

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

TESE

**Morfologia de ovos, larvas e adultos de *Paratanaisia*
bragai (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea,
Eucotylidae) e histopatologia do rim de *Columba*
livia (Gm.) infectado**

Vanessa Barreto Xavier



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

Morfologia de ovos, larvas e adultos de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) e histopatologia do rim de *Columba livia* (Gm.) infectado

VANESSA BARRETO XAVIER

Sob a Orientação do Professor

Jairo Pinheiro da Silva

e Co-orientação das Professoras

Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini

Aleksandra Menezes de Oliveira

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2015

636.089696

X3m

T

Xavier, Vanessa Barreto, 1985-
Morfologia de ovos, larvas e adultos de
Paratanaisia bragai (Santos, 1934)
Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) e
histopatologia do rim de *Columba livia*
(Gm.) infectado / Vanessa Barreto Xavier -
2015.

112 f.: il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 101-112.

1. Parasitologia veterinária - Teses.
2. Pombo - Parasito - Teses. 3. Trematódeo
- Teses. 4. Microscopia - Teses. 5.
Microscopia eletrônica - Teses. I. Silva,
Jairo Pinheiro da, 1969-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

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

VANESSA BARRETO XAVIER

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

TESE APROVADA EM 24/02/2015



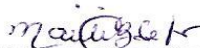
Jairo Pinheiro da Silva. Dr. UFRRJ
(Orientador)



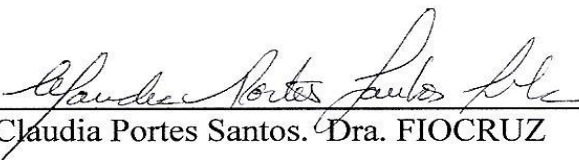
Clélia Christina Correa de Mello Silva. Dra. FIOCRUZ



Arnaldo Maldonado Júnior. Dr. FIOCRUZ



Marília de Carvalho Brasil Sato. Dra. UFRRJ



Claudia Portes Santos. Dra. FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades concedidas e por me ajudar a superar dificuldades, em todos os momentos da elaboração desta tese.

Aos meus pais, Paulo e Sonia, por me incentivarem em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, pelas nossas conversas engraçadas. Meu pai que sempre me auxiliou nas chamadas “missões” quase que impossíveis, mas todas realizadas com o seu maior esforço; as quais foram essenciais para a realização deste trabalho. Muito obrigada! Amo vocês!

À minha cunhada Carla e ao meu irmão Bruno por me apoiarem nos momentos mais difíceis, com conversas que me ajudaram a seguir em frente!

Ao meu sobrinho Pedro que me passa calma e me diverte todas às vezes que estamos juntos.

Ao meu namorado Thiago por sua compreensão, apoio nos momentos de estresse, seu amor e carinho, além de seu ótimo bom humor. Obrigada!

Ao meu primo Alexandre, por nossas longas conversas engraçadas!

Aos queridos professores, Dr. Jairo Pinheiro da Silva, Dra. Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini e Dra. Aleksandra Menezes de Oliveira por me auxiliarem nos momentos que mais precisei, através de compreensão, paciência, dedicação e o compartilhamento de conhecimentos fundamentais não só para elaboração deste trabalho, como também, para minha vida.

Aos integrantes do laboratório de Biologia de Helminhos Otto Wucherer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, com o suporte à microscopia e extrema boa vontade. Principalmente as contribuições do Fernando Adnet e da Viviane Sant’anna. Muito obrigada!

Ao CPGCV/UFRRJ pelo suporte com os equipamentos para a microscopia de luz.

Aos professores e amigos do curso, principalmente à Mariana Lima que mais uma vez me ajudou.

As “meninas” do laboratório da Dra. Marília de Carvalho Brasil Sato pelo apoio.

À UFRRJ, universidade que me acolheu com carinho.

A CAPES pelo auxílio financeiro, através da concessão de bolsa, ao longo destes quatro anos.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desta tese.

RESUMO

XAVIER, Vanessa Barreto. **Morfologia de ovos, larvas e adultos de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) e histopatologia do rim de *Columba livia* infectado.** 2014. 112f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Paratanaisia bragai é um digenético que atinge a maturidade sexual nos ductos coletores de aves domésticas e silvestres, e para o desenvolvimento larval utiliza o molusco *Subulina octona* ou *Leptinaria unilamellata*. Os ovos embrionados são liberados com os produtos de excreção do hospedeiro definitivo e a infecção no molusco se estabelece pela ingestão destes. Após a eclosão do miracídio, desenvolvem-se no interior do molusco duas gerações de esporocistos, cercárias e metacercárias. O hospedeiro definitivo adquire a infecção por ingestão do molusco parasitado. O presente estudo teve como objetivos: verificar a ação do parasito sobre o rim de pombos, *Columba livia*, através da análise histopatológica bem como analisar a morfometria, morfologia e ultraestrutura utilizando a microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão do ovo, estágios larvais (miracídio, cercária e metacercária) e helminto adulto de *P. bragai*. Pombos adultos foram obtidos próximos a Central de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro S.A, Irajá, Município Rio de Janeiro. Após exame coproparasitológico, no laboratório, para verificação da infecção, os pombos infectados foram necropsiados para a coleta dos helmintos e do rim infectado. Os pombos não infectados foram utilizados como grupo controle. Os protocolos experimentais foram aprovados pela comissão de ética na pesquisa da UFRRJ. A análise histopatológica revelou dilatação dos túbulos renais, processo inflamatório com células mononucleadas, formação de estrutura papiliforme projetando-se para a luz tubular e metaplasia do epitélio da parede do túbulo coletor, de epitélio cúbico simples nos túbulos não infectados a pseudoestratificado nos rins infectados com *P. bragai*. Os ovos são elípticos, com opérculo na extremidade anterior e nó na extremidade posterior, região abopercular. A casca apresenta-se áspera e composta por três camadas: interna, média e externa de espessuras e eletron densidades diferentes. O miracídio é alongado, com *terebratorium* na extremidade anterior e corpo coberto por cílios. As cercárias apresentam corpo cilíndrico que se afunila ligeiramente na região posterior. O tegumento é rugoso, a ventosa oral é subterminal, o acetábulo destaca-se no terço médio do corpo. Papilas foram verificadas ao redor da ventosa oral. Uma estrutura semelhante à cauda rudimentar foi observada em algumas cercárias. Nas metacercárias observadas através de cortes histológicos visualizou-se a ventosa oral, o acetábulo, as escamas e cisto composto por três camadas, interna, média e externa, de espessuras diferentes. A presença das camadas foi confirmada na visualização dos cortes histológicos das metacercárias na microscopia eletrônica de varredura. O parasito adulto tem corpo alongado e achatado com ventosa oral, faringe, glândulas vitelogênicas extracecais que se prolongam anteriormente até a região de bifurcação cecal e posteriormente a região mediana do corpo. No poro genital visualiza-se uma estrutura evertida que é o cirro em formato de roseta. No estágio adulto o tegumento é coberto por escamas de vários tipos; escamas simples, bífidas, trifidas, com quatro, cinco e sete divisões, característica que pode contribuir para ratificar a classificação taxonômica do parasito.

Palavras-chave: *Paratanaisia bragai*, morfologia, Digenea, microscopia de luz e microscopia eletrônica

ABSTRACT

XAVIER, Vanessa Barreto. **Morphology of eggs, larvae and adult of *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) and histopathology of the kidney *Columba livia* infected.** 2014. 112f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Paratanaisia bragai is a digenetic that reaches sexual maturity in the collecting ducts of domestic and wild birds, and larval development using the snail *Subulina octona* or *Leptinaria unilamellata*. The embryonated eggs are released with the waste products of the definitive host and the infection settles in the snail by ingestion of these. After hatching, the miracidium, develop inside the snail two sporocysts generations, cercariae and metacercariae. The definitive host acquires infection by ingestion of parasitized snail. The present study was aimed to identify the action of the parasite on the kidney of pigeons, *Columba livia*, through histology, and the morphometry, morphology and ultrastructure using light microscopy, scanning electron and transmission of the egg, larval stages (miracidium, cercariae and metacercariae) and adult helminth *P. bragai*. The adults pigeons were obtained near the Central de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro S.A, Irajá, Município do Rio de Janeiro. After parasitological examination in the laboratory, to check infection, the pigeons infected were necropsied to collect helminth and infected kidney. The pigeons were used as uninfected controls. The experimental protocols were approved by the ethics committee on research UFRRJ. Histopathology showed dilatation of the renal tubules, with mononuclear inflammatory cells, formation of papilliform structure projecting into the tubular lumen and metaplasia of the epithelium of the collecting tubule walls, from simple cubic in the tubules uninfected to pseudostratified in infected kidney with *P. bragai*. The eggs are elliptical, with operculum at the anterior end and a knot at the posterior end, abopercular region. The eggshell is rough and composed of three layers: inner, middle and outer with thicknesses and different electrondense. The miracidium is elongated, with *terebratorium* the anterior end and body covered with cilia. The cercariae have cylindrical body that tapers slightly in the posterior region. The tegument is rough, the oral sucker is subterminal, the acetabulum stands in the middle third of the body. Papillae were observed around the oral sucker. A similar rudimentary tail structure was observed in some cercariae. The metacercariae observed through histological sections visualized the oral sucker, acetabulum, scales and cyst that consist of three layers, inner, middle and outer, of different thicknesses. The presence of the layers was confirmed by visualization of histological sections of metacercariae in scanning electron microscopy. The adult parasite is elongated and flattened body with oral sucker, pharynx, vitelline glands extending to the region of cecal bifurcation and then the median region of the body. The genital pore visualized a structure that is everted the cirrus in rosette form. In the adult stage the tegument is covered with scales of various types; simple scales, with two, three, four, five and seven divisions, a characteristic that may contribute to ratify the taxonomic classification of the parasite.

Key words: *Paratanaisia bragai*, morphology, Digenea, light microscopy, electron microscopy

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho esquemático das estruturas do tegumento de *Fasciola hepatica*. (bm) membrana basal; (bv) vacúolos basais; (cm) musculatura circular; (cv) vacúolos citoplasmáticos; (df) massa difusa; (er) retículo endoplasmático; (g) Golgi; (it) material intersticial; (iv) invaginações da membrana plasmática; (lm) musculatura longitudinal; (m) mitocôndria; (n) núcleo; (pa) células do parênquima; (pt) tubos protoplasmáticos; (pv) vesícula pinocitótica; (sp) espinho; (v) vale. Adaptado de Threadgold (1963). 5
- Figura 2** Diagrama de um folículo vitelogênico. Célula A é imatura; Células B e C representam células com aumento da maturidade; D é uma célula madura que está livre do folículo. NC é o principal corpo citoplasmático de uma célula enfermeira; suas extensões citoplasmáticas envolvem as células vitelinas em desenvolvimento. im, material intersticial; p, célula parenquimatososa. Fonte: Irwin e Threadgold (1970). 8
- Figura 3** Micrografia eletrônica do folículo vitelogênico de *Metadana depressa*, que apresenta vários estágios de desenvolvimento (I, II, III e IV). Barra de escala = 4 μ m. P: parênquima. Fonte: Greani et al. (2012). 10
- Figura 4** Diagrama mostrando os quatro estágios da vitelogênese de *Metadana depressa*. (A): estágio I; (B): estágio II; (C): estágio III; (D): estágio IV. Barra de escala = 2 μ m. Chr: Cromatina; ELM: Matriz eletrônica-lucente; ER: Retículo Endoplasmático Rugoso; G: Grânulos de glicogênio; GC: Complexo de Golgi; LD: Partícula lipídica; M: Mitocôndria; N: Núcleo; NI: Nucléolo; Np: Poro nuclear; SG: Glóbulo da casca; SGC: Aglomerado do glóbulo da casca. Fonte: Greani et al. (2012). 11
- Figura 5** Micrografia eletrônica da oogênese de *Metadana depressa*. A. Oogônia com pouca quantidade de citoplasma apresentando reduzido número de mitocôndrias e retículo endoplasmático liso e muitos ribossomos livres. Barra de escala = 1 μ m. B. Oócito primário com grande núcleo que apresenta heterocromatina condensada. Barra de escala = 1 μ m. C. Complexo sinaptonêmico indicando o zigóteno-paquítenu estágio da primeira divisão meiótica. Barra de escala = 1 μ m. D. Visão geral de uma célula germinativa totalmente madura. Barra de escala = 2 μ m. CB: Corpo cromatóide; CG: Grânulos corticais; GER: Retículo endoplasmático granular; M: Mitocôndria; N: Núcleo, NI: Nucléolo; SC: Complexo sinaptonêmico; sER: Retículo endoplasmático liso. Fonte: Greani et al. (2012). 13
- Figura 6** Diagrama mostrando os três estágios da oogênese de *Metadana depressa*. (A): Oogônia; (B): oócito primário; (C): oócito maduro. Barra de escala = 2 μ m. CB: Corpo cromatóide; CG: Grânulo cortical; Chr: Heterocromatina; GER: Retículo Endoplasmático Granular; M: Mitocôndria; NI: Nucléolo; Np: Poro nuclear; R: Material ribossômico perinuclear; SC: Complexo sinaptonêmico; sER: Retículo endoplasmático liso. Fonte: Greani et al. (2012). 14

Figura 7.	Escamas de <i>Paratanaisia</i> . A. Escama de <i>Paratanaisia bragai</i> . B. Escama de <i>Paratanaisia robusta</i> .	21
Figura 8.	Esquema do ciclo biológico de <i>Paratanaisia bragai</i> . Fonte das imagens: Autora	23
Figura 9.	Distribuição geográfica de <i>Subulina octona</i> .	27
Figura 10.	Distribuição geográfica de <i>Leptinaria unilamellata</i> .	28
Figura 11.	Vista geral dos moluscos utilizados no processo de infecção experimental. A. <i>Subulina octona</i> . B. <i>Leptinaria unilamellata</i> .	30
Figura 12.	Infecção de <i>Subulina octona</i> e <i>Leptinaria unilamellata</i> com ovos de <i>Paratanaisia bragai</i> . A. <i>Columba livia</i> . B. Rim de <i>C. livia</i> . C. Rim dilacerado de <i>C. livia</i> . D. Rim (k) de <i>C. livia</i> parasitado por <i>P. bragai</i> . (p). E. <i>Paratanaisia bragai</i> obtida do rim de <i>C. livia</i> infectado. F. Ovos de <i>P. bragai</i> . G. Moluscos <i>S. octona</i> expostos aos ovos de <i>P. bragai</i> contidos na alface.	32
Figura 13	Distribuição geográfica de <i>Paratanaisia bragai</i>	37
Figura 14.	Rim de <i>Columba livia</i> . A. Secção do rim (k) naturalmente parasitado por <i>Paratanaisia bragai</i> (p) no interior dos túbulos renais, evidenciando a coloração castanha escura. Barra de escala = 10 mm. B. Região medular do rim não infectado, mostrando os túbulos coletores (tc) com revestimento cúbico simples. Tricrômico de Gomori. Barra de escala = 20 µm. C. Região medular do rim naturalmente infectado com <i>Paratanaisia bragai</i> , mostrando os túbulos coletores (tc) dilatados pela presença do parasito (p). Epitélio-pseudoestratificado, com núcleos (setas finas) em diferentes alturas. Processo inflamatório (setas largas). Tricrômico de Gomori. Barra de escala = 20 µm. D. Formação de uma estrutura digitiforme - formação papilífera (pa) nos túbulos coletores projetando-se para a luz tubular. Tricrômico de Gomori. Barra de escala = 50 µm. E e F. Microscopia eletrônica de varredura da lâmina com cortes histológicos. Evidência do epitélio-pseudoestratificado, com núcleos (setas) em diferentes posições, da parede do túbulo coletor após a infecção experimental de <i>P. bragai</i> (p) com os ovos (e) em <i>C. livia</i> . Barra de escala= 30 µm e 40 µm respectivamente.	42
Figura 15	Caracterização da vitelogênese em <i>Paratanaisia bragai</i> através da microscopia eletrônica de transmissão. A e B. Folículos vitelogênicos com células em vários estágios de desenvolvimento (I, II, III e IV) Barra de escala = 5µm e 2µm, respectivamente. No estágio I verifica-se o núcleo (n), cromatina (ch) e mitocôndria (mi). No estágio II observa-se o núcleo (n), cromatina (ch), mitocôndrias (mi) e aglomerados de glóbulos da casca (sgc). No estágio III há o núcleo (n), aglomerados de glóbulos da casca (sgc) e matriz eletrônica-lucente (elm). O estágio IV apresenta o núcleo (n), cromatina (ch), com numerosos glóbulos da casca (sgc) e matriz eletrônica-lucente (elm). C. Detalhe do estágio III com a presença de retículo endoplasmático (ER) próximo ao núcleo (n), presença de mitocôndrias (mi) e aglomerados da	

casca (sgc). Barra de escala = 2µm. D. Detalhe de vários aglomerados de glóbulos da casca (sgc) e os glóbulos da casca (sg) em seu interior. Barra de escala = 2µm.

46

Figura 16 Caracterização da oogênese em *Paratanaisia bragai* através da microscopia eletrônica de transmissão. A. Visão geral da gônada contendo os estágios I, II e III. No estágio I identifica-se o núcleo (n) e manchas de cromatina (ch), no estágio II, localiza-se o núcleo (n) e o nucléolo (nl) e o estágio III visualiza-se o núcleo (n). Barra de escala = 10µm. B. Detalhe dos três estágios. Estágio I visualiza-se o núcleo (n) e mitocôndrias (mi), assim como no estágio III e II, que também possui um nucléolo (nl) bem definido. Barra de escala = 2µm.

49

Figura 17 Caracterização da oogênese em *Paratanaisia bragai* através da microscopia eletrônica de transmissão. A. Detalhe do estágio II com a presença do núcleo (n), nucléolo (nl) e o complexo sinaptonêmico (sc). Barra de escala = 10µm. B. Detalhe do estágio III com núcleo (n) e aglomerados de mitocôndrias (mi), além disso, a visualização de uma célula acessória na periferia (cs) da gônada onde se verificou a matriz extracelular (ecm) e a camada fibrosa extracelular (fl). Barra de escala = 5µm. C. Visualização de uma célula acessória (cs) entre as células da oogênese, no detalhe uma célula em estágio III. Barra de escala = 5µm. D. Detalhe das mitocôndrias (mi). Barra de escala = 2µm.

50

Figura 18. Morfologia dos ovos de *Paratanaisia bragai*. A. Desenhos dos ovos elaborados ao estereomicroscópio com câmara clara. Barra de escala = 50 µm. B. Vista geral dos ovos, observados na microscopia de campo claro. Barra de escala = 70 µm. C. Vista geral dos ovos, evidenciando a região do opérculo (op), observados na microscopia de campo claro. Barra de escala = 20 µm. D. Ovo com o miracídio (m) em seu interior, evidenciando a extremidade anterior (ae) mostrando a região do opérculo (op) e a extremidade posterior (pe). O ponto de inserção do opérculo no ovo é mostrado pelas setas, observado na microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Barra de escala = 7 µm.

55

Figura 19. Ovos de *Paratanaisia bragai*. A. Vista geral de um conjunto de ovos presentes no parasito adulto, após seu rompimento, observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 100 µm. B. Vista geral de um ovo, evidenciando a presença da região do opérculo (op) e a região abopercular, com o nó (no), observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 10 µm. C. Vista superior da região opercular (op), observado ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 10 µm. D. Vista lateral da região opercular (op) e do nó (no) da região abopercular, observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 10 µm. E. Vista lateral da região do opérculo (op) e vista superior do nó (no) na região abopercular, observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 10 µm. F. Detalhe da superfície do ovo, evidenciando superfície lisa com aspecto poroso. Barra de escala = 10 µm. G. Observação dos ovos inseridos no interior do parasito, evidenciando um ovo sem opérculo (osp), observados ao microscópio eletrônico de varredura.

Figura 20. Ovo de *Paratanaisia bragai* observados ao microscópio eletrônico de transmissão. A. Ovo evidenciando sua casca (s) e a extremidade anterior (ae) mostrando a região do opérculo (op). O ponto de inserção do opérculo no ovo é mostrado pelas setas. Barra de escala = 1 μm . B. Detalhe das camadas da casca do ovo. Camada externa (el), a camada média (mel), mais espessa, e a camada interna (il). Barra de escala = 2 μm . C. Ovo fixado, indicado pelas setas, no tecido. Barra de escala = 2 μm . D. Detalhe de dois pontos de fixação, indicado pelas setas, do ovo com o tecido. Barra de escala = 2 μm . E. Ovo evidenciado a região do opérculo (op) e o ponto de inserção do opérculo no ovo mostrado pelas setas na extremidade anterior (ae). A extremidade posterior (pe), região abopercular apresenta um ponto de fixação no tecido, mostrado pelas setas. Barra de escala = 5 μm .

57

Figura 21. Miracídio de *Paratanaisia bragai*. A. Ovo com linha de sutura (ls) do opérculo, seta mais fina, e a abertura da casca (s) do ovo, seta mais larga, na ruptura da casca do ovo produzida pela pressão da lamínula, visualizando o miracídio (m), observado na microscopia de luz de campo claro. Barra de escala = 7 μm . B. Miracídio (m) mostrando a extremidade anterior (ae), com o terebratorium (t), extremidade posterior (pe) e os cílios (ci), observados na microscopia de interferência diferencial (DIC). Barra de escala = 7 μm . C e D. Miracídio (m) no interior do ovo, evidenciado por sua casca (s), e as células germinativas demonstradas pelas setas, observados na microscopia eletrônica de transmissão. Barra de escala = 2 μm

60

Figura 22. Cercária de *Paratanaisia bragai* utilizando a microscopia de luz. A. Vista geral de uma cercária mostrando o corpo com a ventosa oral (vo) na extremidade anterior e o acetábulo (a) no terço médio do corpo, além da presença da vesícula excretora (eb). Barra de escala = 20 μm . B. Vista geral de uma cercária com detalhe para a ventosa oral (os) e o acetábulo (a). Barra de escala = 20 μm . C. Cercária com ventosa oral (os) e o acetábulo (a), além da visualização de uma estrutura semelhante a uma cauda rudimentar (seta). Barra de escala = 20 μm . D. Detalhe do acetábulo de uma cercária. Barra de escala = 7 μm .

