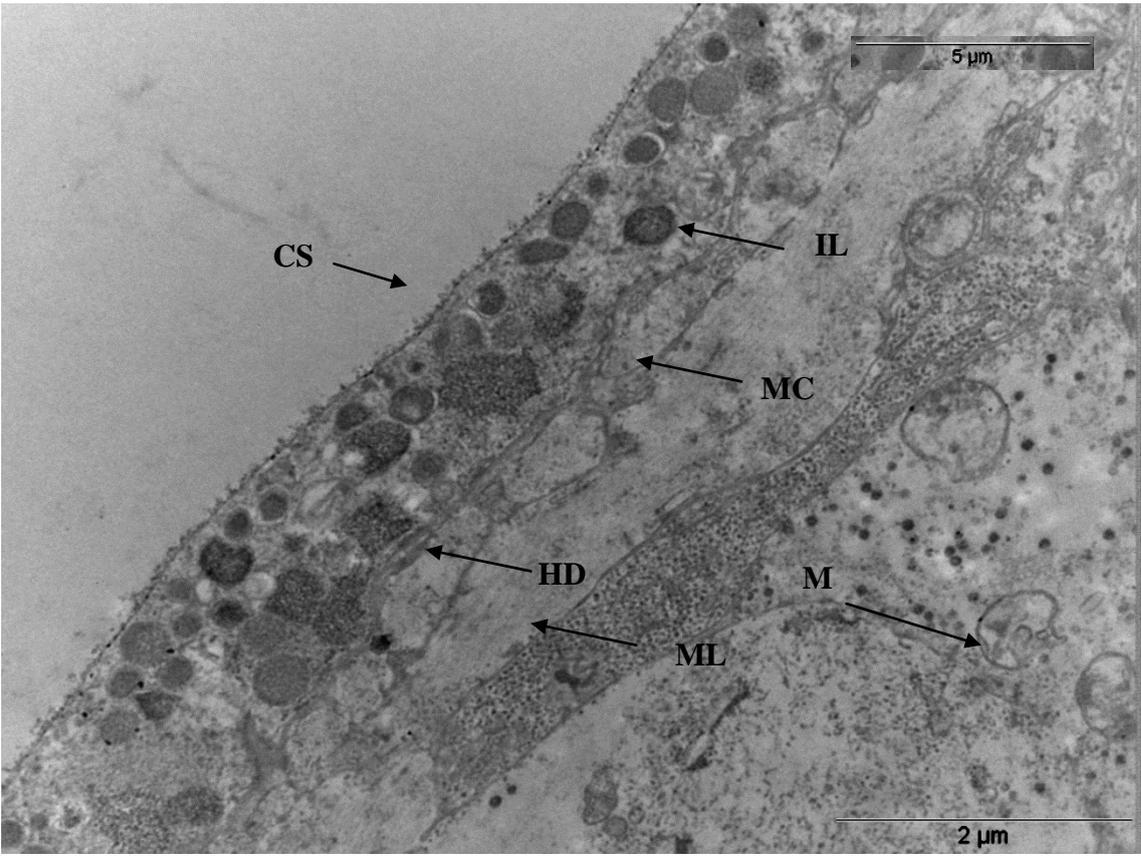


Figura 18: Microscopia Eletrônica de Transmissão, do tegumento de uma cercária de *Echinostoma paraensei* evidenciando as camadas do corpo (musculatura), mitocôndrias e inclusões lipídicas. Na imagem pode ser evidenciada a camada tegumentar externa sincicial (CS), apresentando perfis mitocondriais (M) e inclusões eletrodensas (IL). Abaixo desta, encontramos a lâmina basal e, logo após, as camadas musculares, circular (MC) e longitudinal (ML), respectivamente. É possível observar hemidesmosomos (HD) conectado a camada sincicial com a musculatura circular. Barra de escala = 2µm.

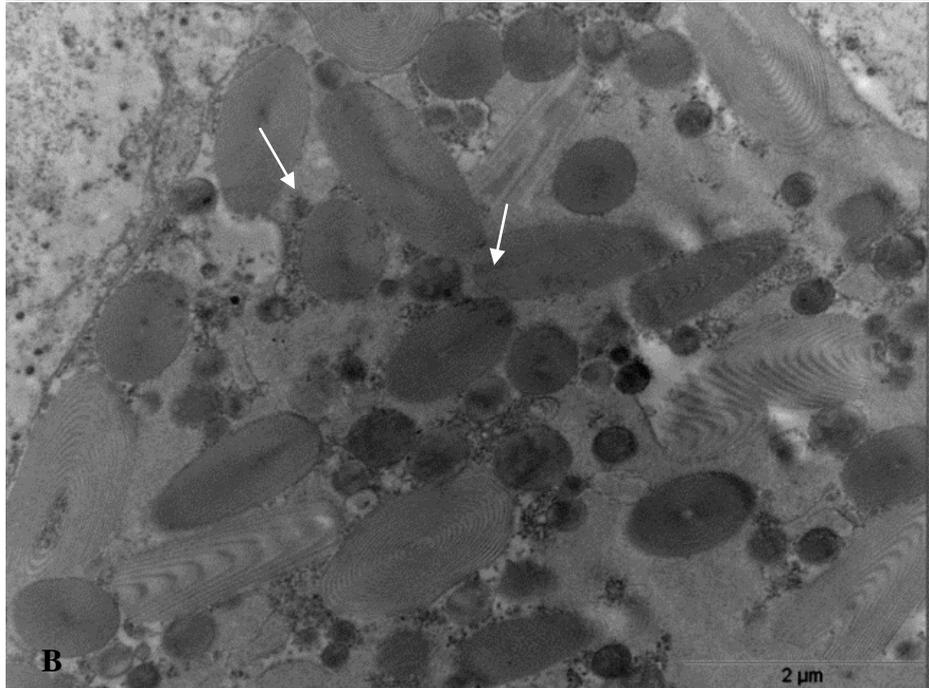
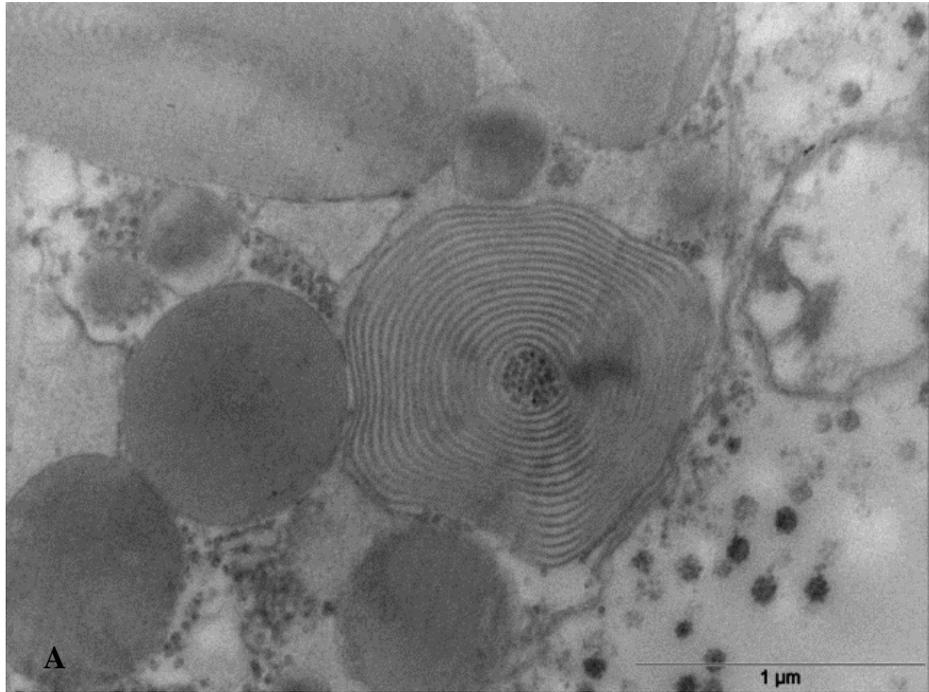


Figura 19: Microscopia Eletrônica de Transmissão do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei* exibindo neurônio e gotículas de gordura. A - Neurônio (NE) em corte transversal evidenciando a bainha de mielina, ladeado por inclusões lipídicas (IL). B - Figura de mielina (FM), (elipses concêntricas) e inclusões lipídicas.