63

Figura 23. Cercária e metacercária de *Paratanaisia bragai* utilizando a microscopia eletrônica de varredura. A. Vista geral de uma cercária mostrando o corpo com a ventosa oral (vo) na extremidade anterior e o acetábulo (a) no terço médio do corpo. Barra de escala = 100 μm . B e C. Vista geral de uma cercária com detalhe para a ventosa oral (os) e o acetábulo (a), além da visualização de uma estrutura semelhante a uma cauda rudimentar (seta). Barra de escala = 50 μm e 100 μm , respectivamente. D, E e F. Detalhe da estrutura semelhante à cauda rudimentar (seta) na região posterior de uma cercária. Barra de escala = 20 μm , 40 μm e 20 μm , respectivamente.

64

Figura 24. Região anterior da cercária de *Paratanaisia bragai* utilizando a microscopia eletrônica de varredura. A. Detalhe da ventosa oral (os). Barra de escala = 20 μm . B, C e D. Ventosa oral (os) com presença de papilas (setas). Barra de escala = 40 μm , 20 μm e 10 μm , respectivamente. E. Vista geral do

- tegumento da cercária da ventosa oral (os) até o acetábulo (a). Barra de escala = 20 μm . F. Detalhe do tegumento irregular. Barra de escala= 5 μm . 65
- Figura 25** Região do terço médio da cercária de *Paratanaisia bragai* utilizando a microscopia eletrônica de varredura. A, B, C e D. Diferentes formações de acetábulo (a) das cercárias visualizadas. Barra de escala = 20 μm , 40 μm , 20 μm e 20 μm , respectivamente. E. Detalhe de uma escama (sc) com várias divisões próximas a região do acetábulo (a). Barra de escala= 10 μm . 66
- Figura 26.** Metacercária de *Paratanaisia bragai* visualizadas através de cortes histológicos de *Leptinaria unilamellata* infectada. A. Vista geral da metacercária, corada com tricrômico de Gomori, evidenciando a ventosa oral (os) e o acetábulo (a). Barra de escala = 20 μm . B. Metacercária, corada com tricrômico de Gomori, evidenciando o acetábulo (a), o núcleo (n) das células e a presença de escamas (sc). Barra de escala= 20 μm . C. Metacercária, corada com tricrômico de Gomori, com a visualização das camadas da parede do cisto, camada externa (el), camada média (mel) e camada interna (il), além das escamas (sc). Barra de escala = 20 μm . D. Metacercária, corada com Hematoxilina-Eosina, evidenciando o acetábulo. Barra de escala= 20 μm . 73
- Figura 27.** Metacercária de *Paratanaisia bragai*. A. Metacercária, não fixada, em vista geral, evidenciando a ventosa oral (os), o acetábulo (a) e as camadas da parede do cisto, camada externa (el), camada média (mel) e camada interna (il). Barra de escala = 20 μm . B. Metacercária, não fixada, em vista geral, evidenciando a ventosa oral (os), o acetábulo (a) e a faringe (ph). Barra de escala= 20 μm . C. Vista geral de uma metacercária, fixada, evidenciando a ventosa oral (os) e o acetábulo (a) e as camadas do cisto, camada externa (el), camada média (mel) e camada interna (il).. Barra de escala = 20 μm . D. Metacercária visualizada em microscopia eletrônica de varredura. Barra de escala= 50 μm . 74
- Figura 28.** Metacercária de *Paratanaisia bragai*, visualizada através da microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos do tecido infectado de *Leptinaria unilamellata*. A. Visão geral das metacercárias no tecido (ti) infectado do molusco. Barra de escala = 50 μm . B. Detalhe da estrutura da parede do cisto da metacercária presente no tecido (ti) do molusco infectado, evidenciando a camada externa (el), camada média (mel) e camada interna (il), além disso, a camada externa apresenta-se porosa (retângulo). Barra de escala= 10 μm . C. Metacercária no tecido (ti) infectado do molusco, evidenciando a ventosa oral (os) e o acetábulo (a). As setas demonstram o contato da parede do cisto da metacercária com o tecido de *L. unilamellata*. Barra de escala= 30 μm . 75
- Figura 29.** Estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia de luz. A. Vista geral do helminto com destaque para a ventosa oral (os), a faringe (ph) e o acetábulo (a). Barra de escala = 200 μm . B. Vista geral do helminto com destaque para a ventosa oral (os), a faringe (ph), o ovário (o), os cecos intestinais (ic), o acetábulo (a) e glândulas vitelogênicas (vg). Barra de escala = 200 μm . C. Detalhe da ventosa oral (os) e da faringe (ph).

- Barra de escala = 40 μm . 82
- Figura 30** Estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia de luz. A. Vista geral do helminto com destaque para a ventosa oral (os), a faringe (ph) e o acetábulo (a). Barra de escala = 200 μm . B. Vista geral do helminto com destaque para a ventosa oral (os), a faringe (ph), o ovário (o), os cecos intestinais (ic), o acetábulo (a) e glândulas vitelogênicas (vg). Barra de escala = 200 μm . C. Detalhe da ventosa oral (os) e da faringe (ph). Barra de escala = 40 μm . 83
- Figura 31.** Região do terço médio do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de varredura. A, B, C e D. Diferentes visualizações do acetábulo (a), evidenciando a presença de papilas (as) ao seu redor e uma área (*) sem a presença de escamas. Barra de escala = 50 μm , 30 μm , 40 μm e 50 μm , respectivamente. 84
- Figura 32.** Estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observado através da microscopia eletrônica de varredura. A. Vista geral do helminto, na região ventral, evidenciando a ventosa oral (os), a localização do poro genital (gp) e do acetábulo (a). Barra de escala = 500 μm . B. Detalhe da presença do poro genital (gp) e do acetábulo (a). Barra de escala = 200 μm . C. Detalhe do poro genital (pg) com a presença do cirro (c) evertido. Barra de escala = 30 μm . D. Detalhe do poro excretor na região dorsal posterior. Barra de escala= 100 μm . 85
- Figura 33** Tegumento de *Paratanaisia bragai*. A. Através da microscopia eletrônica varredura visualizou-se o tegumento (te) enrugado, na raiz de uma escama bífida (bsc) na região ventral do corpo do parasito. Barra de escala = 10 μm . B. Tegumento (te) com invaginações (seta larga) observado através da microscopia eletrônica de transmissão, com visualização das escamas (sc), musculatura circular (cm), musculatura longitudinal (lm) e célula subtegumental (stc). Barra de escala = 2 μm . C. Região anterior do corpo do helminto verificada através da microscopia eletrônica de transmissão, com a presença do tegumento (te), musculatura circular (cm), musculatura longitudinal (lm) e musculatura diagonal (dm). Barra de escala = 1 μm . 87
- Figura 34.** Escamas presentes no tegumento do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). A. Região anterior do corpo do helminto, com detalhe para as escamas (sc) presentes na lateral do corpo do parasito. Barra de escala = 70 μm . B e C. Região média do corpo do helminto, com detalhe para as escamas (sc). Barra de escala = 20 μm . D. Região posterior do parasito evidenciando as escamas presentes na lateral do corpo. Barra de escala = 70 μm . 89
- Figura 35.** Escamas presentes no tegumento do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de varredura. A. Região anterior do corpo do helminto, a partir da ventosa oral (os), com detalhe para as escamas simples (es), escamas bífidas (eb), escamas trífidas (et), no tegumento (t). Barra de escala = 50 μm . B. Região do terço médio do corpo

do parasito, ao redor da região do acetábulo (a), evidenciando as escamas simples (es), escamas bífidas (eb), escamas trífidas (ts), escamas com 4 divisões (seta laranja), escamas com 5 divisões (círculo vermelho). Barra de escala = 50 μm . C. Região posterior do corpo do helminto, com detalhe para o poro excretor (ep) e as escamas presentes na região. Barra de escala = 100 μm . D. Destaque para as escamas simples (es), bífidas (eb), com 4 divisões (seta laranja) e com 7 divisões (círculo preto) da região posterior do corpo do helminto. Barra de escala = 30 μm .

91

Figura 36. Escamas presentes no tegumento do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de transmissão. A. B e C. Diferentes visualizações de escamas (sc) presentes no tegumento (te). Barra de escala = 2 μm , 5 μm e 1 μm , respectivamente.

92

Figura 37. Escamas presentes no tegumento do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de varredura. A. Escamas que aparentam a divisão da lâmina (círculos tracejados em branco) e a presença de uma papila (pa) entre as escamas. Barra de escala = 40 μm . B. Escamas que aparentam a divisão da lâmina (círculos tracejados em branco). Barra de escala = 30 μm . C. Detalhe de uma escama bífida que aparenta uma divisão se sua lâmina para a formação de uma escama trífida. Barra de escala = 10 μm .

95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Desenvolvimento larval de <i>Paratanaisia bragai</i> (BRANDOLINI e AMATO, 2006).	33
Tabela 2.	Detalhamento da distribuição geográfica de <i>Paratanaisia bragai</i> .	38
Tabela 3.	Medidas dos ovos de <i>Paratanaisia bragai</i> .	52
Tabela 4.	Medidas da espessura da casca do ovo de <i>Paratanaisia bragai</i> realizada com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão.	54
Tabela 5.	Medidas comparativas das cercárias de <i>Paratanaisia bragai</i> .	67
Tabela 6.	Medidas comparativas das metacercárias de <i>Paratanaisia bragai</i> através de diversas técnicas e com outros autores.	69
Tabela 7.	Medidas da espessura do cisto da metacercária de <i>Paratanaisia bragai</i> realizada com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos do tecido infectado de <i>Leptinaria unilamellata</i> .	71
Tabela 8.	Medidas comparativas de determinadas estruturas do estágio adulto de <i>Paratanaisia bragai</i> .	80
Tabela 9.	Medidas comparativas, em μm , das escamas presentes no tegumento de <i>Paratanaisia bragai</i> .	96
Tabela 10.	Medidas das escamas presentes no tegumento de <i>Paratanaisia bragai</i> , observadas através da microscopia eletrônica de varredura.	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Filo Platyhelminthes	3
2.2 Morfologia geral dos trematódeos digenéticos	3
2.2.1 Adulto	3
2.2.1.1 Tegumento	3
2.2.1.2 Sistema digestório e excretor	6
2.2.1.3 Sistema reprodutor	6
2.2.1.3.1 Vitelogênese e oogênese	7
2.2.2 Ovo	15
2.2.3 Desenvolvimento ontogenético	15
2.2.3.1 Miracídio	16
2.2.3.2 Cercária	17
2.2.3.3 Metacercária	18
2.3 Classificação Taxonômica de <i>Paratanaisia bragai</i>	19
2.4 Ciclo biológico de <i>Paratanaisia bragai</i>	22
2.5 Biologia e ecologia de <i>Subulina octona</i> e <i>Leptinaria unilamellata</i>	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Estabelecimento da colônia de moluscos em laboratório	29
3.2 Coleta de <i>Columba livia</i>	31
3.3 Obtenção do rim de <i>Columba livia</i> e dos ovos de <i>Paratanaisia bragai</i> para infecção	31
3.4 Infecção experimental de <i>Subulina octona</i> com ovos de <i>Paratanaisia bragai</i>	31
3.5 Obtenção dos adultos e ovos de <i>Paratanaisia bragai</i> para a microscopia	33
3.6 Obtenção das larvas a partir da infecção de <i>Subulina octona</i> e <i>Leptinaria unilamellata</i> por <i>Paratanaisia bragai</i> para microscopia	33
3.7 Obtenção do rim de <i>Columba livia</i> infectada com <i>Paratanaisia bragai</i> para histologia e microscopia eletrônica de varredura e processamento histológico	33
3.8 Microscopia de luz	34
3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura	34
3.9.1 Adesão em gelatina	34
3.9.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das lâminas de histologia	35
3.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão	35
3.12 Histologia	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Distribuição geográfica de <i>Paratanaisia bragai</i>	36
4.2 Aspectos histopatológicos do rim do <i>Columba livia</i> infectada por <i>Paratanaisia bragai</i>	41
4.3 Vitelogênese e oogênese em <i>Paratanaisia bragai</i>	45
4.4 Ovos de <i>Paratanaisia bragai</i> : microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e morfometria	52
4.5 Miracídio de <i>Paratanaisia bragai</i>	58
4.6 Cercárias de <i>Paratanaisia bragai</i>	61
4.7 Metacercárias de <i>Paratanaisia bragai</i>	68
4.8 Adulto	76

4.8.1 Tegumento do estágio adulto de <i>Paratanaisia bragai</i>	86
4.8.1.1 Escamas	88
5 CONCLUSÕES	100
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 INTRODUÇÃO

Paratanaisia bragai (Santos, 1934) Freitas, 1959 é um trematódeo eucotylídeo que matura nos ductos coletores de aves domésticas e silvestres e apresenta como hospedeiros intermediários os moluscos *Subulina octona* (Bruguière, 1798). Além de *S. octona*, *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1837) também pode ser considerada hospedeiro intermediário no Brasil (BRANDOLINI et al. 1997).

Os ovos embrionados são liberados com os produtos de excreção do hospedeiro definitivo e a infecção no molusco se estabelece de forma passiva. Após a eclosão do miracídio, desenvolvem-se no interior do molusco duas gerações de esporocistos, cercárias e metacercárias. O hospedeiro definitivo adquire a infecção pela ingestão do molusco parasitado (MALDONADO, 1945a; KELLER e ARAÚJO, 1992; BRANDOLINI e AMATO, 2006).

No Brasil foram realizados alguns estudos sobre a ocorrência, prevalência e patologia causada por *P. bragai* nos seguintes hospedeiros definitivos: *Columba livia* (Gmelin, 1789), *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) (SANTOS, 1934); *Odontophorus capueira* (Spix, 1825), *Meleagris gallopavo* (Linnaeus, 1758) (FRANCO, 1965) e *Columbina talpacoti* (Temminck, 1811) (PINTO et al., 2004), evidenciando a sua importância médico-veterinária.

A patologia provocada pelo parasito no rim hospedeiro definitivo, como dilatação dos túbulos coletores, infiltrado inflamatório de células, parede do túbulo apresentando epitélio multiestratificado ou com células achatadas, na análise microscópica e alargamento do rim na visão macroscópica foram observadas por diversos autores, com diferentes espécies de hospedeiros: Santos (1934) nos rins de pombos *C. livia* e galinhas *G. gallus* no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Barretto e Filho (1942) em *Meleagris gallopavo domestica*, Portugal et al. (1972) em *Columba livia domestica*, Anizaut et al. (1992) em *Columba inornata wetmorei*, Menezes et al. (2001) em *Numida meleagris*. Brandolini (2000), em *C. livia* e Pinto et al. (2004), em *C. talpacoti*. Gomes et al. (2005) em *Phasianus colchius* Linnaeus, 1758.

De acordo com Gomes et al. (2005) a ocorrência de *P. bragai* é comum nas aves domésticas no Estado do Rio de Janeiro. Quando há uma infecção de média intensidade, não se verifica a reação inflamatória, como observado por Pinto et al. (2004), ou seja, *P. bragai* apresenta baixa patogenicidade. No entanto, uma elevada carga parasitária poderia ser responsável pelo desenvolvimento da monostomose renal que se caracteriza pela perda de peso das aves, diarreia intermitente com sangue e muco, podendo até mesmo levar à morte (ARNIZAUT et al. 1992).

De acordo com Gomes et al. (2005), o local da infecção, linhagem do parasito e do hospedeiro podem determinar a gravidade das lesões.

A literatura apresenta trabalhos sobre a morfologia de *P. bragai*, no estágio adulto, ovos e estágios larvais (SANTOS, 1934; TUBANGUI e MASILUÑGAN, 1941; MALDONADO, 1945a; STUNKARD, 1945; BYRD e DENTON, 1950; FREITAS, 1951; BRANDOLINI e AMATO, 2006; BRANDOLINI e AMATO, 2007). Através da microscopia eletrônica de varredura Brandolini e Amato (2007) analisaram a morfologia externa do estágio adulto de *P. bragai* e verificaram tegumento irregular e bastante enrugado, com presença de escamas, simples e bífidas.

A utilização da microscopia eletrônica proporciona consideráveis avanços no conhecimento acerca da morfologia das espécies de trematódeos. Através das informações obtidas por esta técnica, há possibilidades de uma maior compreensão sobre aspectos da biologia, dos processos imunológicos, fisiológicos e bioquímicos da relação parasito hospedeiro. Além disso, novos caracteres morfológicos podem ser elucidados, incluindo seus

papéis funcionais, permitindo assim, a inclusão desses caracteres na taxonomia e sistemática dos grupos de trematódeos.

Objetivo Geral:

Analisar a morfologia dos ovos, larvas (miracídio, cercária e metacercária) e adulto de *P. bragai*, assim como as alterações histológicas surgidas no rim do hospedeiro definitivo infectado.

Objetivos específicos:

- Realizar estudo histopatológico do rim de *Columba livia* naturalmente infectada com *P. bragai*.
- Descrever caracteres morfológicos e realizar a análise morfométrica dos ovos de *P. bragai* utilizando a microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e transmissão.
- Analisar a morfologia dos miracídios de *P. bragai* através da microscopia eletrônica de luz e eletrônica de transmissão.
- Descrever a topografia, morfologia de superfície e análise morfométrica das cercárias de *P. bragai*, através das microscopias de luz e eletrônica de varredura.
- Descrever a morfologia e verificar aspectos morfométricos das metacercárias de *P. bragai* por meio da microscopia de luz. Além, de analisar através da microscopia de varredura a parede do cisto das metacercárias.
- Descrever e caracterizar a vitelogênese e oogênese de *P. bragai* através da microscopia eletrônica de transmissão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Filo Platyhelminthes

Os Platyhelminthes apresentam simetria bilateral, extremidade anterior com presença de órgãos sensitivos e de fixação, achatados dorsoventralmente, não apresentando cavidade celômica, logo todos os órgãos estão mergulhados no parênquima, também não possuem sistema esquelético, circulatório ou respiratório e o sistema digestório, quando presente, não possui abertura anal. O sistema excretor é caracterizado pela presença de protonefrídios, com células-flama ou solenócitos (NEVES, 2010; REY, 2008).

A sistemática do grupo dos platelmintos vem passando por várias mudanças, pois ainda não se chegou a um consenso entre os pesquisadores, sendo assim, dependendo do autor os platelmintos possuem três (Turbellaria, Trematoda e Cestoda) ou quatro classes, com a inclusão de Monogenea (NEVES, 2010). Digenea pode ser classificada como ordem (BOWMAN, 2006), como classe (REY, 2008), um grupo (NEVES, 2010), e como subclasse (ROBERTS e JANOVY, 2009; GIBSON, 2002).

Gibson (2002) afirma que a classe Trematoda inclui parasitos geralmente de órgãos internos, primariamente de moluscos, onde há o desenvolvimento de estágios larvais. Os adultos, frequentemente, apresentam duas ventosas, uma geralmente na região anterior e a outra ventral ou posterior. O tegumento sincicial pode apresentar ornamentações, tais como espinhos e papilas. A cavidade oral, geralmente encontra-se na interior da ventosa oral, seguida de pré-faringe, faringe muscular, intestino, frequentemente, bifurcado, algumas vezes com um ceco, que raramente está ausente. Outras vezes o ceco é ramificado e termina em fundo cego. Normalmente são hermafroditas.

Os trematódeos são divididos em duas subclasses, segundo Gibson (2002): Aspidogastrea e Digenea. A primeira classe forma um grupo pequeno, incluindo parasitos de moluscos, quelônios e peixes e a segunda classe que compreende mais de 2500 gêneros nominais, e a grande maioria apresenta os moluscos como os primeiros hospedeiros, e vertebrados como hospedeiros definitivos (GIBSON, 2002).

2.2 Morfologia geral dos trematódeos digenéticos

2.2.1 Adulto

2.2.1.1 Tegumento

A denominação tegumento foi proposta por Threadgold (1963) em substituição ao termo cutícula no estudo de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Threadgold (1963) afirma que a palavra tegumento deve ser utilizada em substituição as camadas externa e interna combinadas. A camada externa é sincicial e anucleada, já a camada interna possui núcleo e organelas citoplasmáticas (Figura 1). Sendo assim, o tegumento, conjunto das camadas, não se apresenta inerte, logo a denominação cutícula estaria inapropriada. Devido suas estruturas, o tegumento apresenta funções não somente de proteção, mas também de nutrição (THREADGOLD, 1963; REY, 2008).

De acordo com Hockley (1973) cutícula significa no latim, o diminutivo de cútis, ou seja, pele, enquanto que tegumento significa simplesmente, do latim, revestimento.

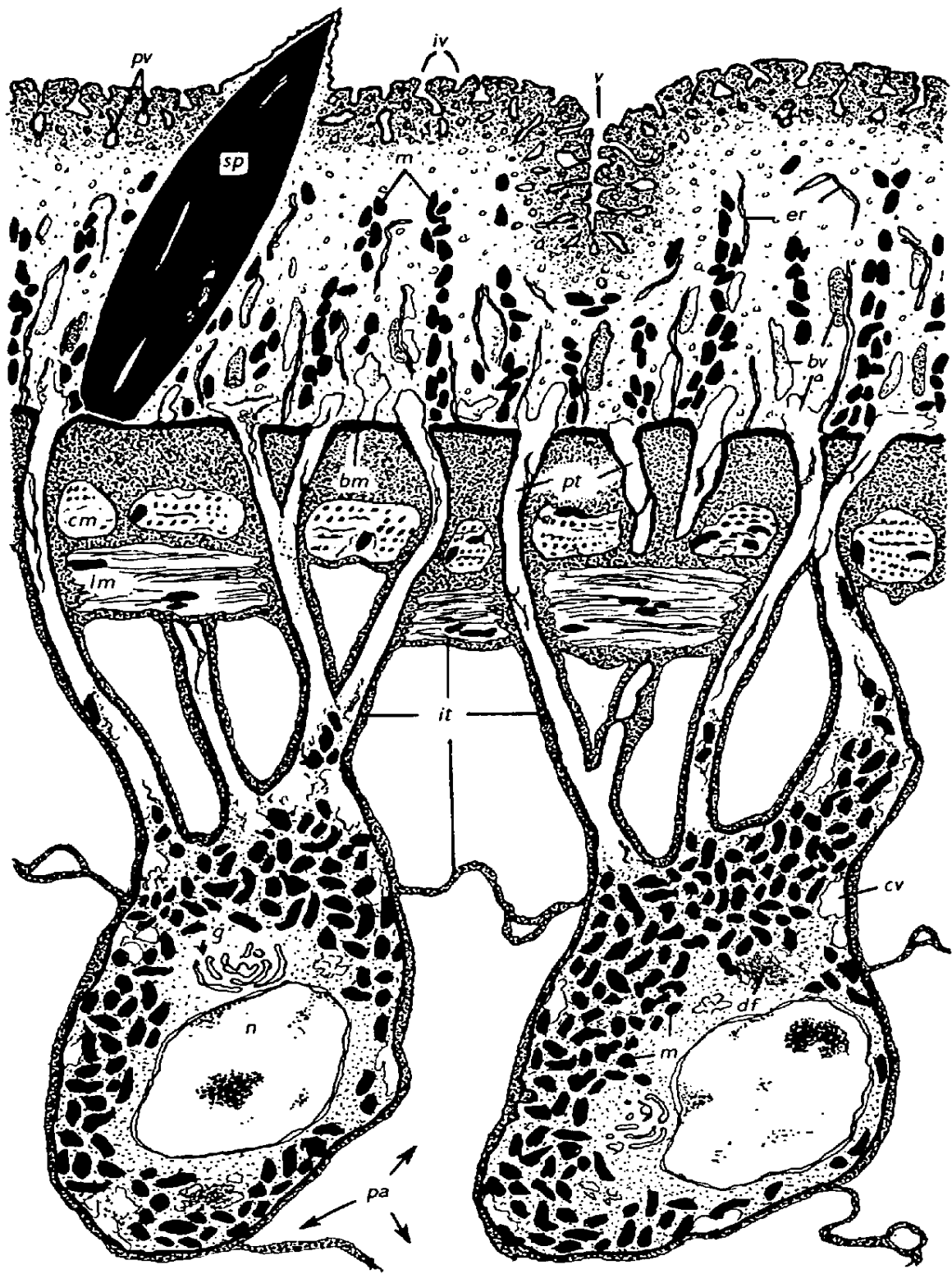
De acordo com Ruppert et al. (2005) os platelmintos parasitos apresentam uma reposição parcial ou total da epiderme celular por uma nova camada não celular, a neoderme ou tegumento. Ehlers (1985) denominou o tegumento de neoderme e verificou seu padrão de

formação. Ao longo do desenvolvimento a epiderme embrionária é substituída por projeções de neoblastos do parênquima que penetram na lâmina basal da epiderme fundindo-se lateralmente com outros neoblastos para a formação da neoderme sincicial. Cada neoblasto apresenta um núcleo que se localiza abaixo da lâmina basal do parênquima, sendo assim, a neoderme encerra o corpo em um sincício. Os platelmintos parasitos formam o grupo neodermata (RUPPERT et al., 2005).

Um sincício representa uma massa citoplasmática com vários núcleos encerrada por uma membrana externa, mas não apresenta as divisões internas, separando as células. Não apresentando, desta forma, espaços intercelulares. Na ausência destes espaços intercelulares, as substâncias que atravessam a parede do corpo passam através do sincício. Sendo assim, a neoderme possibilita a regulação da entrada e saída de substâncias por parte do parasito, bem como, os nutrientes e desafios osmóticos no decorrer do seu ciclo de vida (RUPPERT et al., 2005).

De acordo com Threadgold (1963) em *F. hepatica* a membrana plasmática limita externamente a camada sincicial, e a face interna desta camada é forrada pela membrana basal. O tegumento dos trematódeos de maneira geral é organizado em duas regiões, uma região externa, anuclear, o sincício conectado por pontes citoplasmáticas com a região interna, nucleada localizada abaixo da musculatura, conforme Threadgold (1963) em *F. hepatica* e Leitch et al. (1984) em *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) A superfície dos trematódeos digenéticos apresenta-se de formas variadas dependendo das espécies e das regiões do corpo da mesma espécie analisada. Os espinhos aparecem com frequência na camada sincicial, envoltos pela membrana plasmática. Além dos espinhos, a superfície destes parasitos, pode ser lisa, com escamas ou cerdas, recobrimo totalmente ou parcialmente seu corpo (NEVES, 2010; REY, 2008). Threadgold (1963) verificou em *F. hepatica* a presença de espinhos cuticulares extremamente eletrodensos, afirmando que são amorfos, com pontas afiadas e base plana.

Figura 1. Desenho esquemático das estruturas do tegumento de *Fasciola hepatica*. (bm) membrana basal; (bv) vacúolos basais; (cm) musculatura circular; (cv) vacúolos citoplasmáticos; (df) massa difusa; (er) retículo endoplasmático; (g) Golgi; (it) material intersticial; (iv) invaginações da membrana plasmática; (lm) musculatura longitudinal; (m) mitocôndria; (n) núcleo; (pa) células do parênquima; (pt) tubos protoplasmáticos; (pv) vesícula pinocitótica; (sp) espinho; (v) vale. Adaptado de Threadgold (1963).



2.2.1.2 Sistema digestório e excretor

Os digenéticos, em geral, apresentam sistema digestório incompleto, pois a boca é o único orifício que se comunica com o meio exterior; logo em seguida, aparece o esôfago, presente na maioria dos espécimes, o intestino, que geralmente é bifurcado, terminando em fundo cego, próximo à extremidade posterior (REY, 2008).

Em geral, os digenéticos, possuem duas superfícies que potencialmente apresentam natureza absorptiva; uma superfície externa, o tegumento, e o epitélio intestinal. O trato digestório dos digenéticos é incompleto e o material é digerido, e o que não for processado é regurgitado pela abertura oral (PAPPAS, 1988).

O sistema excretor dos digenéticos apresenta dois tubos protonefridiais, dirigidos posteriormente, dando origem a vesícula excretora, que se abre para o meio exterior através do poro excretor. Protonefrídios são tubos ou túbulos fechado na extremidade proximal e aberto na extremidade distal por meio de um poro (HERTEL, 1993; ROBERTS e JANOVY, 2009). A unidade excretora é a célula-flama, denominada também de solenócito, que varia em número, dependendo da espécie. As células-flama expulsam substâncias nitrogenadas através de canais a que estão ligados que desembocam na vesícula excretora com abertura para o meio exterior, localizada junto à extremidade posterior do helminto (REY, 2008; NEVES, 2010).

A parede tubular do aparelho osmorregulador pode desempenhar a função excretora para os resíduos metabólicos, já que experiências com *Schistosoma* Weinland, 1858 e *Fasciola* Linnaeus, 1758, demonstraram que a presença de cloreto de sódio em várias concentrações, não provocaram alterações do metabolismo desses parasitos (REY, 2008). Senft et al. (1961) verificou, através da microscopia eletrônica, que os adultos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, não teriam problema para conservar seus fluidos corporais, já que os parasitos mantêm uma movimentação constante, quando colocados em solução fisiológica. De acordo com Senft et al. (1961), as células-flama atuam como uma bomba, para a manutenção do fluido corporal do parasito e a presença de uma fina membrana que suporta as células-flama, provavelmente apresentaria alta permeabilidade, que contribuiria para a passagem do fluido corporal, que contém resíduos metabólicos, e estes prontamente passariam, mecanicamente pela atividade dos cílios, pela fina membrana, para o ambiente exterior.

A microscopia eletrônica auxiliou muitos trabalhos na descrição da morfologia de determinados sistemas dos digenéticos, tais como o digestório e excretor. Os cecos intestinais de *S. mansoni*, verificado através da microscopia eletrônica de transmissão, demonstrou que o endotélio era claramente fibrilar, e as fibrilas pareciam surgir da membrana basal. Até mesmo o processo de absorção de nutrientes foi observado, mostrando que o material a ser digerido é aprisionado entre as fibrilas e pequenas depressões do endotélio (SENFTE et al., 1961). As células-flama de *S. mansoni* analisadas por Senft et al. (1961) apresentam caracteristicamente feixes de cílios, de 40 a 80 em número.

A digestão nos trematódeos é predominantemente extracelular, mas a sequência do processo digestivo depende da origem do alimento ingerido e diferentes graus de adaptação do parasito. Trematódeos que se alimentam de sangue, como *S. mansoni*, apresentam mais adaptações, realizando uma digestão rápida com o auxílio de proteinases e aminopeptidases, quando comparados aos parasitos que se alimentam de tecidos (HALTON, 1967; HALTON, 1997).

2.2.1.3 Sistema reprodutor

A maioria dos digenéticos é hermafrodita, com exceção para Schistosomatidae que são dioicos (ROBERTS e JANOVY, 2009; NEVES, 2010).

Geralmente o aparelho reprodutor masculino apresenta dois testículos globosos ou lobados, com canais eferentes que se ligam e formam o canal deferente que se encerra no órgão copulador, o cirro, que é capaz de projetar-se, mediante eversão durante a cópula, este órgão pode estar envolto pela bolsa do cirro (NEVES, 2010; REY, 2008).

O sistema reprodutor feminino apresenta um único ovário, com diversas formas. O oviduto que se origina do ovário, conduz os óvulos até o oótipo. Antes de terminar o oviduto recebe dois canais, o canal de Laurer e o viteloduto, que traz os produtos das glândulas vitelogênicas. O oótipo apresenta ao seu redor, glândulas de Mehlis, que liberam precursores da casca do ovo. É no oótipo que as células-ovo são cercadas por um determinado número de células de vitelo, na superfície desse conjunto celular, compostos fenólicos são oxidados, provocando a tanificação e transformação em escleroproteínas, que confere a formação da casca dos ovos e textura coriácea. Quando saem do oótipo os ovos seguem para o útero que se abre para o exterior ou átrio genital (REY, 2008; ROBERTS e JANOBY, 2009; NEVES, 2010).

O hermafroditismo possibilita a ocorrência da autofecundação nos trematódeos, no entanto, esse tipo de reprodução não é o habitual (REY, 2008; NEVES, 2010).

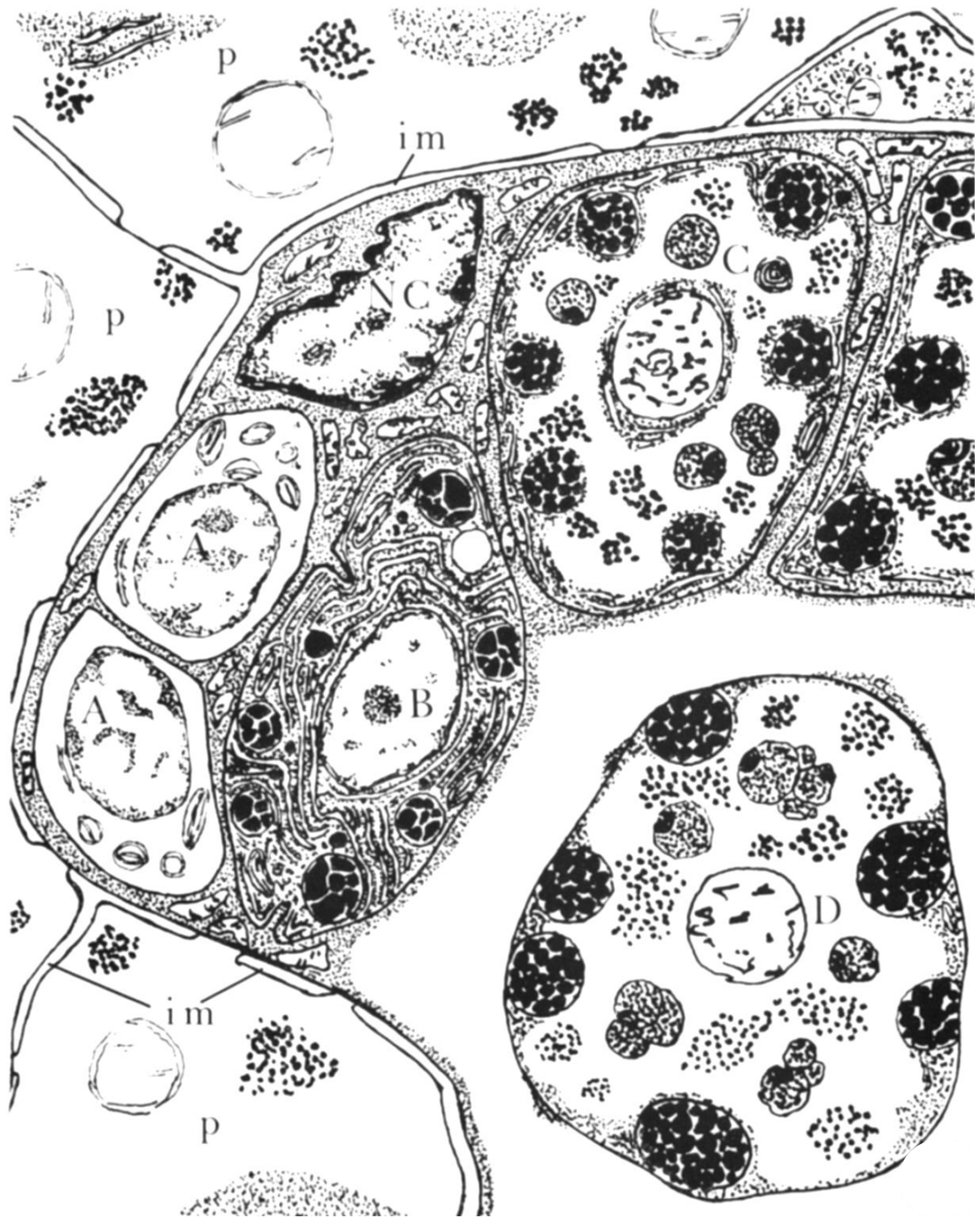
2.2.1.3.1 Vitelogênese e oogênese

Rupert et al (2005) apresentaram uma classificação para o sistema reprodutor feminino dos turbelários. Contudo, um estudo mais abrangente, que incluía também os platelmintos parasitos, ainda não foi realizado. Estudos isolados, sobre o desenvolvimento das células da linhagem vitelogênica, foram realizados com *F. hepatica*, por Irwin e Threadgold (1970) entre outros.

Em *F. hepatica* o estudo das células vitelogênicas através da ultraestrutura, demonstrou a presença de diferentes estágios de desenvolvimento: células imaturas, células com o aumento da maturidade e células maduras, sendo as imaturas localizadas na periferia e as mais maduras no centro do folículo. As células imaturas estariam indiferenciadas e, conseqüentemente, com morfologia característica de células embrionárias. A diferenciação ocorreria pela formação de grande quantidade de grânulos do retículo endoplasmático e a produção de glóbulos de proteínas pelo complexo de Golgi, os quais migram para formar os aglomerados na região periférica da célula. A maturação celular é marcada pela desintegração do retículo endoplasmático e a presença de glicogênio, características que podem ser observadas na (Figura 2) (IRWIN e THREADGOLD, 1970).

Irwin e Threadgold (1970) registram também, a existência de “células enfermeiras” que apresentam prolongamentos citoplasmáticos que envolvem as células vitelinas em desenvolvimento. Sugerindo que as células enfermeiras possam ter a função de selecionar e transportar os materiais necessários para a secreção de proteínas e o armazenamento do glicogênio nas células vitelogênicas. Já que, de acordo com estes autores, as células vitelogênicas, apresentam dupla função, secretam proteínas, para formar a casca dos ovos e de reserva de nutrientes para o desenvolvimento do embrião.

Figura 2. Diagrama de um folículo vitelogênico. Célula A é imatura; Células B e C representam células com aumento da maturidade; D é uma célula madura que está livre do folículo. NC é o principal corpo citoplasmático de uma célula enfermeira; suas extensões citoplasmáticas envolvem as células vitelinas em desenvolvimento. im, material intersticial; p, célula parenquimatosa. Fonte: Irwin e Threadgold (1970).



Greani et al. (2012) verificaram através da ultraestrutura a vitelogênese e oogênese de *Metadena depressa* (Stossich, 1883) Linton, 1910 um digenético da família Cryptogonimidae Ward, 1917. Este trabalho apresenta diagramas que mostram quatro estágios da vitelogênese e os três estágios da oogênese de *M. depressa*.

De acordo com Greani et al. (2012) as glândulas vitelogênicas de *M. depressa* consistem em dois grupos laterais de folículos, e cada folículo contém células vitelogênicas em diferentes estágios de maturação, além disso, as células maduras tendem a se localizar no centro do folículo, não entanto, esta característica não é um padrão, já que os vários estágios de maturação podem ser localizados em qualquer região do folículo. Estes autores observaram quatro estágios de desenvolvimento das células vitelogênicas, assim como pode ser observado nas (Figuras 3 e 4).

No primeiro estágio encontram-se células vitelogênicas imaturas que podem apresentar formas distintas, com a presença de um grande núcleo com cromatina difusa, pouco citoplasma, com ribossomos livres e mitocôndrias com cristas distintas. O segundo estágio apresenta no núcleo manchas eletrondensas de cromatina, que está mais condensada, o citoplasma ainda apresenta mitocôndrias, sendo a principal diferença para o estágio anterior, a presença de glóbulos da casca (“shell globules”), com o complexo de Golgi, bem próximo destes. Às vezes, os glóbulos da casca estão agrupados e cercados por uma membrana. No terceiro estágio a cromatina está ainda mais condensada, cada aglomerado de glóbulo da casca possui uma maior quantidade de glóbulos da casca em seu interior, presença de poucas mitocôndrias, numerosa quantidade de retículo endoplasmático, dispostos em torno do núcleo, além disso, alguns poros nucleares são observados. O quarto estágio apresenta células vitelogênicas maduras que geralmente estão localizadas no centro do folículo, há um grande número de aglomerados de glóbulos da casca dispostos na periferia da célula, apresentando um diâmetro médio de 3 μm e a presença de aproximadamente 45 glóbulos no interior dos aglomerados. Há a redução na quantidade de retículo endoplasmático e de mitocôndrias, sendo esta última organela ausente na maioria das células deste estágio. O núcleo apresenta uma forma mais arredondada e a principal diferença para os demais estágios é a presença de gotículas de lipídios e de glicogênio (GREANI et al., 2012).

Figura 3. Micrografia eletrônica do folículo vitelogênico de *Metadena depressa*, que apresenta vários estágios de desenvolvimento (I, II, III e IV). Barra de escala = 4 um. P: parênquima. Fonte: Greani et al. (2012).