Fried *et al.* (2009) realizaram estudos sobre a histoquímica de lipídeos neutros e glicogênio em cercárias de *E. trivolvis*. Seus resultados demonstraram que a cercária obtém glicogênio principalmente da cauda por até 24 horas após emergirem do hospedeiro. Os autores ainda sugerem a presença de mucopolissacarídeos na porção final dessa estrutura e constataram a presença de lipídeos neutros no sistema excretor.

Testes cromatográficos em várias fases larvais de *E. caproni*, inclusive a de cercária, demonstraram que a fração lipídica mais abundante em todos os estágios foram os esteróis livres. A observação da diminuição dos lipídeos neutros da fase de cercária para a de metacercária encistada não corrobora observações anteriores de que o conteúdo lipídico aumenta nas sucessivas fases de desenvolvimento de trematódeos digenéticos (MARSIT 2000). Os esteróis são uma classe de lipídeos que atuam como componentes da membrana celular, como ocorre intensa produção de membrana tanto da fase de esporocisto para cercária, como de cercária para metacercária, esses lipídeos podem estar sendo alocados para esta função.

A presença de inclusões lipídicas no corpo da cercária, próximo a células germinativas, pode ter relação direta com a utilização dos mesmos para o processo de síntese de membranas plasmáticas das estruturas celulares que constituirão o aparelho reprodutor nas formas adultas. Outro fato é que o estágio subsequente, o de metacercária, tem atividade metabólica extremamente reduzida, portanto, esses lipídeos teriam pouca ou nenhuma função energética. Ainda a localização da cercária, na glândula digestiva, banhada em hemolinfa, permitiria uma absorção de moléculas de carboidratos simples (glicose) e aminoácidos, através de seu tegumento, que tem função absorptiva, porém, essa atividade é bastante reduzida na cercária.

Em *Opisthorchis viverrini* Poirier, 1886 foram observados três tipos de células glandulares, de acordo com suas vesículas, que desembocam na camada sincicial (ADAM *et al.*, 1995). As inclusões secretoras em *E. paraensei* foram denominados por Gonçalves *et al.* (2016) de corpos secretores T1 e T2, os quais são constituídos por glicoconjugados, além de, através de análises estruturais, terem descrito esses corpos como ovoides e bicôncavos para T1 e T2 respectivamente.

O tegumento é a primeira estrutura a se diferenciar no início da formação da cercária. A região da cauda contém menos material granular do que a região do corpo. Em fases de desenvolvimento mais adiantadas, o corpo cercariano apresenta abaixo do tegumento, consecutivamente, uma fina camada de material intersticial seguida de fibras musculares em arranjo circular e, por fim, uma camada muscular longitudinal (MOHAMED, 1992). Essa estratificação está aparente na Figura 20.

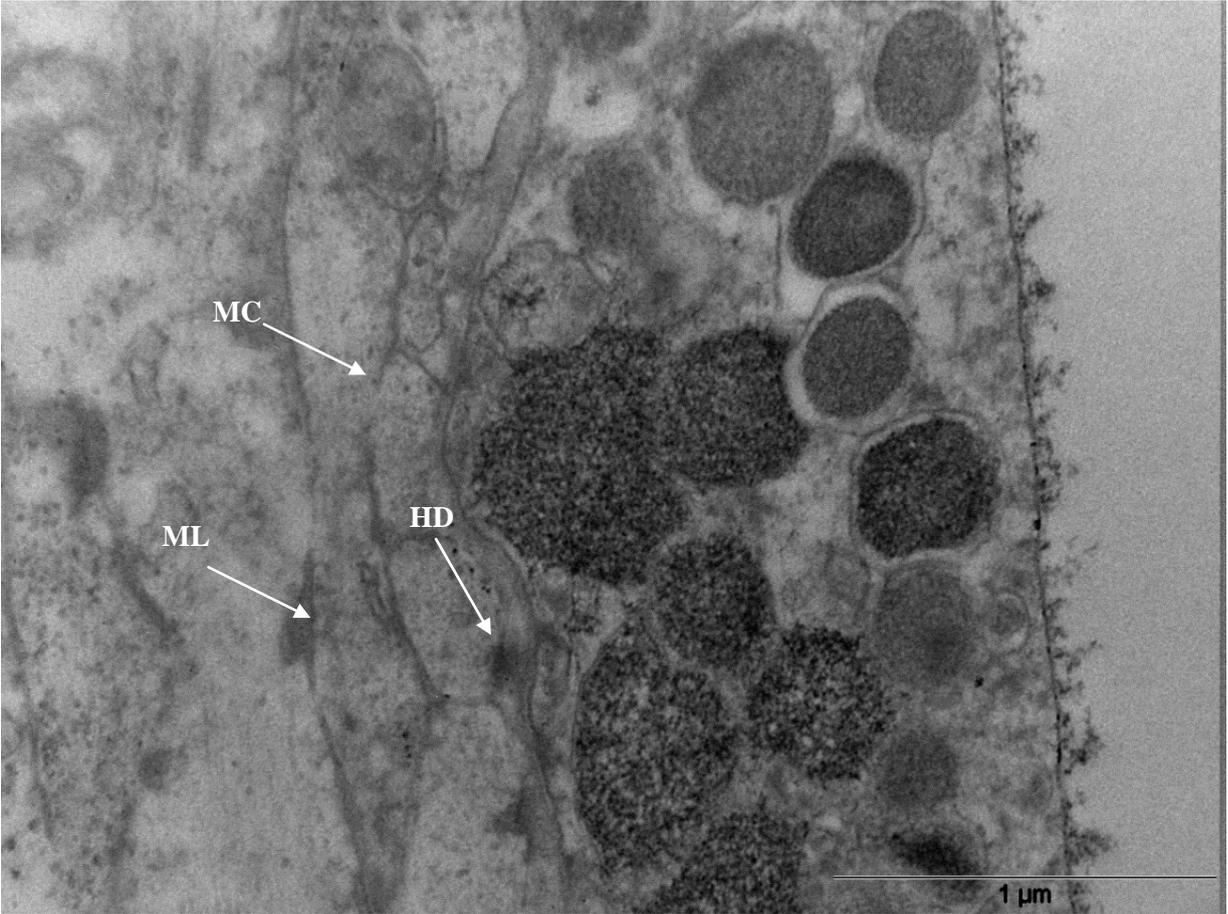


Figura 20: Microscopia Eletrônica de Transmissão do tegumento de cercária de *Echinostoma paraensei*. Camada externa com hemidesmosomos (HD), musculatura longitudinal (ML) e circular (MC).

Zdarska (1995) observou o epitélio de cercárias jovens de *E. revolutum* e ficou demonstrado que este primeiro epitélio persiste por um longo tempo como uma fina camada citoplasmática anucleada preenchida por grandes vacúolos. A estrutura do presente estudo assemelha-se ao epitélio de cercárias maduras, onde esta camada está ausente e observa-se a presença de hemidesmossomos (Fig. 20) ligando o tegumento sincicial externo com a camada muscular subjacente. O autor também descreveu a presença de células glandulares secretoras laterais e ventrais, cujas secreções, ao serem liberadas, coincidem com o desaparecimento da camada sincicial primitiva. Nas cercárias de *E. paraensei* observadas, tal camada sincicial primitiva não foi vista, possivelmente pelo estágio mais amadurecido, ou por não haver esse tipo de formação para esta espécie.