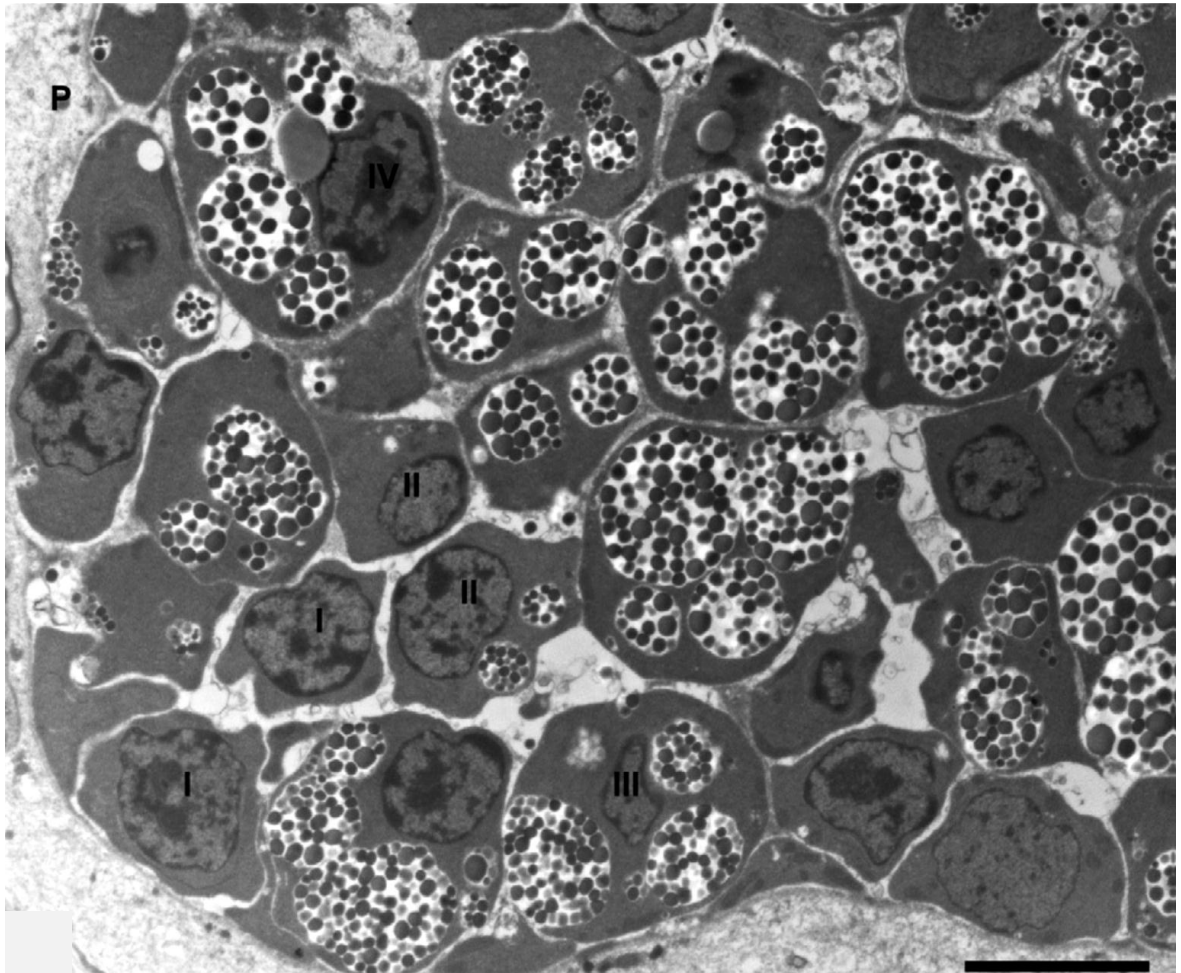
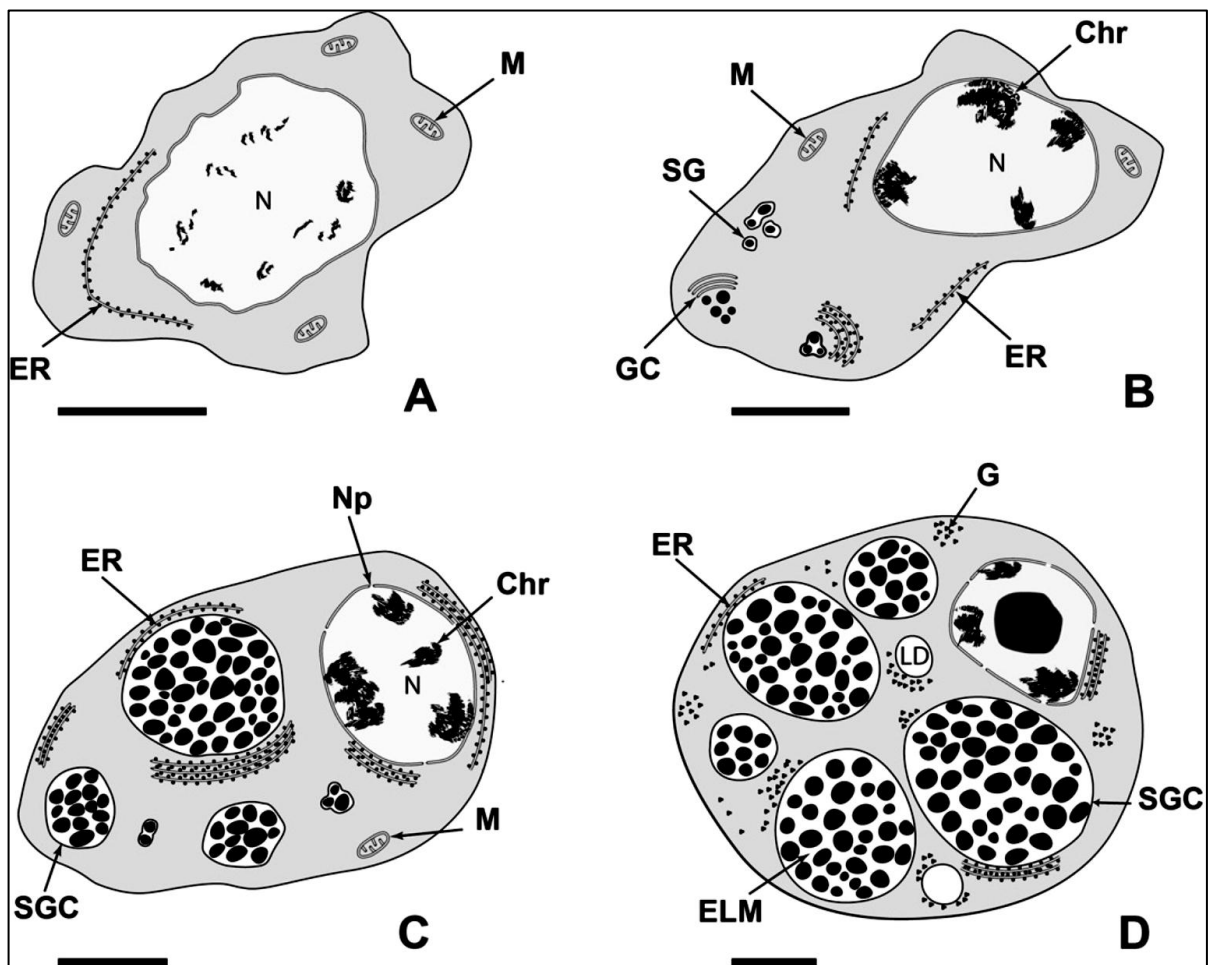


Figura 4. Diagrama mostrando os quatro estágios da vitelogênese de *Metadena depressa*. (A): estágio I; (B): estágio II; (C): estágio III; (D): estágio IV. Barra de escala = 2 μm . Chr: Cromatina; ELM: Matriz eletrônica-lucente; ER: Retículo Endoplasmático Rugoso; G: Grânulos de glicogênio; GC: Complexo de Golgi; LD: Partícula lipídica; M: Mitocôndria; N: Núcleo; NI: Nucléolo; Np: Poro nuclear; SG: Glóbulo da casca; SGC: Aglomerado do glóbulo da casca. Fonte: Greani et al. (2012).



A oogênese de *M. depressa* está dividida em três estágios principais: oogônia, oócito primário e oócito maduro, como podem ser observados nas (Figuras 5 e 6). A oogônia caracteriza-se por sua localização na periferia do ovário próximo da membrana basal, de formato irregular, com núcleo ocupando a maior parte do volume celular, contendo manchas de heterocromatina. O citoplasma apresenta ribossomos livres com poucas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Os oócitos primários estão localizados em uma área distal do ovário, a relação núcleo/citoplasma é ligeiramente menor quando comparada com o estágio anterior. O citoplasma apresenta muitas mitocôndrias. Algumas células tendem a se separar da lâmina basal. Os oócitos maduros, geralmente localizam-se no centro do lóbulo ovariano. A relação núcleo/citoplasma diminui ao longo do processo de maturação devido ao grande aumento do citoplasma. Apresenta muitas mitocôndrias (GREANI et al., 2012).

Figura 5. Micrografia eletrônica da oogênese de *Metadena depressa*. A. Oogônia com pouca quantidade de citoplasma apresentando reduzido número de mitocôndrias e retículo endoplasmático liso e muitos ribossomos livres. Barra de escala = 1µm. B. Oócito primário com grande núcleo que apresenta heterocromatina condensada. Barra de escala = 1µm. C. Complexo sinaptonêmico indicando o zigóteno-paquítenu estágio da primeira divisão meiótica. Barra de escala = 1µm. D. Visão geral de uma célula germinativa totalmente madura. Barra de escala = 2µm. CB: Corpo cromatóide; CG: Grânulos corticais; GER: Retículo endoplasmático granular; M: Mitocôndria; N: Núcleo, NI: Nucléolo; SC: Complexo sinaptonêmico; sER: Retículo endoplasmático liso. Fonte: Greani et al. (2012).

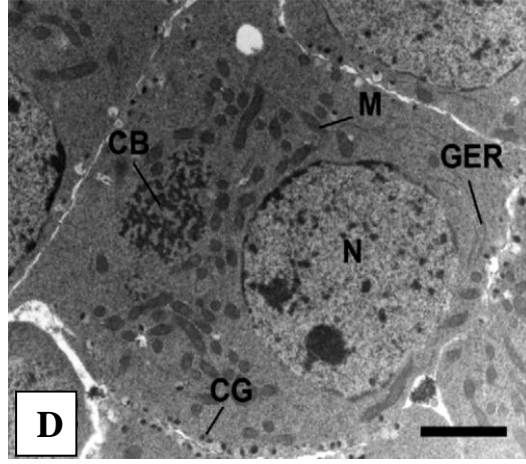
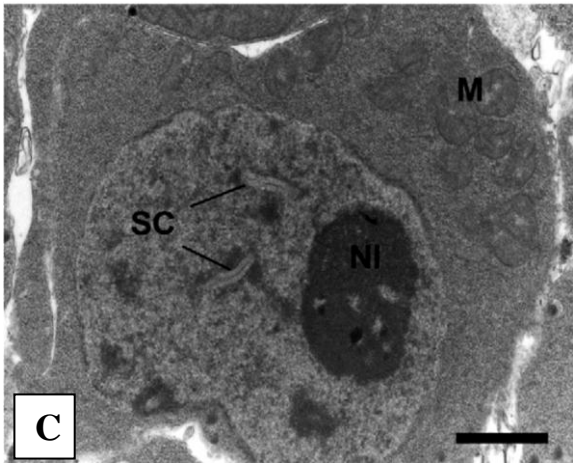
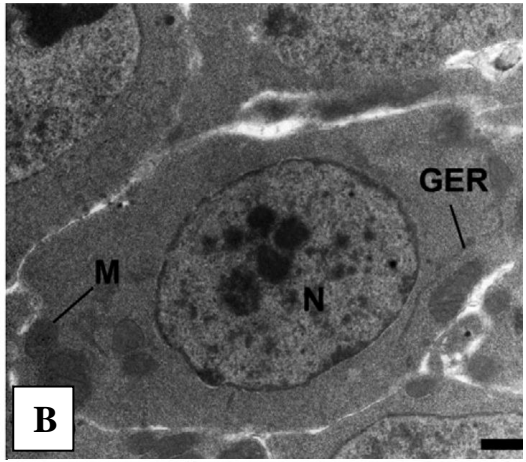
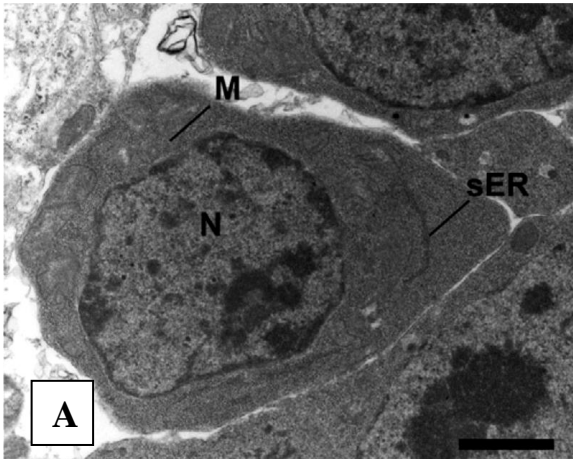
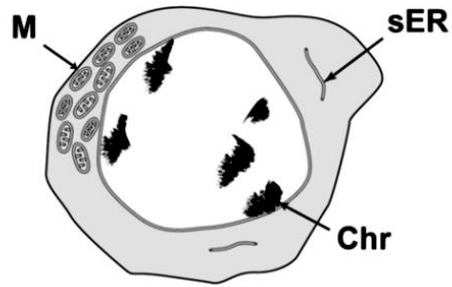
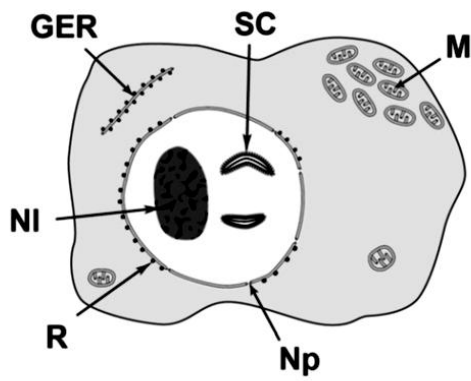


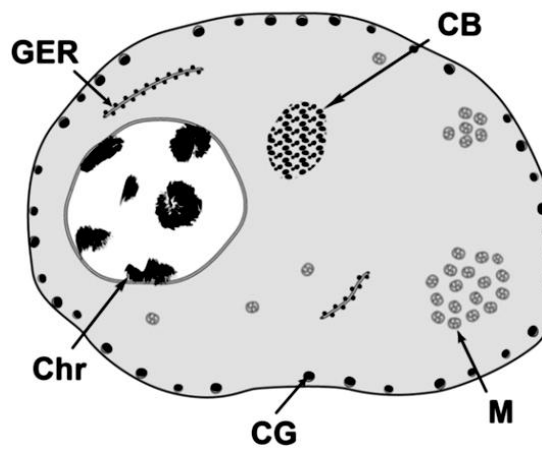
Figura 6. Diagrama mostrando os três estágios da oogênese de *Metadena depressa*. (A): Oogônia; (B): oócito primário; (C): oócito maduro. Barra de escala = 2 μm . CB: Corpo cromatóide; CG: Grânulo cortical; Chr: Heterocromatina; GER: Retículo Endoplasmático Granular; M: Mitocôndria; NI: Nucléolo; Np: Poro nuclear; R: Material ribossômico perinuclear; SC: Complexo sinaptonêmico; sER: Retículo endoplasmático liso. Fonte: Greani et al. (2012).



A



B



C

2.2.2 Ovo

Os ovos dos digenéticos apresentam formas variadas, o que depende da forma do oótipo em cada espécie, ou seja, podem ser ovóides, alongados com ou sem espinhos, com ou sem ornamentações na sua casca, operculados ou não (REY, 2008). Os digenéticos, comumente apresentam ovos pequenos, sem filamentos polares, com a presença do opérculo, na maioria dos trematódeos (SMYTH e CLEGG, 1959).

Os ovos quando eliminados pelo hospedeiro definitivo, podem ter contato com sangue e fezes, além de também passarem por adversidades no meio externo, como as variações de osmolalidade, pH, dessecação quando lançados ao solo. Mesmo com tantos infortúnios, muitos ovos apresentam viabilidade e seguem o ciclo biológico do parasito. Em decorrência de tantas barreiras que os ovos ultrapassam para manterem a viabilidade, surgiram questionamentos acerca de sua resistência, sendo assim, existem muitos trabalhos científicos sobre a morfologia, composição e estrutura da casca dos ovos.

A natureza e a formação da casca dos ovos estão relacionadas a determinados fatores, tais como: estrutura da genitália da fêmea, a história de vida, o tipo de nutrição do parasito e as características físico-químicas do meio (SMYTH e CLEGG, 1959).

Com o auxílio da microscopia eletrônica foi possível obter maiores informações para a estrutura da casca dos ovos, parâmetro este, que pode estar relacionado à viabilidade dos ovos no ambiente. Através da microscopia eletrônica Wilson (1967) verificou a estrutura e viabilidade da casca dos ovos de *F. hepatica*, Race et al. (1971) observaram poros na casca dos ovos de *S. mansoni*, que se localizavam particularmente na porção anterior do ovo, sendo os poros uma possível rota para a movimentação de metabólitos e nutrientes. Além disso, Race et al. (1971) e Sakamoto e Ishii (1976) observaram a presença de microespinhos na superfície dos ovos. Dependendo da espécie de *Schistosoma* os espinhos são diferentes. Em *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904 existem espinhos rudimentares na casca dos ovos, em *S. mansoni* há um espinho lateral de base ampla e *S. haematobium* que apresenta um espinho terminal (SAKAMOTO e ISHII, 1976; FORD e BLANKESPOOR, 1979). As diferenças na localização dos espinhos na casca dos ovos de *Schistosoma*, de acordo com Ford e Blankespoor (1979) é uma característica para distinguir *S. mansoni* de *S. haematobium*. Basch e Basch (1982) analisaram os ovos de *S. mansoni in vitro*. Han-Win et al. (1982) visualizaram duas camadas nos ovos de em *S. japonicum*, uma interna fina e mais eletrodensa que a camada externa que se apresentava mais espessa que a camada interna. Neil et al. (1988) verificaram que a casca dos ovos de *S. mansoni* apresentava três camadas: uma externa microespinhosa, média com eletrodensidade intermediária e a interna densa. A camada de Reynold é subjacente à casca do ovo, com filamentos ramificados que se aderem ao envelope de von Lichtenberg, no qual há um espaço entre o embrião, a lacuna de Lehman. A presença de nó na região abopercular, oposta a região opercular, de *Echinostoma* spp. foi relatado por Krejci e Fried (1994). Esses autores verificaram que em *Echinostoma caproni* Richard, 1964 o nó é raso e em *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) o nó apresenta-se mais profundo, característica ratificada por Fujino et al. (2000), que também analisou *Echinostoma paraensei* Lie e Basch, 1967 que apresenta o nó com características semelhantes com *E. trivolvis*.

A literatura sobre os ovos de *P. bragai* se restringe a estudos morfológicos e a morfométricos (SANTOS, 1934; TUBANGUI e MASILUÑGAN, 1941; BYRD e DENTON, 1950; FREITAS, 1951; BRANDOLINI, 2000). A análise da estrutura da casca dos ovos é apresentada pela primeira vez através do presente estudo.

2.2.3 Desenvolvimento ontogenético

Os digenéticos apresentam tipicamente cinco estágios larvais, algumas espécies

apresentam um número menor de estágios, conforme descrito por Rey (2008). O presente estudo abordará somente os estágios de miracídio, cercária e metacercária.

2.2.3.1 Miracídio

O miracídio dos digenéticos tem formato alongado com revestimento ciliado, que permite a movimentação no meio aquático. Na porção anterior há uma papila apical, o “terebratorium”, que provavelmente auxilia o miracídio na penetração do hospedeiro intermediário, além da ajuda das glândulas adesivas e das glândulas de penetração, presentes, também, no “terebratorium”. Completando a estrutura da larva estão os solenócitos ou células-flama, do aparelho excretor, com dois pares, um esboço de sistema nervoso e numerosas células germinativas unidas na parte posterior da larva (NEVES, 2010; REY, 2008).

O “terebratorium” auxilia a adesão e penetração da larva no hospedeiro intermediário, o molusco. Sendo assim, existem muitos trabalhos que descrevem a morfologia do miracídio, conferindo destaque para a região do “terebratorium”, além, das placas epidérmicas. A microscopia eletrônica, então, vem como uma ferramenta, quase que indispensável na ratificação dos resultados obtidos através da microscopia de luz.

Sendo assim, a microscopia eletrônica contribuiu para elucidar as estruturas do miracídio de alguns digenéticos, tais como o de *F. hepatica*, que apresenta um tegumento delgado, papila apical (*terebratorium*) desprovida de células epiteliais ciliadas, mas com a presença de uma fina camada de citoplasma enrugado. A organização do sistema nervoso também foi verificada, que revela que o gânglio central é uma massa de fibras nervosas com os corpos celulares situados na periferia (WILSON, 1969; WILSON, 1970).

O miracídio das espécies de *Schistosoma* também foi estudado através da microscopia eletrônica, LoVerde (1975) ao comparar os miracídios de *S. japonicum* e *S. haematobium* encontrou uma diferença na papila apical, no entanto o autor não concluiu se a divergência era em decorrência da genética, artefatos na preparação ou diferenças fisiológicas da larva no momento da fixação. Além disso, LoVerde (1975) afirmou que é possível que a papila apical se molde como uma ventosa.

Pan (1980) realizou um estudo detalhado sobre a ultraestrutura do miracídio de *S. mansoni*, onde o autor dividiu a organização celular em oito categorias ou sistemas: sistema epitelial, “terebratorium”, musculatura, células intersticiais, glândulas de penetração, sistema excretor, sistema nervoso, e células germinais. O autor verificou, na descrição do “terebratorium” que os ductos secretores se abrem para o meio, no centro da papila.

Eklun-Natey et al. (1985) esclareceram a dúvida proposta por LoVerde (1975), pois analisaram os miracídios de quatro espécies de esquistossomo, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* e *Schistosoma intercalatum*. Fisher, 1934. As divergências encontradas, por Eklun-Natey et al. (1985), referem-se à forma das placas epidérmicas, na distribuição dos receptores sensoriais e principalmente na estrutura do “terebratorium”, que se apresenta em formato de roseta em *S. haematobium* e *S. intercalatum* e formato de colmeia em *S. mansoni* e *S. japonicum*. Essa diferença, de acordo com os autores, se mantém estável concordando assim, com a hipótese de ser uma diferença genética, logo poderia complementar a distinção entre *S. mansoni* e *S. haematobium*, diferentemente de *S. japonicum* e *S. intercalatum* que apresentam larvas muito parecidas, sendo assim sua distinção deve ocorrer com base nas suas dimensões.

O miracídio de *E. paraensei*, observado através da microscopia de luz e eletrônica de varredura, apresenta corpo coberto por cílios, exceto na região do “terebratorium”, além da observação de estruturas tipo papilas, distribuídas nos três eixos e quatro grupos foram verificados na região do “terebratorium”, além da observação da presença de 18 placas

epidérmicas, dispostas em quatro linhas (PINHEIRO et al., 2004). Com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão foi verificado no miracídio de *E. paraensei* que a região do “terebratorium” apresentava muitas dobras na superfície e muitos grânulos secretores eletrodensos, além disso, o miracídio apresentava duas células-flama, caracterizando o sistema excretor (PINHEIRO et al., 2005).

A literatura apresenta um único relato sobre a morfologia do miracídio de *P. bragai*, realizado por Maldonado (1945a). Esse autor observou o formato piriforme da larva com uma projeção na região anterior em forma de focinho, que provavelmente corresponda ao “terebratorium”, e que os cílios apresentavam-se uniformes, o parênquima continha grânulos refratários, além da visualização de células germinativas. No entanto, não existem relatos, até o momento, sobre a ultraestrutura do miracídio de *P. bragai*.

2.2.3.2 Cercária

As cercárias desenvolvem-se a partir da diferenciação de bolas germinativas, que se localizam no interior do esporocisto de segunda geração, possuem, em geral, um corpo ovoide e achatado, com cauda muscular, ventosa oral e acetábulo, além da presença de primórdios do aparelho digestório, sistema nervoso, glândulas de penetração e um par de protonefrídios (REY, 2008).

Em *S. mansoni*, de acordo com Rey (2008), o tegumento das cercárias apresenta microespinhos, voltados para a região posterior, que são mais afastados na região da cauda. O conhecimento sobre o tegumento das cercárias é importante, pois de acordo com Dixon (1976) o tegumento desse estágio larval apresenta determinadas funções tais como: estrutural, nutricional, de proteção e formadora da parede dos cistos das metacercárias. Sendo assim, a utilização de diferentes ferramentas é necessária para elucidar questões que ainda não foram respondidas, não só sobre o tegumento das cercárias, mas também, sobre toda sua estrutura, em diferentes espécies de digenéticos. Já que a presença de algumas características marcantes das cercárias define seu tipo morfológico, podendo em alguns casos permitir a identificação no nível genérico.

Os tipos cercarianos encontrados no molusco *Bulinus tropicus* (Krauss, 1848) foram cercárias anfiostomas, com ventosa oral na região posterior do corpo, xifidiocercárias, que não apresentam ocelos pigmentados e cistóforas, com cauda em formato de bulbo com apêndice (KING e VAN AS, 2001; PINTO e MELO, 2013a).

Moema et al. (2008) verificaram o desenvolvimento de três tipos de cercárias em *Lymnaea natalensis* Krauss, 1848 e identificaram cercárias com cauda bifurcada, em *Trichobilharzia* sp., que apresenta corpo oval, ventosa oral com poucos receptores sensoriais ciliados, ao redor, dois ocelos, com vesícula excretora no formato de “Y”, seis pares de células-flama; observaram, também, cercárias de cauda simples do tipo equinostoma que apresenta uma ampla cabeça oval e longa cauda, com um colar espinhoso em forma de ferradura, a ventosa oral apresenta receptores ciliados, com acetábulo oval e bem desenvolvido, oito células-flama e vesícula excretora dividida em duas porções, uma posterior maior e oval que é precedida de uma porção oval e menor; e por fim, observaram também, o tipo xifidiocercária da família Plagiorchiidae, que apresenta corpo robusto e uma curta cauda simples, o acetábulo apresenta espinhos, com vesículas excretoras em duas partes, uma maior e posterior e a outra menor e anterior, três células-flama.

Choi et al. (2006) observaram a morfologia das cercárias de *Echinochasmus japonicus* Tanabe, 1926 que apresentam corpo ovoide, com cauda diminuta e tegumento coberto por pequenos espinhos.

Pinheiro et al. (2012) verificaram que as cercárias de *Eurytrema coelomaticum* (Giard e Billet, 1892) apresentavam uma ventosa oral com muitas papilas, cavidade oral no centro da

ventosa, e o acetábulo com poucas papilas na sua borda. Em *S. mansoni* as cercárias apresentam corpo coberto por espinhos, com acetábulo e ventosa oral, que apresenta receptores sensoriais e um par de glândulas de penetração, na região da cabeça (PEREIRA et al., 2013).

Maldonado (1945a) realizou a descrição das cercárias de *P. bragai* através da microscopia de luz e verificou que apresentam ventosa oral, acetábulo, corpo cilíndrico que se afunila, ligeiramente, na região posterior do corpo, revestimento fino e rugoso. Keller e Araújo (1992) verificaram as cercárias de *P. bragai*, e aferiram as suas medidas, não mencionando a morfologia das cercárias, assim como Brandolini e Amato (2006), também não a fizeram.

O presente estudo demonstra pela primeira vez a estrutura das cercárias de *P. bragai* através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

2.2.3.3 Metacercária

A metacercária é a forma encistada de alguns trematódeos, as cercárias perdem a cauda e produzem uma membrana protetora em torno de si mesma, através da secreção das glândulas cistogênicas (REY, 2008).

Fried (1994) verificou que o desencistamento das metacercárias dos trematódeos, é acompanhado de diversos fatores, extrínsecos, fatores relacionados ao hospedeiro, tais como enzimas, temperatura, pH, e outros, e fatores intrínsecos que são relacionados com o parasito, como secreções, atividade muscular, e outros.

Algumas cercárias podem encistar sobre a vegetação ou qualquer outro substrato, como pedras ou penetrar em um segundo hospedeiro intermediário e posteriormente encistar (FRIED, 1994; REY, 2008). Estratégia diferente da adotada por *P. bragai* que se encista no molusco, único hospedeiro intermediário do ciclo.

A microscopia eletrônica contribui para elucidar e ratificar a importância da estrutura da parede do cisto das metacercárias, assim como é observado nos trabalhos com *F. hepatica* (DIXON e MERCER, 1964; DIXON e MERCER, 1967), com *Cloacitrema narrabeenensis* (Howell e Bearup, 1967) (DIXON, 1975), com *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) (GULKA e FRIED, 1979), com *Sphaeridiotrema globulus* (Rudolphi, 1814) (HUFFMAN, 1986).

De acordo com Fried (1994), as metacercárias que se encistam sobre a vegetação geralmente, apresentam um maior número de camadas na parede do cisto, quando comparadas as metacercárias que encistam no hospedeiro intermediário.

Dixon e Mercer (1964) verificaram que a parede do cisto de *F. hepatica* era composta por quatro camadas. Huffman (1986) verificou que *S. globulus* apresenta um cisto de parede fina e transparente, além de descrever a presença de três camadas, a camada externa, intermediária e interna.

As metacercárias de *P. bragai* apresentam cisto como uma estrutura coriácea, resistente, espessa, elástica e transparente, de formato oval (BRANDOLINI, 2000; BRANDOLINI e AMATO, 2006; KELLER e ARAÚJO, 1992; MALDONADO, 1945a). Maldonado (1945a), também, verificou mais detalhadamente, a presença da ventosa oral, cavidade oral, pequeno esôfago, faringe, acetábulo globular, vesícula excretora e células-flama.

A estrutura da parede do cisto da metacercária de *P. bragai*, no entanto, ainda não foi relatada na literatura, até o presente momento.

2.3 Classificação Taxonômica de *Paratanaisia bragai*

A família Eucotylidae Cohn (1904) foi proposta para parasitos monostomata do sistema urinário de aves (BYRD e DENTON, 1950).

Segundo Freitas (1951) e Byrd e Denton (1950) a família Eucotylidae foi proposta para três gêneros: *Eucotyle* Cohn, 1904; *Tanaisia* Skrjabin, 1924 e *Tamerlania* Skrjabin, 1924.

No Brasil, Santos (1934) descreveu *Tamerlanea bragai*, parasito do aparelho urinário, rim e vias urinárias de aves. No entanto, na descrição de Santos, 1934 o nome do gênero apresentou um erro na grafia, *Tamerlanea* e não *Tamerlania* originalmente descrito por Skrjabin, 1924.

Maldonado (1943) verificou a presença de acetábulo nas cercárias de *T. bragai* e sugeriu que esta espécie fosse retirada de Monostomata e incluída em Distomata.

Dollfus (1946) inclui na família Eucotylidae os gêneros: *Eucotyle*, *Tanaisia*, *Lepidopteria* Nezlubinski, 1926 e *Tamerlania*. Já o gênero *Ohridia* Nezlubinski, 1926, foi recomendado como subgênero de *Tanaisia*.

De acordo com Freitas (1951) os caracteres adotados por vários autores para a divisão dos gêneros da família Eucotylidae são: presença ou ausência de formação muscular cefálica, delimitando um segmento anterior de aspecto triangular; presença ou ausência de acetábulo, posição relativa dos testículos; contornos dos testículos; posição do ovário; contorno do ovário; presença ou ausência de esôfago ou dilatação esofagiana.

Segundo Freitas (1951) caracteres como forma e posição relativas das glândulas vitelogênicas, esôfago e acetábulo não podem ter valor genérico, nem mesmo específico já que variam muito entre os indivíduos da mesma espécie. Já a existência ou a ausência da musculatura transversal cefálica, e da conformação dos cecos intestinais fusionados posteriormente ou não, foram bons caracteres diferenciais, que permitiram Freitas (1951) a divisão da família Eucotylidae em duas subfamílias: Eucotylinae e Tanaisiinae.

De acordo com Freitas (1951) a subfamília Eucotylinae inclui o gênero *Eucotyle* Cohn, 1904 e a subfamília Tanaisiinae inclui apenas o gênero *Tanaisia* Skrjabin, 1924, considerando como sinônimos os gêneros *Tamerlania* Skrjabin, 1924, *Ohridia* Lepidopteria e *Proshytera* Korkhaus, 1930.

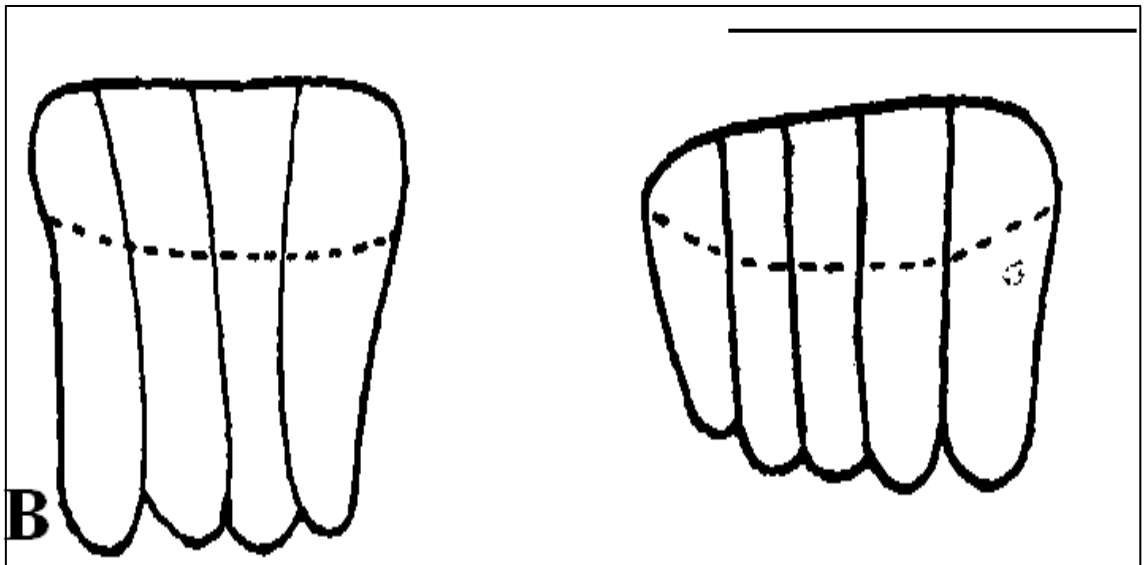
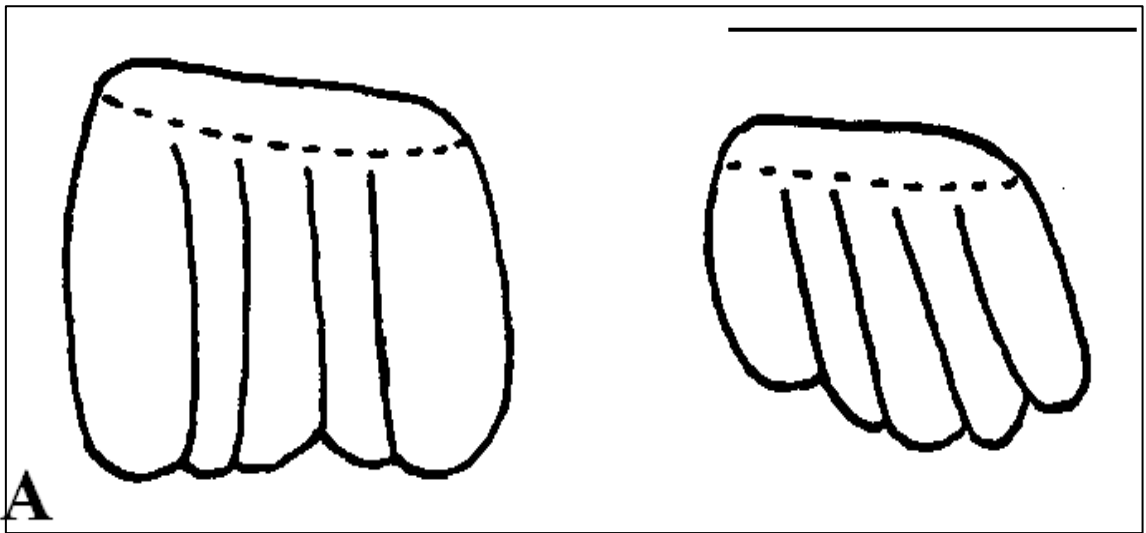
Yamaguti (1958) considerou, assim como Freitas (1951), duas subfamílias para a família Eucotylidae: Eucotylinae e Tanaisiinae. No entanto, Yamaguti (1958) discordou de Freitas (1951) e manteve em Tanaisiinae *Tanaisia* como gênero válido, apresentando uma chave com quatro subgêneros: *Tamerlania*, *Tanaisia*, *Ohridia* e *Lepidopteria*. *Tanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 foi incluída no subgênero *Tamerlania*, ou seja, *Tanaisia (Tamerlania) bragai*.

Freitas (1959) propôs o gênero *Paratanaisia* para incluir três espécies (*Tanaisia bragai*, *Tanaisia confusa* Freitas, 1951 e *Tanaisia robusta* Freitas, 1951), que anteriormente pertenciam ao gênero *Tanaisia*. As três espécies anteriormente citadas foram incluídas em *Paratanaisia* em decorrência a existência em comum da maior extensão das glândulas vitelogênicas, que ultrapassam anteriormente e posteriormente o ovário. Sendo *P. bragai* considerada a espécie tipo. De acordo com Freitas (1951), *P. confusa* apresenta espinhos no tegumento, e *P. bragai* e *P. robusta* apresentam escamas. A diferença entre as duas é o aspecto das escamas, que de acordo com os desenhos de Freitas (1951), *P. robusta* apresenta escamas divididas até a base de fixação no tegumento, já *P. bragai* as escamas apresentam uma parte interna, não dividida, fixada ao tegumento e outra parte livre, dividida, como pode ser observado na (Figura 7).

Odening (1963) reconheceu *Tanaisia* como gênero válido e três subgêneros: *Tanaisia*, *Tamerlania* e *Paratanaisia* (apresentando *Tanaisia bragai*, como espécie tipo).

Yamaguti (1971) incluiu o subgênero *Paratanaisia* na chave taxonômica de 1958, considerando o caractere extensão das glândulas vitelogênicas na região pré-ovariana, incluindo a espécie *Tanaisia bragai*, ou seja, *Tanaisia (Paratanaisia) bragai*. A classificação taxonômica de Kanev et al. (2002) corrobora com os trabalhos de Freitas (1951, 1959), já que inclui em Eucotyliidae, Eucotylinae e Tanaisiinae, apresentando nesta última subfamília três gêneros na sua chave taxonômica: *Tanaisia (Ohridia, Lepidopteria e Proshystera*, como sinônimos), *Paratanaisia* e *Tamerlania*. Ou seja, Kanev et al. (2002) mantiveram *Paratanaisia* como gênero válido. Os rins das aves podem ser parasitados por várias espécies representantes de Eucotyliidae e Rencolididae (KANEV et al., 2002; GIBSON, 2008). Olson et al. (2003) consideraram Eucotyliidae em Microphalloidea, de acordo com os resultados obtidos das análises filogenéticas, sendo Eucotyliidae próxima de Rencolididae como grupos-irmãos. Ou seja, estas duas famílias formariam um clado, juntamente com Pachysoolidae, dentre de Microphalloidea.

Figura 7. Escamas de *Paratanaisia*. A. Escama de *Paratanaisia bragai*. B. Escama de *Paratanaisia robusta*. Barra de escala = 20 μm . Fonte: Freitas (1951).



2.4 Ciclo biológico de *Paratanaisia bragai*

O ciclo biológico de *P. bragai* envolve as seguintes fases de desenvolvimento: miracídio, esporocisto de primeira geração, esporocisto de segunda geração, cercárias, metacercárias e verme adulto (MALDONADO, 1945a), assim como observado na Figura 8.

Os ovos embrionados de *P. bragai* são eliminados com os produtos de excreção do hospedeiro definitivo. Através de uma infecção passiva os moluscos, *S. octona* em condições naturais ou *L. unilamellata*, experimentalmente infectada no Brasil, ingerem os ovos de *P. bragai* (BRANDOLINI et al., 1997; KELLER e ARAUJO, 1992; MALDONADO, 1945a). Após uma hora do contato inicial com os ovos, foi observado um ovo de *P. bragai* no trato digestório de *S. octona* infectada (BRANDOLINI e AMATO, 2006).

Os miracídios eclodem no estômago do molusco e atravessam a parede do tubo digestório, desenvolvendo-se em esporocistos de primeira geração. Inicialmente localizados na parede do intestino evoluindo posteriormente para a glândula digestiva (BRANDOLINI, 2000; MALDONADO, 1945a).

Os esporocistos de primeira geração apresentam uma massa de células germinativas, que originarão massas de células embrionárias encapsuladas e formarão os esporocistos de segunda geração (BRANDOLINI, 2000; KELLER e ARAUJO, 1992; MALDONADO, 1945a).

Os esporocistos de segunda geração foram localizados na glândula digestiva, e no rim do molusco infectado (BRANDOLINI e AMATO, 2006).

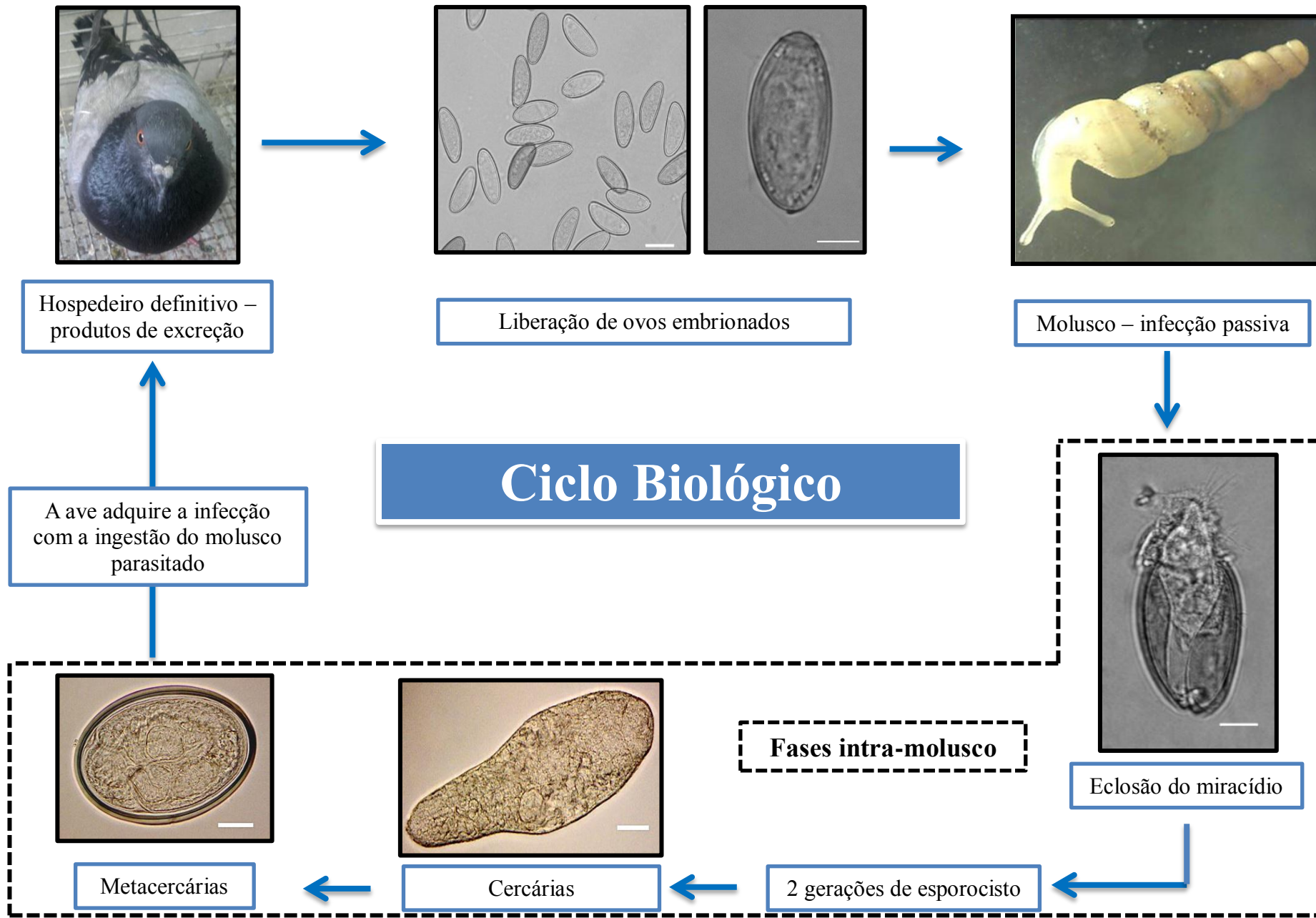
As cercárias começam a ser visualizadas aos 32 dias após a infecção, e neste mesmo período as metacercárias podem ser visualizadas na massa visceral e nos ácinos da glândula digestiva do molusco infectado (BRANDOLINI e AMATO, 2006; KELLER e ARAUJO, 1992).