Adnet *et al.* (2013) observaram a camada interna do acetábulo de *E. paraensei* mostrando a organização interna da camada sincicial e das camadas musculares, as quais conferem com as apresentadas nas cercárias observadas no presente estudo.

Foram observadas células-flama (Fig. 21) na cercária de *E. paraensei*. De acordo com o observado por Pinto & Melo (2013), o sistema excretor, em larvas de trematódeos em geral, é composto por vesícula excretora localizada na porção posterior do corpo, com formatos distintos. A partir da vesícula excretora saem canais laterais que terminam em células-flamas, as unidades funcionais do sistema excretor. Há diferenças também quanto à presença de concreções circulares no interior dos canais excretores principais, sendo que as maiorias das larvas possuem canal excretor na região da cauda, terminando em um poro excretor.

Estudos sobre o desenvolvimento de células germinativas em cercárias são limitados. Há diversos estudos sobre o desenvolvimento destas células na mudança de estágio de miracídio para cercária, na formação da metacercária e na fase de rédia (ATAEV *et al.*, 2002; IDRIS & FRIED, 1996; BARBOSA, 1995; KANEV *et al.*, 1995; CORT *et al.*, 1954), embora Iomini e Justine (1997) tenham realizado um estudo utilizando microscopia eletrônica de varredura e técnicas de imunocitoquímica para descrever a espermiogênese e o espermatozoide de *E. caproni* a partir de indivíduos adultos e Nollen (1996) tenha descrito o comportamento de cópula de *E. paraensei* em camundongos e realizado observações sobre os espermatozoides.

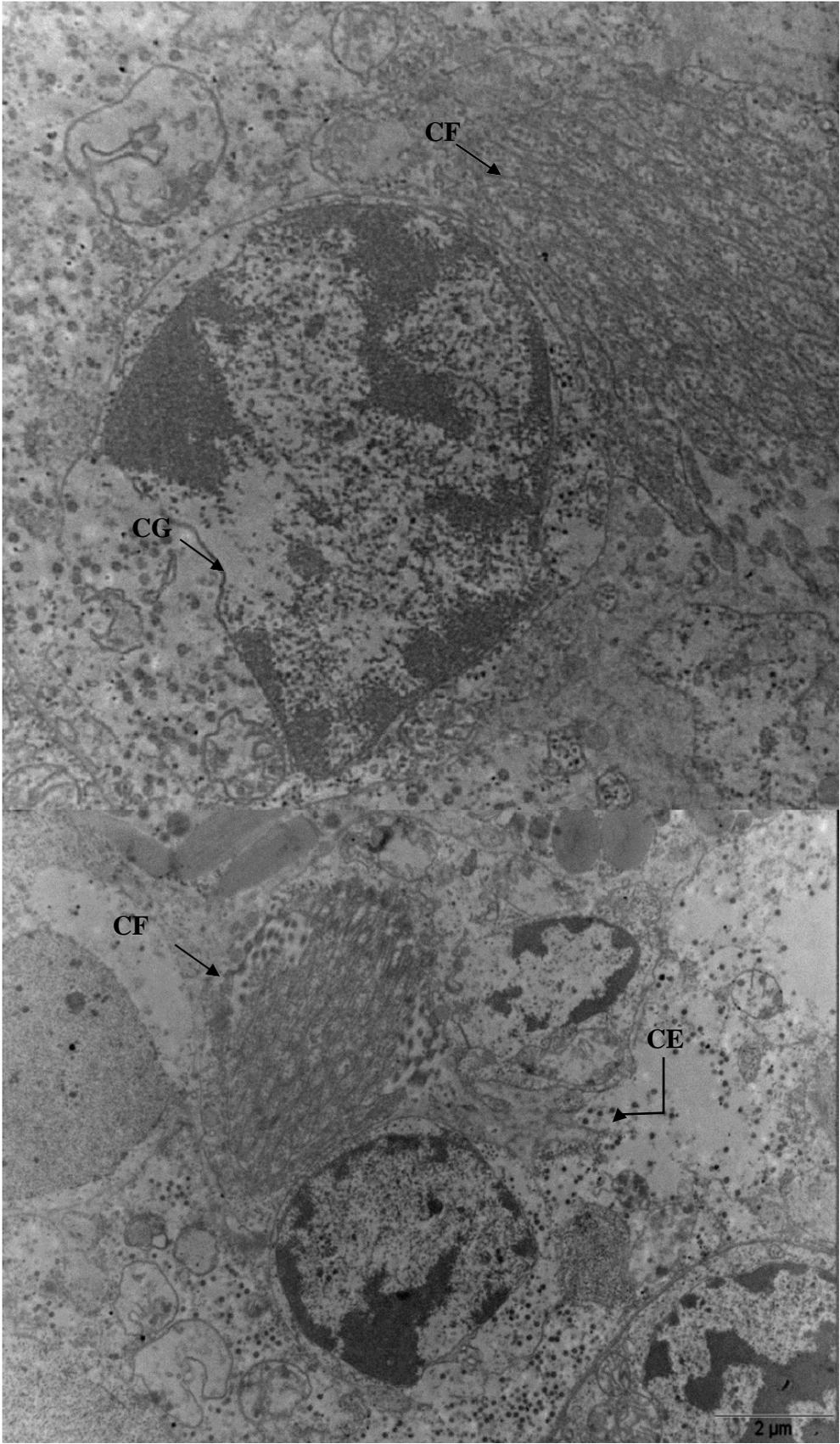


Figura 21: Microscopia eletrônica de transmissão do corpo de cercária de *Echinostoma paraensei*, onde observa-se uma célula flama e células germinativas. A- Célula flama (CF) com câmara excretora (CE) e células germinativas (CG). B - Presença célula flama próximo a uma célula germinativa.

A redescritção de *E. trivolvis* feita por Kanev *et al.* (1995b) relata células-flama inconspícuas, e inferem a quantidade das mesmas pelos padrões do grupo. Os autores relatam a dificuldade em quantificar essas células-flama devido à presença de inúmeras glândulas cistogênicas as recobrimo. Descrevem a presença de uma bexiga excretora bipartida na parte posterior do corpo, além da presença de grânulos excretores e canais excretores na cauda, sendo estes curtos e ramificados, abrindo-se para o exterior através de poros excretores.

Em trematódeos digenéticos podem ocorrer a presença de sistema protonefrídico, conectado a uma vesícula volumosa, como o observado por Adam *et al.* (1995) em *O. viverrini*. Neste parasito, o ducto excretor se abre na porção final do corpo e não desemboca na cauda.

No presente estudo, as células-flama foram de fácil visualização e foi possível a visualização de duas dessas estruturas. O fato de ambas as células flama estarem próximas a células germinativas podem ser um indicativo de grande atividade metabólica nestas células.

A presença de mitocôndrias (Fig. 22) está associada à intensa atividade metabólica, pelo fato dessa organela ser responsável pela respiração celular. Tal fato é coerente com a maturação que a cercária deverá passar para desenvolver-se na forma adulta. A intensa atividade metabólica então seria explicada pelas mudanças na forma e pela maturação sexual, a qual envolve a formação das gônadas, dentre outros acontecimentos. Pinto & Melo (2013) também observaram a presença de diversos perfis mitocondriais em seus estudos sobre larvas de trematódeos que parasitam moluscos, em fases de mudança de estágio como a formação de cercárias a partir dos esporocistos de segunda geração.