A infecção do hospedeiro definitivo ocorre devido à ingestão do molusco infectado, as metacercárias desencistam no duodeno e a maturidade sexual é atingida entre o 11º e o 15º dia após a ingestão das metacercárias (MALDONADO, 1945a).

Keller e Araújo (1992) afirmam que o aparecimento dos ovos nas fezes do hospedeiro definitivo realiza-se aos 25 dias após a ingestão das metacercárias, no entanto, Brandolini (2000) observou um período-pré-patente mais tardio, aos 36 dias.

As diferenças nos períodos observados para cada estágio larval de *P. bragai* provavelmente possam estar relacionados aos diferentes hospedeiros definitivos e intermediários utilizados e aos diferentes tipos de metodologias utilizadas por cada autor.

Figura 8: Esquema do ciclo biológico de *Paratanaisia bragai*. Fonte das imagens: Autora.



2.5 Biologia e ecologia de *Subulina octona* e *Leptinaria unilamellata*

A classe Gastropoda Cuvier, 1797 é a mais diversificada, do filo Mollusca Linnaeus, 1758, com o maior número de espécimes, em ambientes aquáticos e terrestres. São considerados os mais bem adaptados invertebrados, no que se refere à resistência a variações, tais como: pressão da água, salinidade, umidade, temperatura (RUPPET et al., 2005; BARBOSA, 1995).

Os moluscos, *S. octona* e *L. unilamellata* encontram-se classificadas da seguinte maneira: (Gastropoda, Pulmonata Cuvier, 1817, Stylommatophora Schmidt, 1856, Subulinidae Fischer e Crosse, 1877) (RUPPET et al., 2005; BARBOSA, 1995).

De acordo com Araújo (1982) a família Subulinidae apresenta três representantes de interesse médico no Brasil, são eles: *S. octona*, *L. unilamellata* e *Rumina decollata* (L.).

Subulina octona segundo Araújo (1982) apresenta ampla distribuição geográfica, conforme apresentado na (Figura 9). Em território brasileiro, ocorre nos estados: Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo.

Subulina octona vive no solo, com preferência na alimentação por vegetais facilmente fragmentáveis (ARAÚJO, 1982).

Na reprodução Bessa e Araújo (1995a) verificaram que a oviposição de *S. octona* sempre ocorre entre fendas na terra e os ovos, na maioria das vezes, são depositados na lateral dos recipientes onde os moluscos estão alojados. Além disso, Bessa e Araújo (1995b) estudaram a ocorrência de autofecundação em *S. octona*, em condições de laboratório, fenômeno que foi verificado por Marcus e Marcus (1968). Os resultados de Bessa e Araújo (1995b) ratificam as observações de Marcus e Marcus (1968), no que se refere ao número total de ovos por postura, dos moluscos isolados. A amplitude de variação para o número de ovos foi de um a nove segundo Bessa e Araújo (1995b) e Marcus e Marcus (1968) observaram moluscos contendo até nove ovos.

Almeida e Mota (2011) verificaram que a reprodução de *S. octona* ocorre durante todo o ano, preferencialmente no período das chuvas, o que deve estar relacionado, segundo estes autores aos fatores: umidade do ar e temperatura.

Dias et al. (2007) estudaram a influência da umidade do substrato sobre a resistência à dessecação de espécimes de *S. octona*. Verificou-se que a umidade realmente influencia a resistência à dessecação desses moluscos, já que todos os espécimes de *S. octona* localizados no substrato sem umidade morreram, ao contrário do grupo controle submetido a ambiente úmido, onde todos sobreviveram. D'Ávila et al. (2004) estudaram a resistência à dessecação, e verificaram que *S. octona* mantida em uma câmara climatizada a 35 +/- 1°C de temperatura e 80 % de umidade relativa do ar, são capazes de sobreviver pelo menos até 36 horas quando em condições desfavorável de temperatura.

Além disso, o substrato utilizado em condições experimentais pode influenciar o tempo para o alcance da maturidade sexual de *S. octona*. Os moluscos podem apresentar um maior consumo do substrato, no caso da utilização de terra vegetal, que provavelmente seja mais propícia à utilização como recurso alimentar, pelo molusco, em detrimento da ração oferecida. Ou seja, moluscos situados em substrato de terra vegetal levariam mais tempo para atingir a maturidade sexual, em comparação a moluscos localizados em areia e argila, pois obtiveram menor quantidade de nutrientes, o que possivelmente influenciou seu crescimento. (D'ÁVILA e BESSA, 2005a,b).

Subulina octona apresenta importância médico-veterinária, pois é considerado hospedeiro intermediário de *P. bragai* que parasita aves por Maldonado (1945a); de *Platynosomum illiciens* (Braun, 1901) que parasita o gato doméstico por Maldonado (1945b); *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923 de aves domésticas por Duarte (1977);

Aelurostrongylus abstrusus (Railliet, 1898) por Alicata (1964); *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) que parasita cães domésticos e carnívoros silvestres por Bessa et al. (2000); *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) por Caldeira et al. (2007) que parasita ratos.

Leptinaria unilamellata apresenta sua distribuição mundial (Figura 10). De acordo com Araújo (1982) a seguinte distribuição geográfica, no Brasil: Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo.

Almeida e Bessa (2001) estudaram, em condições experimentais, o crescimento e a reprodução de *L. unilamellata* e verificaram que o tempo de alcance da maturidade sexual é de 38 dias, tanto para indivíduos isolados quanto para indivíduos agrupados. Todos os indivíduos mantidos isolados realizaram autofecundação.

Já no período de eclosão, dos moluscos onde ocorreu a autofecundação, há uma divergência nos resultados, pois Bessa e Araújo (1995b) relataram o período entre uma e quinze dias, já Marcus e Marcus (1968) informaram o tempo de um a dois dias.

A autofecundação é considerada uma estratégia reprodutiva que já foi verificada em algumas espécies da família Subulinidae, no entanto, segundo Santos e Monteiro (2001) não existem dados que relatem a autofecundação como uma estratégia em todas as espécies dessa família.

Almeida e Mota (2011) verificaram, em condições naturais, que *L. unilamellata* apresenta comportamento gregário, com grande abundância na área estudada, Campus da Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG, e essa abundância ocorreu tanto na estação seca como na chuvosa. O que segundo estes autores demonstra que a espécie apresenta mecanismos para se proteger das adversidades do clima. A população apresenta principalmente indivíduos jovens com reprodução ao longo de todo o ano.

Existem trabalhos relacionando a dieta ao crescimento, sobrevivência e reprodução dos moluscos. Brandolini e Gomes (2002) verificaram para *L. unilamellata* que a dieta oferecida com ração para codornas em postura inicial, possibilitou um maior crescimento da concha dos moluscos e quando a ração foi combinada com os vegetais, possibilitou menor mortalidade e maior produção de filhotes.

Almeida e Bessa (2001) alegaram a importância do conhecimento dos aspectos da biologia e do comportamento, crescimento e reprodução, dos moluscos, nas pesquisas com parasitos que apresentam os moluscos nos seus ciclos evolutivos. Já que esses parâmetros contribuem para melhorar as técnicas de criação dos moluscos em laboratório, visando aprimorar as pesquisas com os hospedeiros intermediários de helmintos.

Leptinaria unilamellata apresenta importância médico-veterinária, pois participa como hospedeiro intermediário nos ciclos evolutivos de parasitos como *P. gallinum*, relatado por Duarte (1980) in Almeida e Mota (2011), provocando hemorragias intensas no intestino de aves (ALICATA, 1947) e de *P. bragai*, relatado por Keller e Araújo (1992) e Brandolini et al. (1997).

Segundo Santos e Monteiro (2001), *Beckianum beckianum* (L. Pfeiffer, 1846) da mesma forma que outros subulinídeos, também se reproduz por ovoviparidade, ou seja, uma estratégia reprodutiva em que os filhotes são mantidos no oviduto até que estejam completamente formados, próximo do momento da eclosão. Esta estratégia reprodutiva, também é utilizada por *L. unilamellata* conforme Almeida e Mota (2011) em *L. unilamellata*. Os embriões de *L. unilamellata* ao longo do seu desenvolvimento consomem todo o vitelo. Quando a concha embrionária completa o seu desenvolvimento, ocupam a membrana vitelina tênue e transparente, que lhes adere. No entanto, alguns espécimes não apresentam esta membrana, o que poderia supor que a mesma tenha sido reabsorvida (DUTRA, 1988).

Marcus e Marcus (1968) in Dutra (1988) afirmam que todas as espécies estudadas de subulinídeos são vivíparas, no entanto, não analisam uma ligação direta dos embriões com o organismo progenitor para a alimentação.

Dutra (1988) afirma que *L. unilamellata* é ovovivípara, estágio intermediário a viviparidade, pois não foi encontrada nenhuma ligação anatômica direta do embrião com o organismo progenitor para a alimentação. Apesar de *L. unilamellata* apresentar membrana vitelina, nos embriões localizados dentro do útero.

Figura 9. Distribuição geográfica de *Subulina octona*. Os pontos amarelos representam os locais onde o molusco foi registrado.

Fonte: Discover life - <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Subulina+octona>

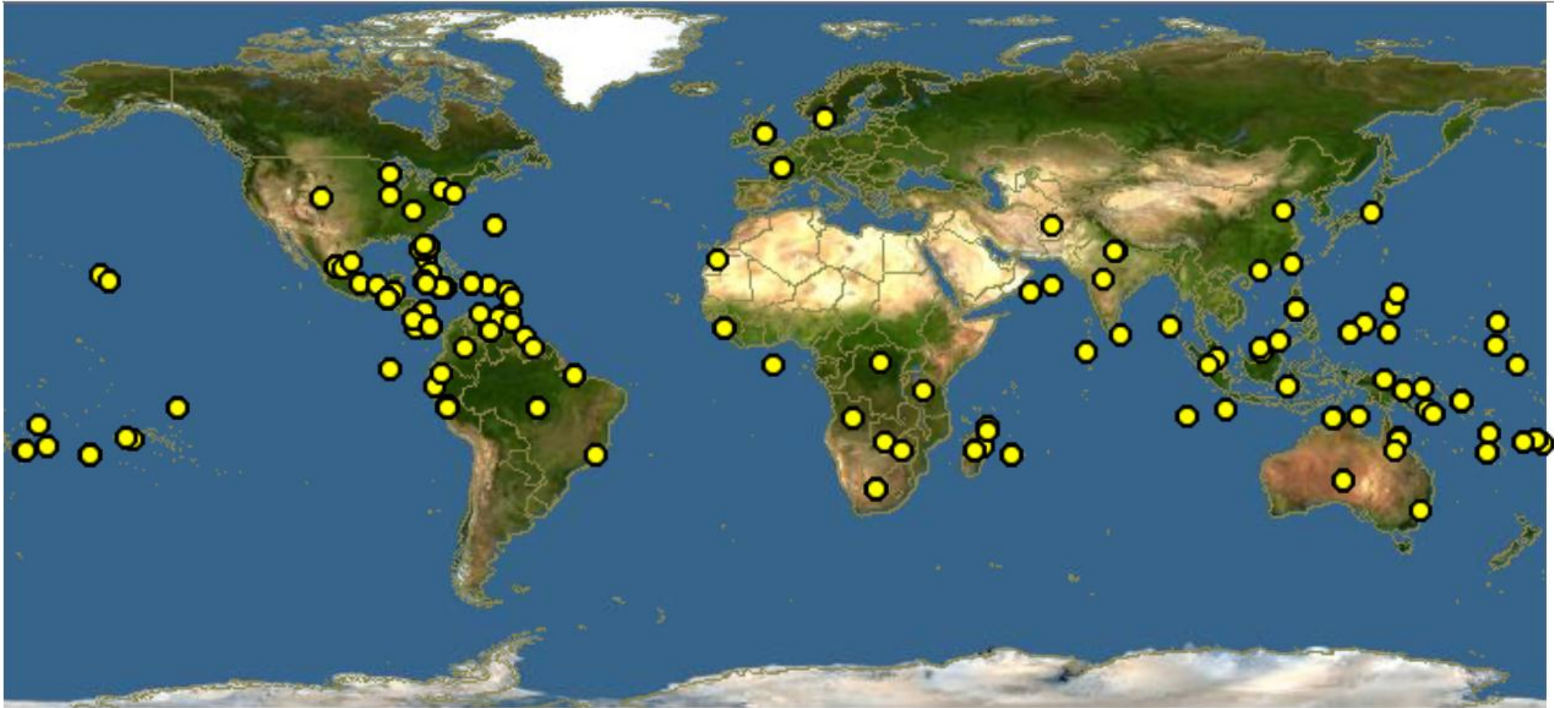
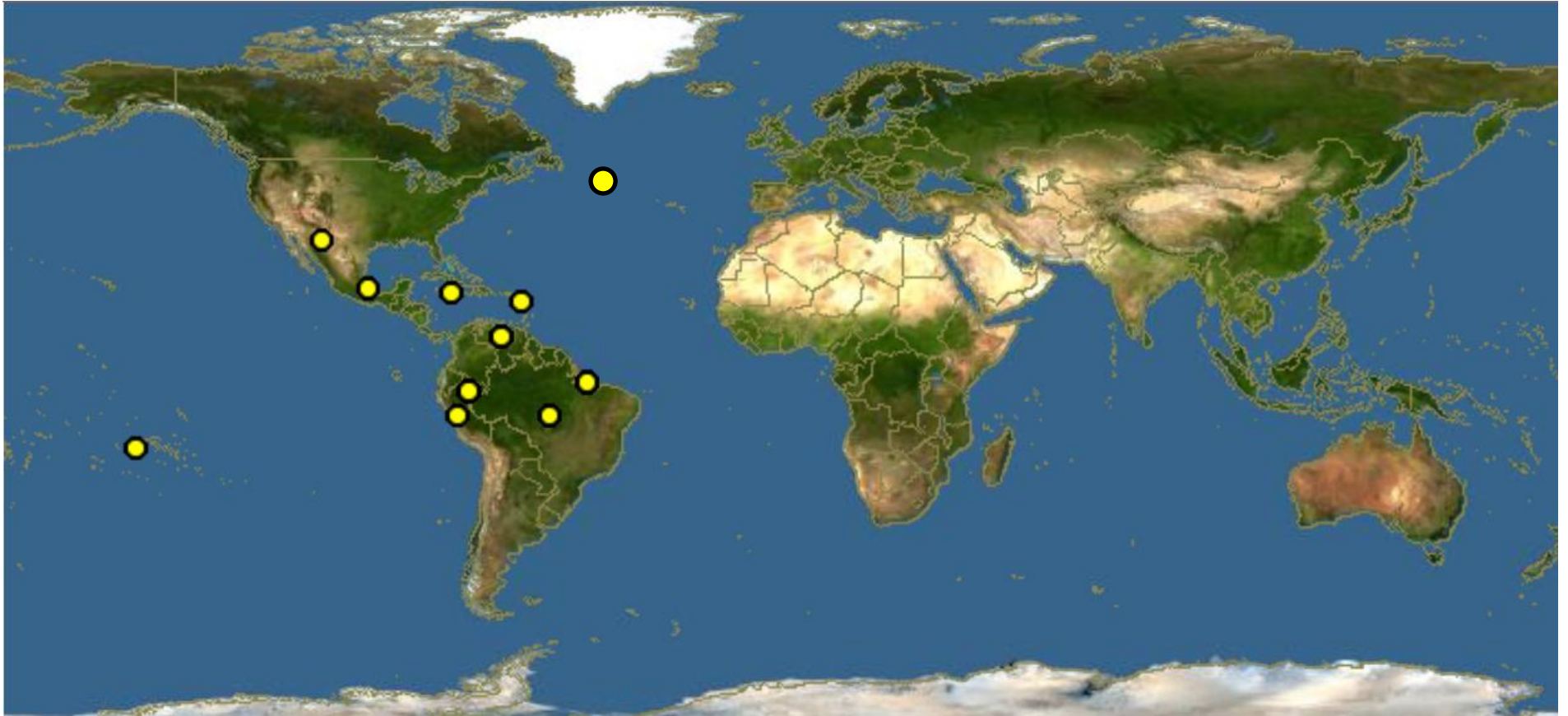


Figura 10. Distribuição geográfica de *Leptinaria unilamellata*. Os pontos amarelos representam os locais onde o molusco foi registrado.

Fonte: Adaptado de Discover life –
http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map&kind=Leptinaria+unilamellata



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estabelecimento da colônia de moluscos em laboratório

Para o desenvolvimento das larvas, foram realizadas infecções experimentais utilizando moluscos de duas espécies da família Subulinidae: *S. octona* e *L. unilamellata* (Figura 11).

Os moluscos utilizados para o estabelecimento das colônias de ambas as espécies, foram coletados manualmente, com o auxílio de recipiente plástico, pinça, colher e luvas, sob as figueiras, *Ficus* sp., nas proximidades do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado a 22°45'42"S 43°41'26"W.

Para a manutenção dos moluscos, no laboratório, foram utilizados recipientes plásticos de 15,0 cm de comprimento, 15,0 cm de largura e 6,5 cm de altura, forrados com terra vegetal, esterilizada em estufa por 2 horas a 100°C. Estes foram recobertos por um pedaço de tecido chamado Voil, que possibilitou a aeração e impediu a entrada de insetos. Grupos com, aproximadamente, 20 moluscos foram distribuídos e mantidos em 10 desses terrários.

A alimentação dos moluscos foi basicamente: alface e pepino frescos, trocados a cada dois dias, com uma suplementação de carbonato de cálcio para a concha. A terra foi umedecida com água da torneira utilizando um borrifador em igual intervalo de tempo. Os resíduos deixados sobre a terra foram retirados sempre que os terrários foram limpos e, a terra foi renovada mensalmente.

A cada dois dias os terrários eram examinados a procura de posturas, para o estabelecimento da colônia em laboratório, obtendo-se espécimes comprovadamente isentos de infecção.

Figura 11. Vista geral dos moluscos utilizados no processo de infecção experimental. A. *Subulina octona*. Barra de escala = 2 mm. B. *Leptinaria unilamellata*. Barra de escala = 10 mm. Fonte: Autora.



3.2 Coleta de *Columba livia*

Pombos adultos da espécie *Columba livia* (Aves, Columbidae Leach, 1820), foram obtidos nas proximidades do Município de Seropédica, Campo Lindo, km 15 da BR 465, Seropédica, RJ, Brasil localizado a 22°49'36"S 43°38'15"W e também, próximos a Central de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro S.A, Irajá, Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil localizado a 22°49'51"S 43°20'17"W. Foram coletados três pombos (n=3).

3.3 Obtenção do rim de *Columba livia* e dos ovos de *Paratanaisia bragai* para infecção

No laboratório, os três pombos coletados foram submetidos a exames de fezes, através do método de sedimentação de Ritchie (de Carli, 1994), para verificação da infecção. Os pombos infectados foram eutanasiados, sob câmara de CO₂, e necropsiados para a retirada dos rins, que foram transferidos para placas de Petri contendo solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%, onde permaneceram até serem seccionados com uma lâmina de bisturi (Brandolini, 2000), para a coleta dos parasitos dos ductos renais.

Após a secção, os helmintos adultos foram recuperados e transferidos para uma placa de Petri contendo solução fisiológica 0,85%, onde permaneceram por 24 horas à temperatura ambiente para a liberação dos ovos. Outros espécimes foram processados de acordo com Amato et al. (1991) e classificados segundo Yamaguti (1971). Em função do número reduzido de ovos liberados espontaneamente foi necessário que os helmintos fossem dilacerados para obtenção de um número maior de ovos, de forma a garantir a realização da infecção experimental dos moluscos (Brandolini, 2000).

Os pombos não infectados foram eutanasiados e necropsiados, igualmente aos pombos infectados, para o estabelecimento do grupo controle. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Pesquisa (COMEP) da UFRRJ sob o número de protocolo 186/2011 e processo 23083.011596/2011-67.