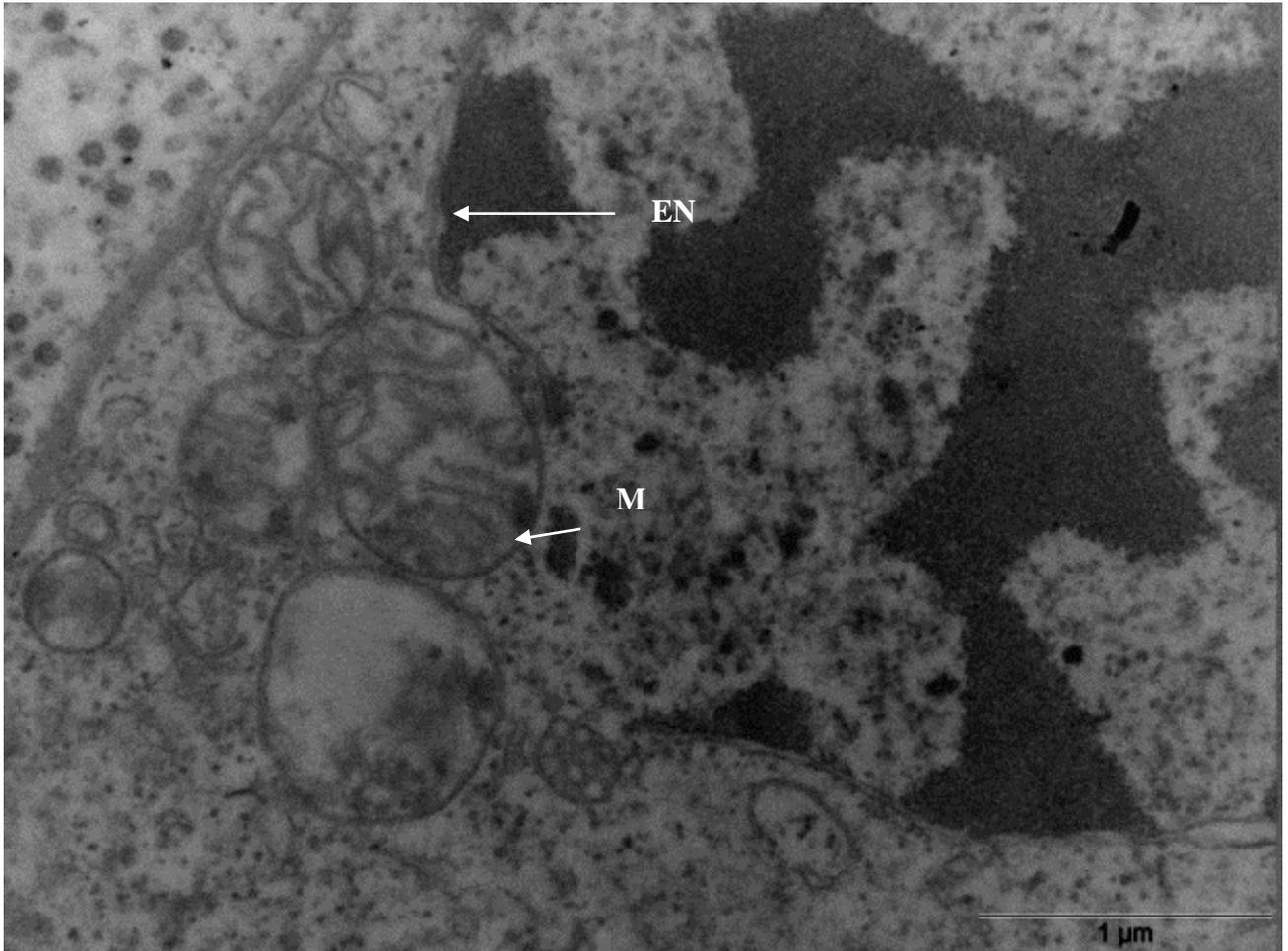


Figura 22: Microscopia Eletrônica de Transmissão de cercária de *Echinostoma paraensei* destacando a presença de envelope nuclear (EM) e perfis mitocondriais (M).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos foi possível concluir:

- A descrição das estruturas sensoriais argentofílicas das cercárias de *E. paraensei* através da microscopia de luz de contraste interferencial, com a utilização das fotos para a confecção de desenho, através do qual foi possível correlacionar essas estruturas com a morfologia externa, além de realizar a quimiotaxia das cercárias. A partir desses resultados foi possível concluir que a relação das estruturas sensoriais com as atividades realizadas pela cercária estão intimamente ligadas com a sua morfologia e ciclo de vida;
- A descrição da morfologia de superfície das cercárias de *E. paraensei* através da microscopia eletrônica de varredura nos permitiu elucidar aspectos da morfologia e correlacionar com o ciclo de vida, além de confirmar a posição taxonômica da cercária. Também foi possível observar detalhes dos espinhos tegumentares, tanto do colar cefálico, quanto os do corpo. A presença e a estrutura dos *fin folds* pôde ser observada e descrita com detalhes;
- A descrição da morfologia interna das cercárias de *E. paraensei* por meio da microscopia eletrônica de transmissão mostrou a relação da morfologia com a fisiologia, e observar a presença de células germinativas, depósitos de membrana, perfis mitocondriais, e outros aspectos morfológicos internos, coerentes com a fisiologia típica deste estágio larval. A presença de células flama, componentes do sistema excretor, células neuronais e figuras de mielina pôde ser observada e descrita, além da estrutura interna do tegumento, com camada sincicial, característica do grupo, com hemidesmosomos fazendo a ancoragem desta camada com a musculatura interna;
- Por fim, os resultados permitem elucidar aspectos da fase cercária, a qual atua também como agente dispersor do parasito, fornecendo subsídio para estudos posteriores sobre larvas de trematódeos, abrangendo às áreas de ecologia parasitária, epigenética e controle da parasitose associada ao *E. paraensei*.

8. REFERÊNCIAS

- ADAM, R.; ARNOLD, H.; HINZ, E.; STORCH, V. Morphology and ultrastructure of the redia and pre-emergent cercariae of *Opisthorchis viverrini* (Trematoda: Digenea) in the intermediate host *Bithynia siamensis goniomphalus* (Prosobranchia: Bithyniidae) *Appl. Parasitol.* v.36, n.2, p. 136-54, 1995.
- AMATO, J. F. R.; BOEGER, W. A.; AMATO, S. B. *Protocolos para Laboratório- Coleta e processamento de parasitos de pescado*. 1ª Ed. Rio de Janeiro, Imprensa Universitária, 81 p.1991.
- ADNET, F. A. O.; GONÇALVES, J. P.; SOUZA, W.; ATTÍAS, M. A Simple and Efficient Method to Observe Internal Structures of Helminths by Scanning Electron Microscopy. *Microsc. Microanal.* v.19, p. 1470–1474, 2013.
- ATAEV, G. L.; DOBROVOLSKIJ, A. A.; AVANESSIAN, A. V.; LOKER, E. S. Germinal Elements and Their Development in *Echinostoma caproni* and *Echinostoma paraensei* (Trematoda) Miracidia. *J. Parasitol.*, v.87, n.5, p. 1160–1164, 2001.
- BARBOSA, F.S., org. *Tópicos em malacologia médica* [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. 314 p. ISBN 85-85676-13-2. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acesso em 15/03/2018.
- BAGLIANO, R.V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. *Rev. Meio Amb. Sust.*, v.2, n.1, 2012.
- BARBOUR, M.T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B.D.; STRIBLING, J.B. 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, 2a ed. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.
- BAYSSADE-DUFOUR, C.; ALBARET, J.L.; GRABDA-KAZUBSKA, B.; CHABAUD, A.G. Nomenclature proposée pour la chétotaxie des cercaires de Plagiorchiata. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 64, n° 5, pp. 426-432, 1989.
- BENESH, D. P.; CHUBB, J.C.; PARKER, G. A. The trophic vacuum and the evolution of complex life cycles in trophically transmitted helminths. *Proc. R. Soc. B.* v.28, p. 2014-1462, 2014.
- BLASCO-COSTA, I; POULIN, R. Parasite life-cycle studies: a plea to resurrect an old parasitological tradition. *J. Helminthol.* v. 91, n. 6, p. 647-656, 2017.
- BOGÉA, T.; CAIRA, J.N. Ultrastructure and chaetotaxy of sensory receptors in the cercariae of a species of *Crepidostomum* Braun, 1900 and *Bunodera* Railliet, 1896 (Digenea: Allocreadidae). *J. Parasitol.*, v.87, n.2, p. 273-286, 2001.
- CABARET, J.; BAYSSADE-DUFOUR, C.; ALBARET, J.L., NGENDAHAYO, L. D.; CHABAUD, A. G. A technique for identification of cercariae of *Schistosoma haematobium*, *Ss. Curassoni*, *S. Bovis* and *S. Intercalatum*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 65, n. 2, 61-63, 1990.