3.4 Infecção experimental de *Subulina octona* com ovos de *Paratanaisia bragai*

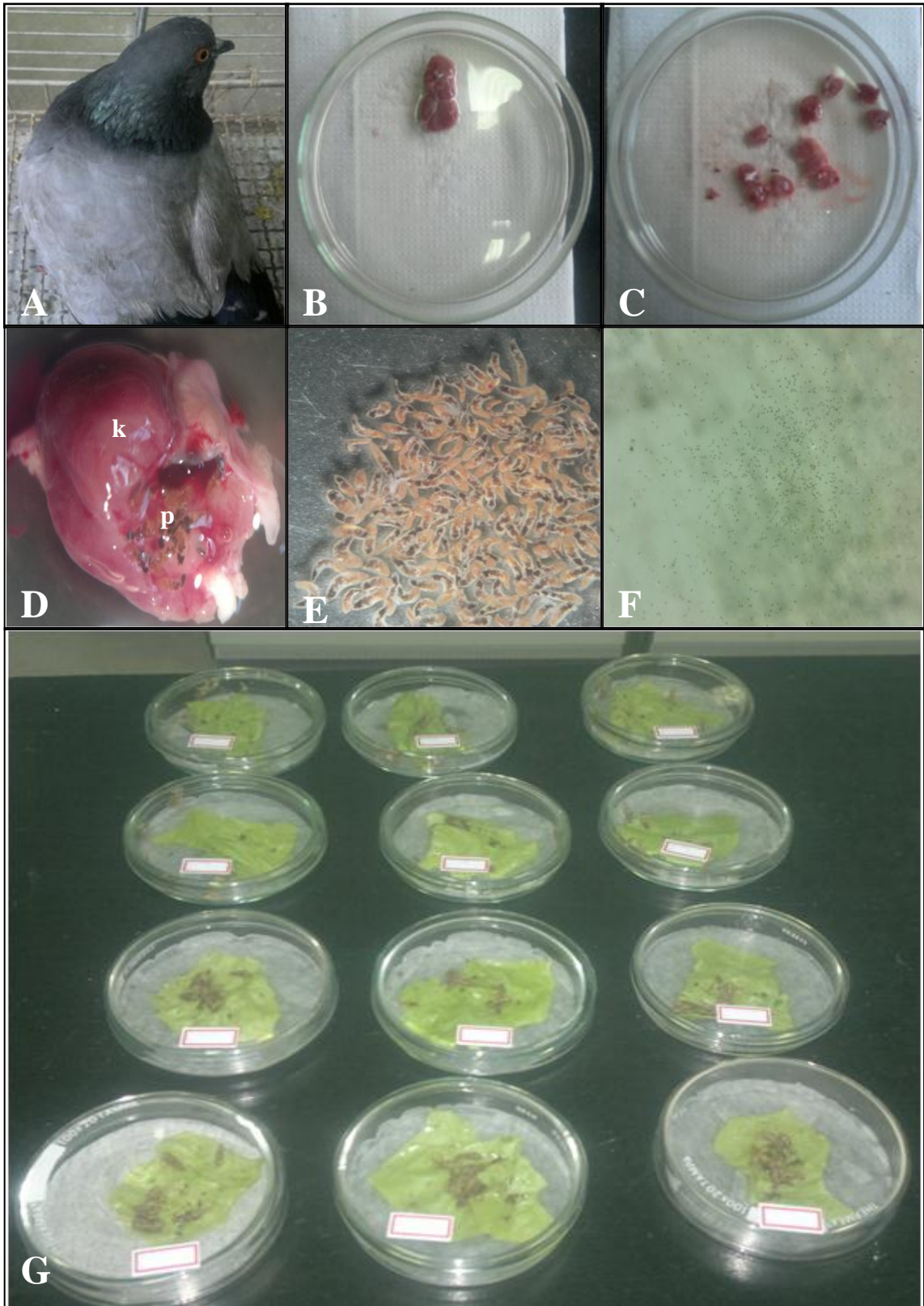
Os moluscos utilizados nas infecções experimentais foram àqueles nascidos no laboratório, de ambas as espécies, variando entre 4 e 9 mm de diâmetro de concha.

Para a realização das infecções experimentais foram utilizadas placas de Petri de 10 cm de diâmetro por 2 cm de altura forradas com papel filtro umedecido com água. Os ovos foram pipetados em cima de pequenos pedaços de alface e/ou pepinos (sem semente e finíssimos em espessura). O número reduzido de alimento foi necessário para que os moluscos pudessem ingerir todo o alimento e com isso, os ovos. Além disso, para garantir a ingestão dos ovos, os moluscos submetidos à infecção experimental, foram anteriormente separados e permaneceram em jejum por dois dias. Realizou-se uma estimativa de cinco ovos por molusco, de acordo com Brandolini (2006).

Os moluscos, em grupo de 10 por placa de Petri foram colocados sobre o alimento contendo os ovos. Foram utilizadas 3 placas de Petri por espécie de molusco, sendo assim foram utilizados 30 espécimes de *S. octona* e 30 espécimes de *L. unilamellata*. O contato dos moluscos com os ovos foi por um período de 24 horas. Após esse período, os moluscos foram transferidos para os terrários. As dimensões, montagem desses terrários e sua manutenção estão de acordo com o item 3.1. A alimentação dos moluscos infectados foi exclusivamente vegetal, para facilitar o posterior processo de dissecação e processamento histológico.

A infecção nos moluscos estabeleceu-se de acordo com a (Figura 12).

Figura 12. Infecção de *Subulina octona* e *Leptinaria unilamellata* com ovos de *Paratanaisia bragai*. A. *Columba livia*. B. Rim de *C. livia*. C. Rim dilacerado de *C. livia*. D. Rim (k) de *C. livia* parasitado por *P. bragai*. (p). E. *Paratanaisia bragai* obtida do rim de *C. livia* infectado. F. Ovos de *P. bragai*. G. Moluscos *S. octona* expostos aos ovos de *P. bragai* contidos na alface.



3.5 Obtenção dos adultos e ovos de *Paratanaisia bragai* para a microscopia

Seguiu-se o mesmo protocolo do item 3.3. No entanto, para a microscopia adultos e ovos, separadamente foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a 4° C.

3.6 Obtenção das larvas a partir da infecção experimental de *Subulina octona* e *Leptinaria unilamellata* por *Paratanaisia bragai* para microscopia

O acompanhamento do desenvolvimento larval de *P. bragai* em *S. octona* e *L. unilamellata* foi realizado de acordo com o trabalho de Brandolini e Amato (2006), para que ocorresse a obtenção dos estágios larvais.

O desenvolvimento larval de *P. bragai* e sua rota de migração, no molusco, segundo Brandolini e Amato (2006) está sistematizado na Tabela 1.

Tabela 1. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* para as duas espécies de hospedeiros intermediários (BRANDOLINI e AMATO, 2006).

Estágio de desenvolvimento	Tempo após contato inicial com os ovos	Local
Esporocisto 1ª geração	6 – 10 dias	Parede intestinal, ácinos da glândula digestiva
Esporocisto 2ª geração	15, 20, 25* dias	Glândula digestiva/*Rim
Cercária	32 dias	-
Metacercária	32 e 40 dias	-

O presente estudo seguiu as informações apresentadas na Tabela 1 para as dissecações dos moluscos infectados de ambas as espécies. No entanto, como nas dissecações realizadas após 2 semanas de infecção não foram visualizados os esporocistos de primeira e segunda gerações, resolveu-se interromper as dissecações, de forma a garantir que houvessem moluscos para as dissecações programadas após 40 dias, quando estaria desenvolvido o estágio de metacercária. Após 56 dias de infecção, visualizou-se a presença de cercárias e metacercárias nas duas espécies de moluscos analisadas, no entanto em maior quantidade no molusco da espécie *L. unilamellata*. Sendo assim, foram utilizadas apenas as cercárias e metacercárias obtidas a partir da infecção experimental dessa espécie de molusco, para os estudos morfológicos.

Anteriormente às dissecações, os moluscos infectados foram medidos com o auxílio de paquímetro. Posteriormente, a massa visceral era retirada do interior da concha com a ajuda de uma pinça, e a visualização com o auxílio de um estereomicroscópio. A massa visceral do molusco infectado ou os estágios larvais de *P. bragai*, isoladamente foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH7,4, a 4° C.

3.7 Obtenção do rim de *Columba livia* infectada com *Paratanaisia bragai* para histologia e microscopia eletrônica de varredura e processamento histológico

Seguiu-se o protocolo do item 3.2 no que se refere à coleta dos pombos, exame de fezes. Os pombos positivos e negativos para *P. bragai* foram necropsiados para a retirada e fragmentação dos rins e fixação em Dubosq-Brasil modificado (etanol 80°GL – 600 ml + formalina comercial – 250 ml + ácido acético glacial – 150 ml), durante 12 horas. Após esse

período, o fixador era substituído por etanol 70°GL, onde permaneciam por tempo indeterminado até o processamento histológico. Seguiram-se as etapas do processamento histológico, assim como Bancroft e Stevens (1996), descrito no item 3.12. Para o processamento microscópico, os fragmentos de rim, foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a 4° C.

3.8 Microscopia de luz

Os ovos embrionados, miracídios, cercárias, metacercárias e adultos de *P. bragai* foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, a 4° C. Após o período de fixação o material obtido foi montado em lâminas de vidro, cobertos por lamínulas e observados ao microscópio de luz Olympus BX51, acoplado a sistema de captura de imagem iTEM, câmera digital Olympus DP 12, usando campo claro e Contraste de interferência diferencial (DIC).

3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os ovos embrionados de *P. bragai* foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, a 4° C. Após o processo de fixação todos os estágios, citados acima, foram separados em microtubos e processados de seguinte forma: os ovos foram lavados no mesmo tampão por três vezes, durante 15 minutos cada lavagem, e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% por 40 minutos, no escuro. A seguir, os ovos foram lavados, novamente, por três vezes, durante 15 minutos cada lavagem no mesmo tampão e seguindo-se a desidratação em série etanólica crescente (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 3 x 100%), utilizando 30 minutos para cada concentração de álcool etílico. Após a desidratação, o material foi secado em câmara de ponto crítico CPD Balzers, utilizando CO₂ (Baltec CPD). Os ovos secos foram montados em suportes metálicos, previamente revestidos com fita dupla face de carbono e cobertos por uma camada de ouro utilizando o aparelho Balzers por 50 segundos (PINHEIRO et al., 2004). Os ovos foram observados utilizando o microscópio eletrônico de varredura Quanta 250 a 20 kV.

As cercárias, as metacercárias e o estágio adulto foram processados e observados da mesma forma que os ovos.

3.9.1 Adesão em gelatina

As lamínulas foram quebradas em pequenos pedaços e lavadas em álcool 70°GL. Preparou-se a gelatina (Vetec) a 10,0%. Com uma pinça as lamínulas, já secas foram mergulhadas na gelatina deixadas na placa de Petri coberta com papel filtro para secar, no período de *overnight*. As cercárias foram colocadas em microtubos e lavadas em tampão cacodilato de sódio, por três vezes. Após a lavagem, uma gotícula do material foi pingada sobre a lamínula recoberta com gelatina para que as cercárias pudessem sedimentar, deixou-se que o tampão evaporasse um pouco e retirou-se o seu excesso com o auxílio de uma seringa de 1 ml e foi lavado por três vezes em tampão cacodilato de sódio. O excesso de tampão foi retirado e logo em seguida, foi pingado tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% e deixou-se por 60 minutos. As lamínulas com o material foram colocadas na cesta de ponto crítico de onde se seguiu a desidratação em série etanólica crescente (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 3 x 100%), utilizando 30 minutos para cada concentração de álcool etílico. Após a desidratação, o material foi secado em câmara de ponto crítico CPD Balzers, utilizando CO₂ (Baltec CPD) e montado em suporte metálico com o auxílio da fita carbono e coberto com ouro no aparelho Balzers, por 50 segundos e observados microscópio eletrônico

de varredura Quanta 250 a 20 kV

3.9.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das lâminas de histologia

As amostras processadas como descrito no item 3.7, após terem sido cortadas, foram coletadas em lamínulas, desparafinizadas, cobertas com uma camada de 10-15 nm de espessura de ouro e analisadas no microscópio eletrônico de varredura FEI-QUANTA 250 em modo alto vácuo e com aceleração de voltagem de 15 kV.

3.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os ovos embrionados, cercárias, as metacercárias e o adulto de *P. bragai* foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a 4° C. Após o processo de fixação os ovos e as larvas, foram separados em microtubos e processados de seguinte forma: lavados três vezes no mesmo tampão de diluição do fixador e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, por 40 minutos, a temperatura ambiente, no escuro, seguindo-se a desidratação, empregando-se em série cetônica crescente (30% - 100%), utilizando trinta minutos em cada concentração de acetona e a última concentração repetida por 3 vezes. Após a desidratação, o material foi impregnado com resina Epon/ Embed -812 em proporções crescentes de resina, mantidos por 24 horas em cada diluição etapa acetona:Epon (5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5). Após esta etapa, os ovos e os estágios larvais, separadamente, foram mantidos em resina pura, montados e polimerizados em estufa, a 60° C, por 48 horas. Os blocos obtidos foram trimados manualmente e as secções ultrafinas, com 60 nm de espessura, feitas em ultramicrótomo Reichert ultracuts (Leica). Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de 300 malhas e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2,5% por 40 minutos, no escuro, sendo, em seguida, lavados três vezes em água destilada, utilizado dez minutos em cada lavagem e transferidos para uma solução aquosa de citrato de chumbo por cinco minutos e, após este tempo, lavados três vezes em água destilada, utilizando, dez minutos em cada lavagem (De Souza, 2007). Os cortes foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200, usando 80 kV. As imagens foram obtidas usando o software iTEM Olympus.

3.12 Histologia

Espécimes de *L. unilamellata* infectados experimentalmente foram dissecados conforme estabelecido no item 3.6. Todo o processamento histológico: fixação, desidratação, diafanização, impregnação, inclusão, corte e coloração, foi realizado de acordo com Bancroft e Stevens (1996) O material foi fixado assim como descrito no item 3.7, a desidratação ocorreu em série alcoólica crescente, indo do etanol 70°GL até o etanol absoluto, por um período de trinta minutos em cada etapa, com clarificação em xileno, impregnação em parafina realizada em estufa a 58°C, inclusão em molde contendo parafina, fora da estufa até a solidificação da parafina. Os cortes com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo Spencer “820”, American. Depois de corado, o material foi montado em Bálsamo do Canadá.

Foram utilizadas duas técnicas de coloração para os tecidos infectados com metacercárias, hematoxilina-eosina (HE), com o objetivo de diferenciar núcleo e citoplasma e tricrômico de Gomori, com o objetivo de identificar núcleos, fibras colágenas (LUNA, 1968). Foram utilizados esses dois tipos de técnicas de coloração, para tentar identificar componentes básicos na estrutura das metacercárias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

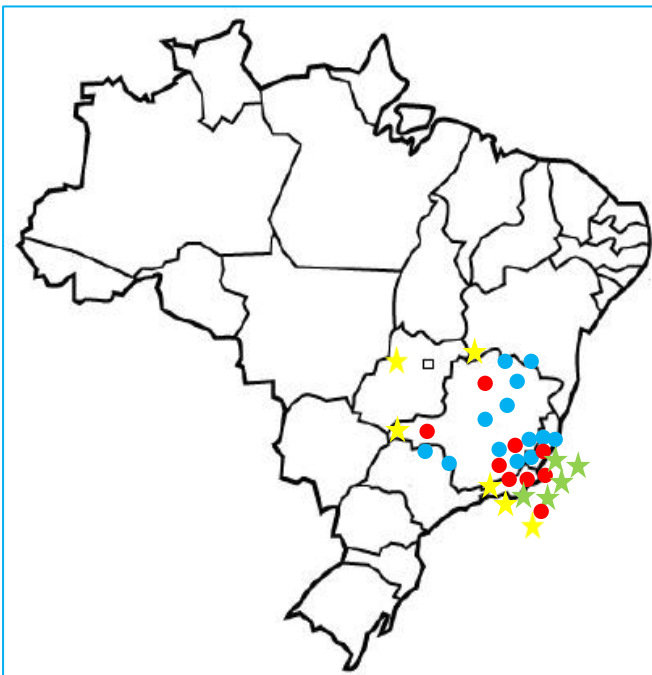
4.1. Distribuição geográfica de *Paratanaisia bragai*

A Figura 13 apresenta a distribuição geográfica de *P. bragai* conforme revisão bibliográfica realizada sobre a ocorrência deste parasito, nas aves estudadas em diferentes localidades. Na Tabela 2 observa-se o detalhamento das ocorrências de *P. bragai* destacando-se a localidade, a prevalência e intensidade da infecção e o hospedeiro definitivo parasitado com *P. bragai*.

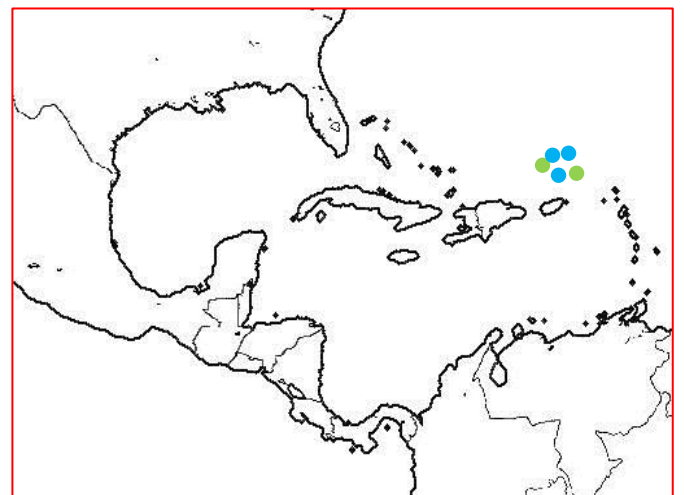
Figura 13. Distribuição geográfica de *Paratanaisia bragai*



<http://deixesuamarcanomundo.blogspot.com.br/p/objetivos.html>



<http://pro-eve.blogspot.com.br/2011/04/pova-de-geografia.html>



http://legeocapuerj.blogspot.com.br/p/acervo-de-mapas-digitais_20.html

- ★ / ● Elevada prevalência /intensidade de infecção. (>80)
- ★ / ● Média prevalência/ intensidade de infecção. (>50<80)
- ★ / ● Baixa prevalência/ intensidade de infecção. (<50)
- Ocorrência.

Tabela 2. Detalhamento da distribuição geográfica de *Paratanaisia bragai*.

Referência	Localidade	Prevalência / Intensidade da infecção	Hospedeiro definitivo	Legenda
PINTO e ALMEIDA, 1935	Rio de Janeiro, Brasil	-	<i>Columba livia domestica</i> e <i>Gallus domesticus</i>	●
REIS e NOBREGA, 1936 in Stunkard (1945) ^(*)	São Paulo	-	Pombo	●
SANTOS (1934)	Rio de Janeiro, Brasil.	15,7% / Alta intensidade de infecção (não relatado o número de parasitos)	<i>Columba livia</i> e <i>Gallus domesticus</i>	★/●
MALDONADO e HOFFMAN (1941)	Porto Rico	- / 2-20 recuperados	Pombo	●
TUBANGUI e MASILUÑGAN (1941)	Filipinas	-	Pombo doméstico	●
BARRETTO e MIES FILHO (1942)	Rio de Janeiro, Brasil.	-	<i>Meleagris gallopavo domestica</i>	●
FREITAS e HIPÓLITO (1943) in Freitas (1951)	Minas Gerais, Brasil	-	Galinhas e Perus	●
MALDONADO, 1943	Porto Rico	-	<i>Columba livia domestica</i>	●
MALDONADO, 1945a	Porto Rico	-	Pombo doméstico	●
RANGEL e MACHADO (1943) in Freitas (1951)	Minas Gerais, Brasil	-	Galinha	●
STUNKARD, 1945	Porto Rico	-	Pombo	●
BYRD e DENTON, 1950	Estados Unidos da América	8,3% / 50% / 18,1% respectivamente. 8/4/5 intensidade de infecção, respectivamente.	<i>Quiscalus quiscula aeneus</i> , <i>Limnothlypis swainsonii</i> (Audubon, 1834) e <i>Seiurus aurocapilla</i> (Linnaeus, 1766)	★/★/★ ●/●/●
FREITAS, 1951 ^(**)	Rio de Janeiro	-	<i>Columba livia domestica</i> e <i>Gallus gallus domesticus</i>	●
FRANCO, 1965	Não relatou procedência exata – Jardim Zoológico do Rio de Janeiro	-	<i>Odontophorus capueira capueira</i> (Spix, 1895)	●
PORTUGAL et al., 1972	São Paulo, Brasil.	-	<i>Columba livia domestica</i>	●

Continuação da Tabela 2.

Referência	Localidade	Prevalência / Intensidade da infecção	Hospedeiro definitivo	Legenda
CARNEIRO et al., 1975	Goiás, Brasil	16,6% / -	<i>Columbia livia domestica</i>	★
SILVA et al., 1990 ^(***)	Rio de Janeiro, Brasil	42,85% / Média 179,01	<i>Columba livia</i>	★/●
ARNIZAULT et al., 1992	Porto Rico.	- / 1,130 (um quarto de rim)	<i>Columba inornata wetmorei</i>	●
KELLER e ARAÚJO, 1992	Rio de Janeiro, Brasil.	-	<i>Gallus gallus</i>	●
FEDYNICH et al., 1996	Estados Unidos da América	(36% / variação 1-8) e (24% / variação 2-13), respectivamente.	<i>Dendrocygna autummalis</i> e <i>D. bicolor</i>	★/★ ●/●
MENEZES et al., 2001	Rio de Janeiro, Brasil.	61,1% / variação de 1-142 (em um rim)	<i>Numida meleagris</i>	★/●
SANTOS et al., 2003	São Paulo, Brasil.	56,3% / variação 3-651	<i>Columba livia</i>	★/●
PINTO et al., 2004	Rio de Janeiro, Brasil.	10,0% / 116 (em um rim)	<i>Columbina talpacoti</i>	★/●
GOMES et al., 2005	Rio de Janeiro, Brasil.	22,0% / variação de 3-153.	<i>Phasianus colchicus</i>	★/●
SILVA et al., 2005	Rio de Janeiro, Brasil.	31,80% / 272	<i>Numida meleagris</i>	★/●
BRANDOLINI e AMATO, 2006	Rio de Janeiro, Brasil.	-	<i>Columba livia</i>	●
BRENER et al., 2006 ^(****)	Rio de Janeiro, Brasil	20% / 1-209 (em um rim)	<i>Meleagris gallopavo</i>	★/●
BRANDOLINI e AMATO, 2007	Rio de Janeiro, Brasil.	63,6% / -	<i>Columba livia</i>	★/●
D'ÁVILA, 2007	Minas Gerais, Brasil.	51,42% / Média 288,8	<i>Columba livia</i>	★/●
LUPPI et al., 2007	Minas Gerais, Brasil.	-	<i>Propyrrhura maracana</i> e <i>Pyrrhura leucotis</i>	●
KUMAR et al., 2009 ^(****)	Índia	39,47% / -	<i>Columba livia</i>	★
TAVELA et al., 2010	Minas Gerais, Brasil.	-	<i>Estrilda astrild</i>	●

(-) Não relatado a prevalência e a intensidade da infecção.