CARNEIRO, V. C.; ABREU, I. C. S.; TORRES, E. J.; CABY, S.; LANCELOT, J.; VANDERSTRAETE, M.; FURDAS, S. D.; JUNG, M.; PIERCE, R. J.; FANTAPPIE, M. R. Epigenetic changes modulate schistosome egg formation and are a novel target for reducing transmission of schistosomiasis. *Plos pathogens*, v. 10, n. 8, 2014.

CARNEIRO, V.C.; DE ABREU DA SILVA, I. C.; GONÇALVES, B. M.; MONTEIRO, P. H. S.; GANESAN, A.; VERJOVSKI, S.; AMARAL, M. S.; BORRELLO, T.; PIERCE, R.J.; FANTAPPIÈ, M. R. Targeting epigenetic eegulators to control schistosomiasis. In: *Anais do 23 rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology*, 2015. Foz do Iguaçu, Brasil. Disponível em: <http://www.sbbq.org.br/iubmb2015/cdrom/resumos/R10184-1.pdf>. Acesso em: 04/03/ 2018.

CHRISTENSEN, N.O.; FRIED. B.; KANEV, I. Taxonomy of 37- collar spined Echinostoma (Trematoda: Ec2hinostomatidae) in studies on the population regulation in experimental rodent hosts. *Angew Parasitol* . v. 31, p. 127-130, 1990.

CHERNIN, E. Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. *J. Parasitol.*, v. 56, n. 2, p. 287-296, 1970.

CHUBB, J.C.; BALL, M.A.; PARKER, G.A. Living in intermediate hosts: evolutionary adaptations in larval helminths. *Trends Parasitol*. v.26, p. 93–102, 2010.

COEN, M.; ADEMA, P. M.; LE´ONARD, R. J.; DEJONG, H. L.; DAY, D. J.; EDWARDS, G., B. L. Analysis of messages expressed by *Echinostoma paraensei* miracidia and sporocysts, obtained by random est sequencing. *J. Parasitol*. v. 86, n. 1, p. 60–65, 2000.

COMBES, C.; FOURNIER, A.; MONÉ, H.; THÉRON, A. Behaviours in trematode cercariae that enhance parasite transmission: patterns and process. *Parasitology*, v. 109 (Suppl): 3-15, 1994.

CONSOLI, R.A.G.B., OLIVEIRA, R.L. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*[online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p. ISBN 85-85676-03-5. Disponível em: <http://books.scielo.org>. Acesso 14/03/2018.

CORT, W. W.; AMEEL, D. J.; WOUDE, A. V. Germinal development in the sporocysts and rediae of the digenetic trematodes. *Exp. Parasitol.*, v. 3, n.2, p. 185-225, 1954.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenética: Regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. *Semina cienc. biol. saúde*. v.34, n.2, p. 125-136, 2013.

CRIBB, T.H.; BRAY, R.A.; LITTLEWOOD, D.T.J.; PICHELIN, S.; HERNIOU, E.A. 2001. **The Digenea**. In: *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London. 168-185pp.

DAVIS, N.E. Endemic echinostome infections of candidate hosts. *J. Helminthol*. v.79 n. 2, p. 127-32, 2005.

DAWES, B. **The trematoda**. London: Cambridge University press, 1968, 644 p.

DETWILER, J.T.; MINCHELLA, D.J. Intermediate host availability masks the strength of experimentally-derived colonisation patterns in echinostome trematodes. *Int. J. Parasitol.* April, v.39, n. 5, p. 585-90, 2009.

DIMITROV, V.; M.A., M.Y., GONZALEZ, G.A.; KANEV, I.; RADEV, V. Chaetotaxy of the cercariae of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae) from *Lymnaea truncatula* snails collected in Leon, Nw Spain. *Res. and Rev. in Parasitol.*, v.56, n.4, p. 213-216, 1996.

DORSEY, C.H. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria; *Micron*, v. 33, n. 3, p.279-323, 2002.

EHLERS, U. **Phylogenetic relationship within the Platyhelminthes**. In: Morris S. C., George J. D., Gibson R., Platt H. M. **The Origins and relationships of lower invertebrates**. Oxford University Press, Oxford, USA; 1985, p. 143-158.

ESTUNINGSIH, S. E. Studies on the life cycle and taxonomy of *Echinostoma revolutum* in *Lymnaea rubiginosa* in west Java. *Penyakit Hewan.*, v. 24, n.43, 1992.

FERNÁNDEZ, M. V.; HAMANN, M. I.; NÚÑEZ, M. O. Echinostome cercariae from *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in a ricefield from northeastern Argentina. *Rev. Mex. Biodivers.*, v. 85, p. 1024-1031, 2014.

FRIED, B.; REDDY, A. Comparative studies on excystation and morphological features of the metacercariae of *Echinostoma paraensei* and *E. caproni*. *Int. J. Parasitol.* v. 27, p.899-901, 1997.

FRIED, B.; T. K. GRACZYK. Echinostomes as experimental models for biological research. Kluwer Academic Publishers, London, U.K., 2000, 273 p

FRIED, B.; EYSTER, L. S.; PECHENIK, J.A. Histochemical glycogen and neutral lipid in *Echinostoma trivolvis* cercariae and effects of exogenous glucose on cercarial longevity. *J. Helminthol.*, v. 72, n. 1, p.83-5, 2009.

FRIED, B.; FUJINO, T. Argentophilic staining and scanning electron microscopic observations of the tegumentary papillae of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) cercariae. *J. Parasitol.*, v. 73, p. 6, p. 1169-74, 1987.

GEYER, K.K.; HOFFMANN, K.F. Epigenetics: A key regulator of platyhelminth developmental biology? *Int. J. Parasitol.*, v. 42, p. 221–224, 2012.

GIBSON, D.I. **Keys to Trematoda, Vol. 1**. D. I. Gibson, A. Jones and R. A. Bray (eds), The Natural History Museum, London, UK, 2002. 544p.

GONÇALVES, J. P.; MENEZES, A. O.; MALDONADO, A. J.; CARVALHO, T. M. U.; SOUZA, W. Ultrastructural and cytochemical characterization of T1 and T2 secretory bodies from the tegument of *Echinostoma paraensei*. *Micron*, v.80, p. 59-65, 2016.

GOULART, M. & CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Rev. FAPAM*, v.2, n.1, 2003.

GRABDA-KAZUBSKA, B., KISELIENE, V., C.BAYSSADE-DUFOUR. Morphology and chaetotaxy of *Echinochasmus* sp. cercaria (Trematoda, Echinochasmidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 66, n.6, p.263-268, 1991.

GRABDA-KAZUBSKA, B., LASKOWSKI, Z. On the morphology and chaetotaxy of rediae and cercariae of *Isthmiophora melis* (Schrank, 1788) (Trematoda, Echinostomatidae). *Acta Parasitol.* v. 41, n.1, p. 7-12, 1996.

HABERL, B., KÖRNER, M., SPENGLER, Y., HERTEL, J., KALBE, M., HAAS, W. Host-finding in *Echinostoma caproni* : miracidia and cercariae use different signals to identify the same snail species. *Parasitol.Int.* v.120, p. 479-486, 1999.

HONG, S.J.; LEE, D.H.; HONG, S.T.; CHAI, J.Y.; LEE, S.H. Surface ultrastructure of the cercaria of *Neodiplostomum seoulense* (Trematoda: Neodiplostomidae). *J. Parasitol.* v. 82 , n.5, p. 837-40, 1996.

HUDSON, P.J.; DOBSON, A.P.; LAFFERTY, K.D. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends Ecol. Evol.*, v. 21, p. 381-385, 2006.

HUSPENI, T.C.; LAFFERTY, K.D. Using larval trematodes that parasitize snails to evaluate a salt-marsh restoration project. *Ecol. Appl.*, v. 14, p. 795-804, 2004.

IDRIS, N., FRIED, B. Development, hatching, and infectivity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) eggs, and histologic and histochemical observations on the miracidia *Parasitol. Res.* v. 82, n. 136, 1996.

IOMINI, C.; JUSTINE, J. L. Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (*Platyhelminthes, Digenea*): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Tissue cell.* v. 29, n. 1, p. 107-118, 1997.

JURBERG, A. D.; PASCARELLI, B. M.; PELAJO-MACHADO, M.; MALDONADO JR., A.; MOTA, E.M.; LENZI, H.L. Trematode embryology: a new method for whole-egg analysis by confocal microscopy. *Dev. Genes Evol.* v. 218, p.267–271, 2008.

KALBE, M.; HABERL, B.; HAAS, W.. Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glycoconjugates released from the host snails. *Parasitol Res.*, v. 83, n. 8, p. 806-812, 1997.

KALBE, M.; HABERL, B.; HAAS, W.. Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: compound analysis of “miracidia-attracting glycoproteins”. *Exp. Parasitol.*, v. 96, n. 4, p. 231-242, 2000.

KANEV, I. *On the morphology, biology, ecology and taxonomy of the Echinostoma revolutum group (Trematoda: Echinostomatidae: Echinostoma)*. Ph.D. Thesis. University of Sophia, Bulgaria; 1985.

KANEV, I.; EISENHUT, U.; DE NUNEZ, M.O.; GONZALEZ, M.Y.M.; TZOLOV, D.; DIMITROV, V.; RADEV, V. Description of the tail and *fin fold* of *Echinostoma revolutum* cercariae from its type locality (Trematoda: Echinostomatidae). *Na. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 68, n. 3, p. 125-127, 1993.

KANEV I. Life-cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Forelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). *Syst. Parasitol.* v. 28, p. 125-144, 1994.

KANEV, I.; DIMITROV, V.; RADEV, V.; FRIED, B. Redescription of *Echinostoma jurini* (SKVORTZOV, 1924) with a discussion of its identity and characteristics (Trematoda: Echinostomatidae). *Ann. Naturhist. Mus. Wien.*, v.97 B, p. 37-53, 1995.

KANEV, I.; FRIED, B.; DIMITROV, V.; RADEV, V. Redescription of *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) (Trematoda: Echinostomatidae) with a discussion on its identity. *Syst. Parasitol.*, v.32, p. 61-70, 1995b.

KANEV, I.; STERNER, M.; RADEV, V.; FRIED, B. **An overview of the biology of Echinostomes.** In: Fried B, Graczyk TK. **Echinostomes as Experimental Models for Biological Research.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 1-29

KANEV, I.; FRIED, B.; RADEV, V. Collar spine models in the genus *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitol. Res.* v.105, p. 921-927, 2009.

KOEHLER, A.V.; BROWN, B.; POULIN, R.; THIELTGES, D.W.; FREDENSBORG, B.L. Disentangling phylogenetic constraints from selective forces in the evolution of trematode transmission stage. *Evol. Ecol.* v. 26, p.1497-1512, 2012.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M. Sobre as espécies do gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 descritas por Adolfo Lutz em 1924. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 73, n. 1/2, 1975.

KOMMA, M. D. Revalidação da espécie *Echinostoma erraticum* (Lutz, 1924). *Rev. Pat. Trop.* v.1, n. 4, p.463-471, 1972.

KOSTADINOVA, A.; HERNIOU, E. A.; BARRETT, J.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. *Syst. Parasitol.*, v. 54, p.159–176, 2003.

KOSTADINOVA, A.; GIBSON, D.I. The systematics of the echinostomes. In: Fried B, Graczyk TK. *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research.* Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2005. p. 31-57

KOSTADINOVA, A. Family Echinostomatidae Looss, 1899. In A Jones, RA Bray, DI Gibson (eds.), *Keys to the Trematoda*, Vol. II, CAB International and The Natural History Museum, Wallingford and London, 2005. p. 99-118

LAMBRECHTS, L.; FELLOUS, S.; KOELLA, J. C.; Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.*, v. 22 n.1, 2006.

LIE, K. J.; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. N. (Trematoda:Echinostomatidae). *J. Parasitol.*, v. 53, n.1, p.192-99, 1967.

LIJTEROFF, R.; LIMA, L.; PRIERI, B. Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica em la ciudad de San Luis, Argentina. *San Luis*, v.3. n.1, p.3-6, 2008.

LOY, C. MOTZEL, W., HAAS, W. Photo- and geo- orientation by Echinostome cercariae results in habitat selection. *J. Parasitol.*, v. 87, n.3, p. 505-9, 2001.

MAGALHÃES, L.A., ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M., CARVALHO, J.F., FARAONE, M. Atração miraxonal exercida por *Biomphalaria straminea*, *Lymnaea columela* e *Physa* sp, sobre miracídios de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. *Rev. Saúde Publ.*, v. 25, n.1, p. 23-27, 1991.

MALDONADO JR., A.; LOKER, E.S.; MORGAN, J.A.T.; REY, L.; LANFREDI, R.M. Description of the adult worm of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitol Res*, v. 87, p.840-848, 2001.

MALDONADO, A. JR.; VIEIRA, G.O.; GARCIA, J.S.; REY, L.; LANFREDI, R.M. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitol. Res.* v.87, n. 8, p. 53-59, 2001.

MARCOGLIESE, D.J. Parasites of the superorganism: Are they indicators of ecosystem health? *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p.705-716, 2005.

MAREK, M; KANNAN, S; HAUSER, A. T; MOURAO, M. M; CABY, S; CURA, V; STOLFA, D. A; SCHMIDTKUNZ, K; LANCELOT, J; ANDRADE, L; RENAUD, J. P; OLIVEIRA, G; SIPPL, W; JUNG, M; CAVARELLI, J; PIERCE, R. J; ROMIER, C. Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Plos Pathogens*, v. 9, n.9, 2013.

MARSIT, C. J.; FRIED, B.; SHERMA, J. Neutral lipids on cercariae, encysted metacercariae and rediae of *Echinostoma caproni*. *J. Helminthol.* v.74, n.4, p. 365-7, 2000.

MOHAMED, H. S. Ultrastructural aspects of intramolluscan developing cercariae of *Echinostoma liei*. *J. Egypt. Soc. of Parasitol.*, v. 22, n. 2, 1992.

MORLEY, N.J.; LEWIS, J.W.; HOOLE, D. Pollutant-induced effects on immunological and physiological interactions in aquatic host-trematode systems: implications for parasite transmission. *J. Helminthol.*, v.80, p.137-149, 2006.

NOLLEN, P. The mating behaviour of *Echinostoma paraensei* grown in mice. *J. Helminthol.*, v. 70, n. 1, p. 43-45, 1996.

OLSEN, O.W. **Parasitologia Animal. I. El Parasitismo y los Protozoa.** Editorial AEDOS. Barcelona, España, 1977. 284p.

PETRIE, J.L.; BURG III, E.F.; CAIN, G.D. Molecular characterization of *Echinostoma caproni* and *E. paraensei* by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *J. Parasitol.* V.82 , n.2, p.360-362, 1996.

PINTO, H.A.; MELO, A. L. A checklist of cercariae (Trematoda: Digenea) in molluscs from Brazil. *Zootaxa*, v. 3666, n. 4, p. 470-475, 2013.

PINHEIRO, J. Morfologia e ultraestrutura dos ovos e estágios larvais de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) e fisiologia comparada da sua interação com *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca: Gastropoda). 2003. Tese (Doutorado em Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A.; LANFREDI, R. M. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). *Vet. Parasitol.*, v. 121, n. 3, p. 265-275, 2004a.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, JR., A.; ATTIAS, A.; LANFREDI, R.M. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Parasitol. Res.* v. 93, p. 171-177, 2004b.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR., A.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R.M. Ultrastructure of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). *Parasitol. Res.* v.97, p. 367-372, 2005.

PLATT, T.R.; DOWD, R.M. Age-related change in phototaxis by cercariae of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae). *Comparative Parasitol.*, v. 79, pp. 1-4. 2012.

PRICE, P.W. **Evolutionary biology of parasites**, v. 15. New Jersey: Princeton University Press, 1980.

SIANTO, L.; REINHARD, K. J.; CHAME, M.; CHAVES, S.; MENDONÇA, S.; GONÇALVES, M. L. C.; FERNANDES, A.; FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a brazilian mummified body dated of 600- 1,200 years before present. *J. Parasitol.* v.91, n. 4, p.972-975, 2005.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL-SINDAN. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 10 out. 2017.

SHOOP, W. L. Trematode transmission patterns. *J. Parasitol.*, V.. 74, n. 1, p. 46-59,1988.

STILLSON, L. L.; PLATT, T. R. The crowding effect and morphometric variability in *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) from icr mice. *J. Parasitol.*, v. 93, n. 2, p. 242-246, 2007.

SOUZA, J.; GARCIA, J.; NEVES, R.H.; MACHADO-SILVA, J. R.; MALDONADO, A. In vitro excystation of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) metacercáriae assessed by light microscopy, morphometry and confocal laser scanning microscopy. *Exp. Parasitol.*, v. 135, p.701–707, 2013.

SOUZA, J. G. R., GARCIA, J. S., GOMES, A. P. N., MACHADO-SILVA, J. R., MALDONADO JR., A., Comparative pattern of growth and development of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) in hamster and Wistar rat using light and confocal laser scanning microscopy. *Exp. Parasitol.*, v. 183, p. 41-49, 2017.

THÉRON, A., ROGNON, A., PAGÈS, J.R. Host-choice by larval parasites: a study of *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* miracidia related to host size. *Parasitol. Res.*, v. 84, p. 727-732, 1998.

THOMAS, F.; POULIN, R. Egg size variability in trematodes: test of the bet-hedging hypothesis. *J. Parasitol.*, v.89, n. 6, p. 1159-1162, 2003.

TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G.; FRIED, B. Recent advances in the biology of echinostomes. *Adv. Parasitol.* v. 69, p. 147-204, 2009.

TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; FRIED, B. The use of Echinostomes to study host-parasite relationships between larval trematodes and invertebrates and cold-blooded vertebrate hosts. *Parasitol. Res.* , v.100, n. 6, p. 1177-85, 2007.

TOLEDO, R.; RADEV, V.; KANEV, I.; GARDNER, S.L.; FRIED, B. History of Echinostomes (Trematoda). *Acta Parasitol.* v. 59, n. 4, p. 555-567, 2014.

TUNHOLI, V. M. A. Caracterização do Metabolismo Aeróbio e Anaeróbio de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) Experimentalmente Infectadas Com Diferentes Doses Miracidiais de *Echinostoma paraensei* Lie e Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). 2016. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

TRAIL, D.R.S.. Behavioral interactions between parasites and hosts: host suicide and the evolution of complex life cycles. *Am. Nat.*, v. 116, p.77-91, 1980.

VIANA, L. Tentativa de catalogação das espécies brasileiras de trematódeos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.17, p. 95–227, 1924.

TUNHOLI, V. M. A. Caracterização do Metabolismo Aeróbio e Anaeróbio de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) Experimentalmente Infectadas Com Diferentes Doses Miracidiais de *Echinostoma paraensei* Lie e Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) 2016. 101 p Tese – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.*, v.23, p. 5293–300, 2003.

YOUNG, E. Strange inheritance. *New Scientist*, v. 199, n. 2664, p. 28-33, 2008.

ZAWADZKI, J.; KOTZE, A.; FRITZ, J.A.; JONSON, N.; HEMSWORTH, J.; HINES, B.; BEHM, C. Silencing of essential genes by RNA interference in *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, v.139, p. 613-629, 2012.

ZDARSKA, Z.; NASINCOVA, V.; STERBA, J.; VLKOUNOVA, J. Ultrastructure of a new type of sensory ending in *Echinostoma revolutum* cercária (Trematoda: Echinostomatidae). *Folia Parasitol.*; v. 34 , n.4, p. 311-315, 1987.

ZDARSKA, Z. Ultrastructure of the primitive epithelium of *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) cercaria. *Folia Parasitol.*.v. 42, p. 266-268, 1995.

ANEXO

Nota aceita para publicação na Brazilian Journal of Biology.

<http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.169885> Morphology of *E. paraensei* cercariae

Morphology of *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda) cercariae

F. Almeida Matos^{a*}, V. Sant'Anna^b, A. Maldonado Junior^c and J. Pinheiro^d

^aDepartamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Rodovia BR 465, Km 07, s/n, Zona Rural, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil

^bLaboratório de Biologia de Helmintos Oto Wucherer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Av. Pedro Calmon, 550, Cidade Universitária, CEP 21941-901, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cLaboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos e Reservatório, Instituto Oswaldo Cruz – IOC, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Estrada de Mangueiras, 2-326, Mangueiras, CEP 21041-222, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^dDepartamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Rodovia BR 465, Km 07, s/n - Zona Rural, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil

*e-mail: f.almeidamatos@gmail.com

Received: July 29, 2016 – Accepted: November 29, 2016 – Distributed: May 31, 2018
(With 3 figures)

The family Echinostomatidae is the most numerous within the class Trematoda, *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 is a widely distributed member of this family, with a typical life cycle with six larval stages, many of them studied by some authors (Kanev et al., 2000; Kostadinova and Gibson, 2000; Pinheiro et al., 2004, 2005; Toledo et al., 2007). The taxonomic features of the *Echinostoma* genus are complex, so are those of *E. paraensei*, described as a synonymy with *E. caproni* by Kanev (1985) and Christensen et al. (1990).

The *E. paraensei* cercariae were obtained from 'Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos e Reservatório', IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro state

The specimens were observed using a Quanta 250 scanning electron microscope at 12.50 kV.

The cercariae present elongated body, with muscular striations all over it, which probably accompany the musculature. For *E. paraensei*, the fin-fold pattern is demonstrated in Figure 1, with two dorsal, two ventral, and two lateral folds. Fin folds present a different striation

pattern, lengthwise, differing from the body muscular striation.

The body of *E. paraensei* cercariae presents a well developed, detached collar spine that partially surrounds the oral sucker, as indicated in Figure 2. This sucker is not prominent off the body as the ventral fin fold, which is protuberant. The tail is long with a thicker tip that narrows at the end.

The perioral region presents a sequence of papillae, forming a circle around this region (Figure 3). The papilla emerges from a pore situated in a bulbous protuberance (Figure 3B). These papillae are unciliated and are also present in the collar, surrounding it and completing a full circle in the ventral region. There are more of them distributed in the tegument of the ventral and dorsal regions; they decrease in number along the cercarial body and completely disappear at the acetabulum region. The position and structure of these papillae suggest their sensorial role.

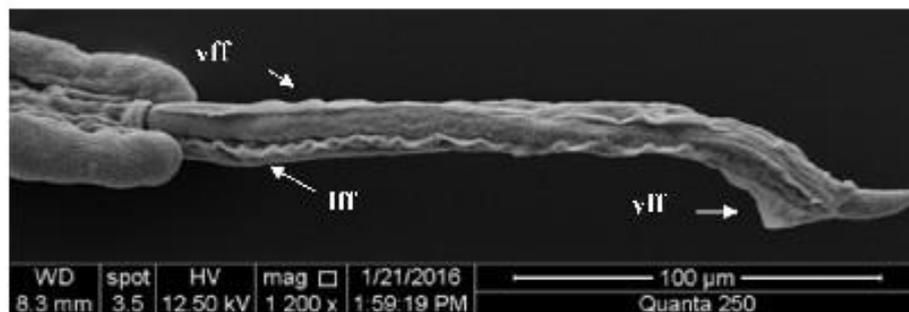


Figure 1. SEM of *Echinostoma paraensei* cercaria detailing the six fin folds. The main image shows the ventral fin folds (vff), the lateral fin folds (lff), and the dorsal fin folds (dff).

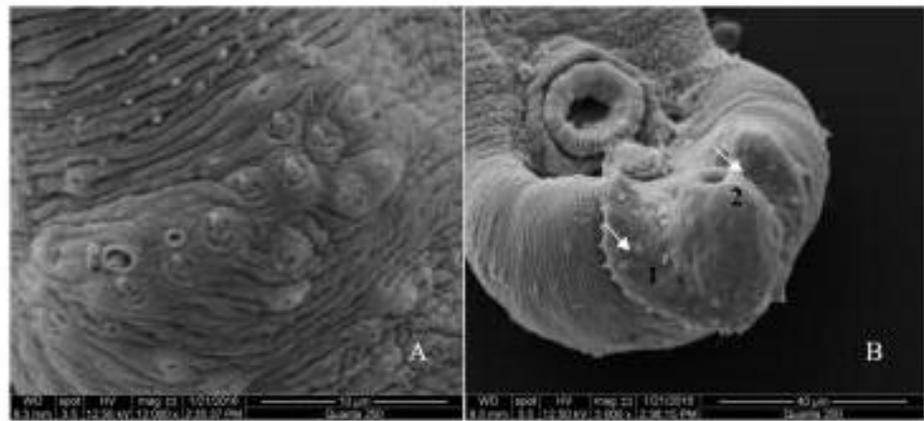


Figure 2. The collar spine of *Echinostoma paraensei*. (A) shows that the collar ends at the ventro-lateral region of the cercaria body; (B) a view of the spine collar, completely detached from the body and around the oral sucker.

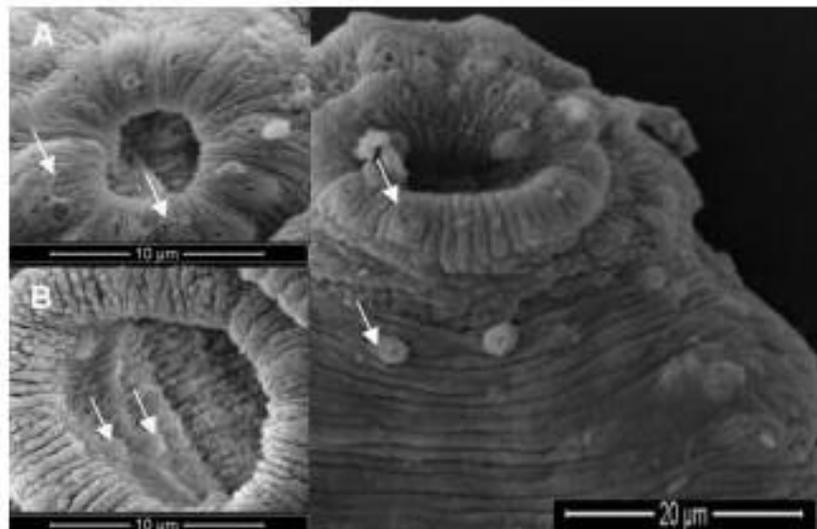


Figure 3. Details of the papillae of the oral and ventral suckers. The main image shows unciliated papillae. (A) detail of the unciliated papillae of the oral sucker, surrounding it; (B) the papillae of the ventral sucker. These papillae do not present any cilia, forming bulbous protrusions in the internal region of the sucker.

Internally, in the acetabulum, a range of papillae can be observed as bulbous projections surrounding the inner edge of the sucker, as shown in Figure 2. These papillae do not present any cilia, but a small round projection. The differences between the papillae of these regions may be related to the function they hold in each of them: in the anterior region, they have a sensory function because they are used to explore the environment in search for food; whereas in the acetabular portion, their function may be associated with recognition of the site of helminth infection and fixation, because the frontal part must be more involved in perception and orientation in order to find the second intermediate host.

The presence of a tegumentary fold on the tail of *E. revolutum* was also observed by Lie and Basch (1967), being used as a taxonomic criteria in the description of this species. According to Kanev et al. (1993), *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) cercariae have been described with different numbers and arrangement of fin folds. These data also speculate that the large dorso-ventral fin folds are associated with swimming, and the small ventro-lateral and single papila-like folds are probably sensorial.

The sheath that surrounds the basis of the spine is probably involved in the retraction of the spines. Maldonado Júnior et al. (2001) also described a protrusion around the spine in the adult worm. This characteristic may represent a way to avoid the loss of spines, considering

that contraction can protect the spines from the attrition on rough surfaces. It can also protect them from the flow of food that occurs in the intestine of the host.

There was a lack of morphological studies on the cercaria of *E. paraensei*, as well as on descriptions of their external ensorial structures. This work shows and describes these features for the first time, complementing the studies on the Echinostomatidae family.

References

- CHRISTENSEN, N.O., FRIED, B. and KANEV, I., 1990. Taxonomy of 37-collar spined Echinostoma (Trematoda: Echinostomatidae) in studies on the population regulation in experimental rodent hosts. *Angewandte Parasitologie*, vol. 31, no. 3, pp. 127-130. PMID:2291497.
- KANEV, I., 1985. *On the morphology, biology, ecology and taxonomy of the Echinostoma revolutum group (Trematoda: Echinostomatidae: Echinostoma)*. Bulgaria: University of Sophia. PhD Thesis.
- KANEV, I., EISENHUT, U., OSTROWSKI DE NUNEZ, M., MANGA GONZALEZ, M.Y., TZOLOV, D., DIMITROV, V. and RADEV, V., 1993. Description of the tail and fin folds of *Echinostoma revolutum* cercariae from its type locality (Trematoda: Echinostomatidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, vol. 68, no. 3, pp. 125-127. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/1993683125>.
- KANEV, I., STERNER, M., RADEV, V. and FRIED, B., 2000. An overview of the biology of echinostomes. In: B. FRIED and T.K. GRACZYC. *Echinostomes as experimental models for biological research*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-29.
- KOSTADINOVA, A. and GIBSON, D.I., 2000. The systematics of the echinostomes. In: B. FRIED and T.K. GRACZYC. *Echinostomes as experimental models for biological research*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 31-57.
- LIE, K.J. and BASCH, P.F., 1967. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *The Journal of Parasitology*, vol. 53, no. 6, pp. 1192-1199. PMID:6078607. <http://dx.doi.org/10.2307/3276679>.
- MALDONADO JÚNIOR, A., LOKER, E.S., MORGAN, J.A., REY, L. and LANFREDI, R.M., 2001. Description of the adult worm of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitology Research*, vol. 87, no. 10, pp. 840-848. PMID:11688891. <http://dx.doi.org/10.1007/s004360100451>.
- PINHEIRO, J., MALDONADO JÚNIOR, A.J., ATTÍAS, M. and LANFREDI, R.M., 2004. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Parasitology Research*, vol. 93, no. 3, pp. 171-177. PMID:15127294. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-004-1110-z>.
- PINHEIRO, J., MALDONADO JÚNIOR, A.J., ATTÍAS, M. and LANFREDI, R.M., 2005. Ultrastructure of the miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). *Parasitology Research*, vol. 97, no. 5, pp. 367-372. PMID:16151745.
- TOLEDO, R., MUÑOZ-ANTOLI, C. and FRIED, B., 2007. The use of Echinostomes to study host-parasite relationships between larval trematodes and invertebrates and cold-blooded vertebrate hosts. *Parasitology Research*, vol. 100, no. 6, pp. 1177-1185. PMID:17279393. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0470-6>.