(*) Apesar do trabalho de Stunkard (1945) informar que Reis e Nobrega (1936) relataram a presença de *Tamerlania bragai* em São Paulo, Freitas (1951) afirma que estes autores apenas se referem ao encontro original de Santos (1934). Portugal et al. (1972) afirmam também, que Reis e Nóbrega (1935) realizam uma revisão sobre a ocorrência de *P. bragai* em diversas espécies de aves domésticas e silvestres de vários países.

Continuação das notas explicativas da Tabela 2

(**) Freitas (1951): é uma revisão da família Eucotylidae, sendo assim, quando o autor relata o habitat e a distribuição geográfica de *P. bragai*, dá a conotação de uma análise geral, ou seja, todos os hospedeiros definitivos já parasitados (*Columba livia domestica*, *Gallus gallus domesticus* e *Meleagris gallopavo domestica*) e todos os lugares onde o parasito já foi encontrado (Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia – Brasil; Adjuntas, Rio Piedras, San Juan - Porto Rico; Manilha – Filipinas), até a presente data do trabalho publicado por Freitas (1951). Como Freitas (1951) não especificou o local dos hospedeiros definitivos estudados, o presente estudo indicou a localidade como sendo Rio de Janeiro, pois Freitas (1951) indicou como local tipo a referida cidade.

(***) As informações do trabalho de Silva et al. (1990) e Kumar et al. (2009), foram obtidas através dos resumos dos referidos trabalhos, respectivamente.

(****) O trabalho de Brener et al. (2006) apresenta dois estados brasileiros como locais de coleta dos perus analisados, são eles: Minas Gerais e Rio de Janeiro. No entanto, quando os autores relatam a prevalência e a intensidade de infecção de *P. bragai*, os mesmos não informam a localidade de procedência dos perus infectados com este parasito. No entanto, na parte da discussão, os autores relatam uma coincidência na obtenção dos parasitos no trabalho de Barretto e Filho (1942) em perus de uma área suburbana do Rio de Janeiro. Sendo assim, o presente trabalho indicou a localidade como Rio de Janeiro, devido à referida informação obtida na discussão do trabalho de Brener et al. (2006).

4.2 Aspectos histopatológicos do rim do *Columba livia* infectada por *Paratanaisia bragai*

Na análise macroscópica externa dos rins de *C. livia* naturalmente infectada por *P. bragai*, foi observada, em alguns rins, uma discreta dilatação, provavelmente, devido à presença do parasito nos túbulos coletores. Com a secção dos rins foi verificada que a região medular era facilmente identificada pela coloração marrom que apresentava devido à presença de *P. bragai* no interior dos túbulos coletores. A coloração marrom é devida à enorme quantidade de ovos no interior do útero dos espécimes adultos do parasito (Figura 14A).

A dilatação observada, no presente estudo, no entanto, não é um padrão recorrente das lesões macroscópicas observadas nos rins de aves parasitadas por *P. bragai*. Existem divergências, com relação a esta característica na literatura. A dilatação foi observada por Santos (1934) em *C. livia* e *G. gallus*, Barretto e Filho (1942), em *M. gallopavo*, Portugal et al. (1972), em *C. livia*, Arnizaut et al. (1992), em *C. i. wetmorei*, e por Brandolini (2000), em *C. livia*. No entanto, não foi verificada por Menezes et al. (2001), em *N. meleagris*, e Pinto et al. (2004), em *C. talpacoti*.

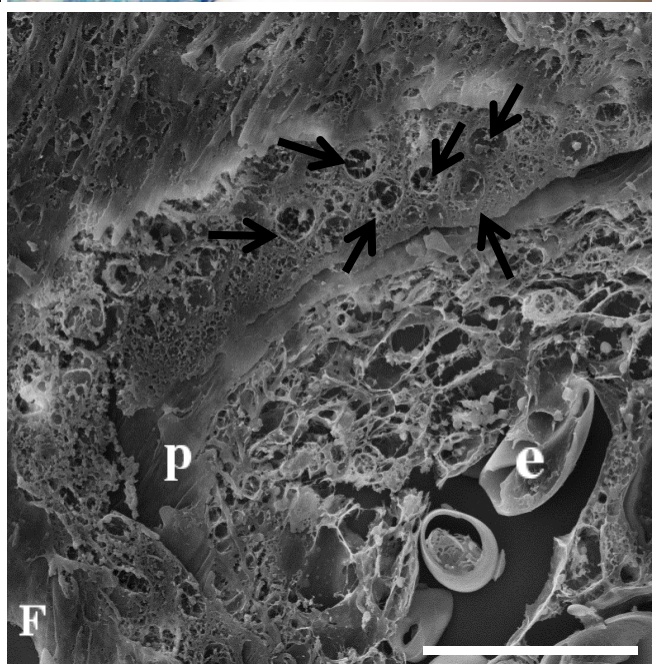
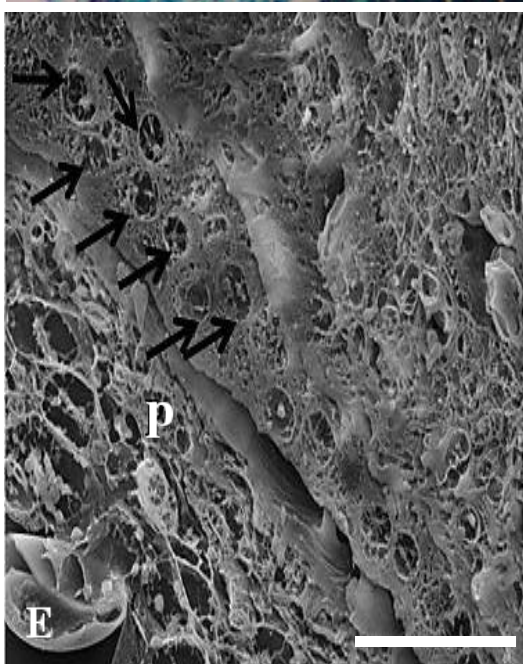
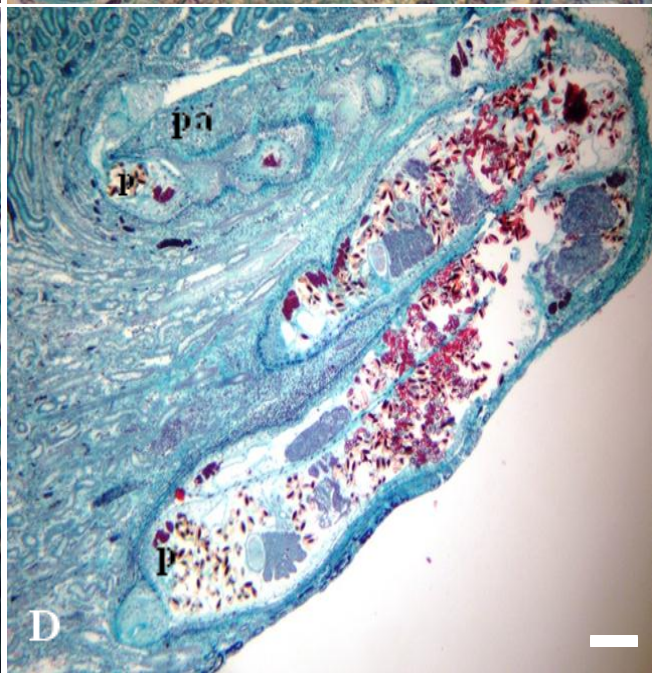
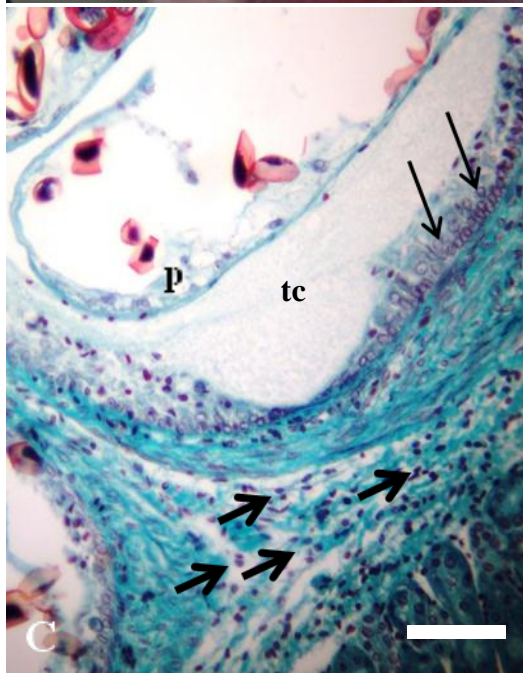
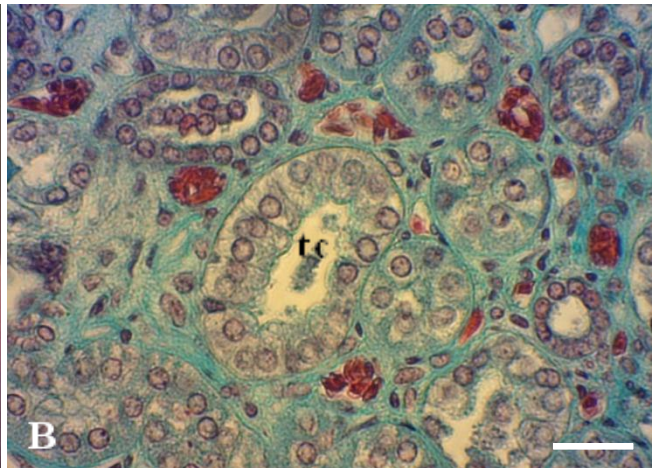
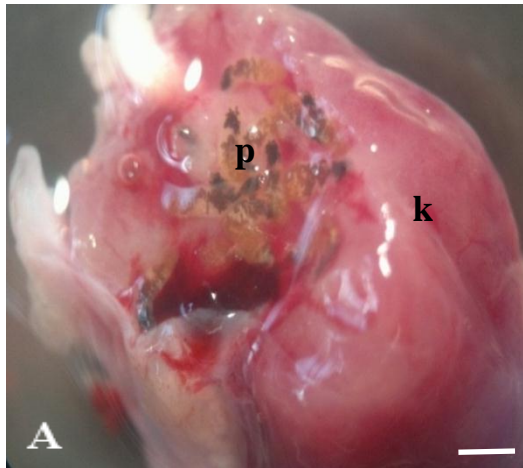
No presente trabalho, não foi verificada, nas aves parasitadas por *P. bragai*, nenhum sinal que pudesse ser atribuída como consequência da infecção pelo parasito.

A análise histológica do rim de *C. livia*, revelou que os túbulos coletores do rim não infectado, apresentavam-se revestidos por epitélio cúbico simples, como pode ser observado na (Figura 14B).

O exame microscópico dos cortes histológicos do rim de *C. livia* naturalmente infectada por *P. bragai*, mostrou importante dilatação dos túbulos renais, devido à presença do parasito (Figura 14C).

Observou-se um processo inflamatório com células mononucleares nos túbulos coletores parasitados (Figura 14C). Foi possível verificar nos túbulos coletores parasitados a formação de uma estrutura digitiforme (formação papilífera) projetando-se para a luz tubular (Figura 14D). Foi observada a ocorrência de metaplasia no epitélio da parede dos túbulos coletores, de epitélio cúbico simples a pseudoestratificado (Figura 14C). A confirmação da mudança do epitélio de cúbico simples para pseudoestratificado foi feita através da microscopia eletrônica de varredura das lâminas dos cortes histológicos dos rins naturalmente infectados de *C. livia*. Foi possível observar, claramente, os núcleos das células da parede do túbulo coletor em alturas diferentes (Figuras 14E – 14F).

Figura 14. Rim de *Columba livia*. A. Secção do rim (k) naturalmente parasitado por *Paratanaisia bragai* (p) no interior dos túbulos renais, evidenciando a coloração castanha escura. Barra de escala = 10 mm. B. Região medular do rim não infectado, mostrando os túbulos coletores (tc) com revestimento cúbico simples. Tricrômico de Gomori. Barra de escala = 20 µm. C. Região medular do rim naturalmente infectado com *Paratanaisia bragai*, mostrando os túbulos coletores (tc) dilatados pela presença do parasito (p). Epitélio-pseudoestratificado, com núcleos (setas finas) em diferentes alturas. Processo inflamatório (setas largas). Tricrômico de Gomori. Barra de escala = 20 µm. D. Formação de uma estrutura digitiforme - formação papilífera (pa) nos túbulos coletores projetando-se para a luz tubular. Tricrômico de Gomori. Barra de escala = 50 µm. E e F. Microscopia eletrônica de varredura da lâmina com cortes histológicos. Evidência do epitélio-pseudoestratificado, com núcleos (setas) em diferentes posições, da parede do túbulo coletor após a infecção experimental de *P. bragai* (p) com os ovos (e) em *C. livia*. Barra de escala= 30 µm e 40 µm respectivamente.



A ocorrência de *P. bragai* é comum nas aves domésticas no Estado do Rio de Janeiro (GOMES et al., 2005). *Paratanaisia bragai* apresenta baixa patogenicidade, o que pode ser observado quando há uma infecção média e a não verificação da reação inflamatória, como observado por Pinto et al. (2004). No entanto, uma elevada carga parasitária poderia ser responsável pelo desenvolvimento da monostomose renal que se caracteriza pela perda de peso das aves, diarreia intermitente com sangue e muco, podendo até mesmo levar à morte (ARNIZAUT et al., 1992).

Aves selvagens infectadas com *P. bragai*, podem atuar como reservatórios, por apresentar estreito contato com galiformes domésticos, na partilha de alimentos (GOMES et al., 2005). Além disso, a migração pode contribuir para que pássaros selvagens infectados por trematódeos introduzam helmintos em novas áreas, o que representa um grande risco de que os hospedeiros nativos sejam expostos à infecção (HUFFMAN, 2008).

Estes fatores conferem a *P. bragai* importância médico-veterinária, pois a infecção de dos hospedeiros pode acarretar prejuízos econômicos podendo causar lesões graves que resultem na morte do hospedeiro.

A análise macroscópica, do presente estudo, é corroborada por Santos (1934) que verificou que externamente, alguns rins, de *C. livia* e *G. gallus*, apresentavam-se com tamanho um pouco aumentado. O mesmo foi verificado por Barretto e Filho (1942), em apenas um dos rins, em *M. gallopavo domestica*, Portugal et al. (1972) em *C. livia*, Arnizaut et al. (1992) em *C. i. wetmorei*, e por Brandolini (2000) em *C. livia*. Diferentemente de Menezes et al. (2001) em *N. meleagris*, Pinto et al. (2004) em *C. talpacoti*, e Brener et al. (2006) em *M. gallopavo*. Barretto e Filho (1942) verificaram ainda a atrofia acentuada do outro rim, aspecto não verificado no presente trabalho.

Observações macroscópicas de secções de rim de aves infectadas demonstraram a presença de parasitos adultos no interior dos túbulos coletores. A maturidade destes parasitos foi evidenciada pela coloração castanha escura, que é devido à grande quantidade ovos presentes no útero dos mesmos. Elevadas taxas de infecção podem determinar obstrução e hipertrofia dos túbulos, conforme resultados apresentados no presente estudo e também observados por (SANTOS, 1934; BARRETTO e FILHO, 1942; BRANDOLINI, 2000; MENEZES et al., 2001; PINTO et al., 2004; BRENER et al., 2006).

A análise microscópica do tecido, no presente estudo, em relação à dilatação dos túbulos coletores da região medular, devido à presença de *P. bragai* está de acordo com Santos (1934) em *G. gallus*, Barretto e Filho (1942) em *M. gallopavo domestica*, Kumar et al. (2009) em *C. livia* e por Unwin et al. (2013) que analisaram *Paradisaea rubra* Daudin, 1800 e *Zenaida graysoni* Lawrence, 1871.

A classificação do tipo de epitélio da parede do túbulo coletor, quando na presença de *P. bragai*, apresenta algumas divergências na literatura. De acordo com Santos (1934) os túbulos coletores apresentavam parede espessa e epitélio multiestratificado, comprimindo os túbulos vizinhos. Esta denominação de epitélio multiestratificado foi utilizada por Ross et al. (1993) para classificarem a epiderme, uma das camadas da pele. Esta denominação significaria revestimento que possui várias camadas de células achatadas e justapostas.

O epitélio da parede do túbulo coletor de *C. livia*, não infectada, é classificado como cúbico simples. Quando parasitado, o epitélio da parede do túbulo muda sua aparência (BRANDOLINI, 2000), característica ratificada no presente estudo, de cúbico simples a pseudoestratificado e formato prismático. De acordo com Junqueira e Carneiro (1995) pseudoestratificado, é uma denominação utilizada para classificar o epitélio quanto ao número de camadas, que na verdade apresenta apenas uma camada, apesar de aparentar várias, em decorrência dos núcleos em diferentes alturas.

A aparência de várias camadas de células poderia justificar a classificação adotada por Santos (1934) de epitélio multiestratificado. No entanto, a classificação adotada por Santos

(1934), também, pode ter sido equivocada, já que uma metaplasia pode ter ocorrido no epitélio dos túbulos coletores, em decorrência da infecção de *P. bragai*, parâmetro sustentado no presente estudo. Com a infecção por *P. bragai* os núcleos poderiam ter adquirido diferentes posições, e desta forma seriam classificados de pseudoestratificados, e não de multiestratificados. Sendo assim, possivelmente, não deve ter ocorrido o surgimento de várias camadas de células no trabalho de Santos (1934) e sim o deslocamento dos núcleos, além do alongamento das células, como verificado no presente trabalho.

Pinto et al. (2004) e Gomes et al. (2005) verificaram o achatamento das células do epitélio dos túbulos coletores e Kumar et al. (2009) verificaram a atrofia do epitélio de revestimento, resultados que o presente estudo não ratifica.

A ocorrência de inflamação, próximo aos túbulos coletores, em decorrência da presença de *P. bragai*, que foi observada no presente estudo ratifica os trabalhos de Arnizaut et al. (1992) que observaram um infiltrado intersticial de células inflamatórias no interior dos túbulos renais, composto de heterófilos e eosinófilos. Menezes et al. (2001) que observaram em *N. meleagris*, parasitada por *P. bragai*, discreta inflamação com presença de heterófilos ao redor dos túbulos. Silva et al. (2005) que observaram uma nefrite intersticial crônica predominantemente heterofílica. Unwin et al. (2013) verificaram, também, nefrite intersticial. Gomes et al. (2005) que verificaram uma reação inflamatória com granulócitos. Brener et al. (2006) que verificaram um discreto infiltrado heterofílico entre as células mononucleadas.

Os sinais clínicos decorrente da infecção de *P. bragai*, foram relatados na literatura, em algumas aves parasitadas, tal como descreve Arnizaut et al. (1992), como perda de peso e diarreia mucoide sanguinolenta intermitente que resultava em morte. Unwin et al. (2013) relataram a morte de *Z. Graysoni*, e sugerem que a morte das aves foi decorrente da infecção de *P. bragai*, pois as aves apresentavam pronunciadas lesões renais. No trabalho de Kumar et al. (2009) foi verificada, no rim de *C. livia* parasitada por *P. bragai*, hemorragias ocasionais. Outros sintomas foram abordados por Portugal et al. (1972), como abatimento, aspecto sonolento e penas eriçadas. Após o surgimento dos sintomas, os pombos morriam, além disso, verificaram, também, a presença de um rim policístico. Os cistos apresentavam um líquido de cor clara e substância granulosa. De maneira semelhante, Kumar et al. (2009) verificaram, crescimentos nodulares em decorrência de hemorragias, no rim de *C. livia* parasitada por *P. bragai*. Estes sinais, não foram evidenciados no presente estudo, o que pode estar relacionado à grande dilatação da parede desses túbulos, não impedindo assim, a passagem de urina (PINTO et al., 2004).

O presente estudo não verificou nenhum tipo de sinal, decorrente da infecção de *P. bragai*. Os sinais podem estar relacionados com a carga parasitária do hospedeiro definitivo. Pinto et al. (2004) revelam que elevadas cargas parasitárias, poderiam resultar no desenvolvimento de determinados sinais, e citam os sinais do trabalho de Arnizaut et al. (1992). No entanto, as severidades das lesões microscópicas não estariam relacionadas ao tamanho da carga parasitária, o que demonstraria a baixa patogenicidade de *P. bragai* (PINTO et al., 2004). De maneira semelhante, Menezes et al. (2001) afirmam que apesar, do grande tamanho do parasito adulto, do local da infecção e da sua intensidade média; estes fatores não resultaram em lesões macroscópicas ou microscópicas graves.

O presente estudo, no entanto, verificou elevada carga parasitária, e mesmo assim, não observou nenhum sinal, que pudesse ser apontado como consequência da presença de *P. bragai*. Sendo assim, outros fatores, além da carga parasitária, devem ser levados em consideração. De acordo com Gomes et al. (2005), o local da infecção, linhagem do parasito e do hospedeiro podem determinar a gravidade das lesões.

4.3 Vitelogenese e oogênese em *Paratanaisia bragai*

A ultraestrutura do folículo vitelogênico de *P. bragai* está sendo descrita pela primeira vez, neste presente estudo, são observadas células vitelogênicas em diferentes estágios de desenvolvimento, são eles: estágio I, estágio II, estágio III e estágio IV, conforme apresentado pela (Figura 15).

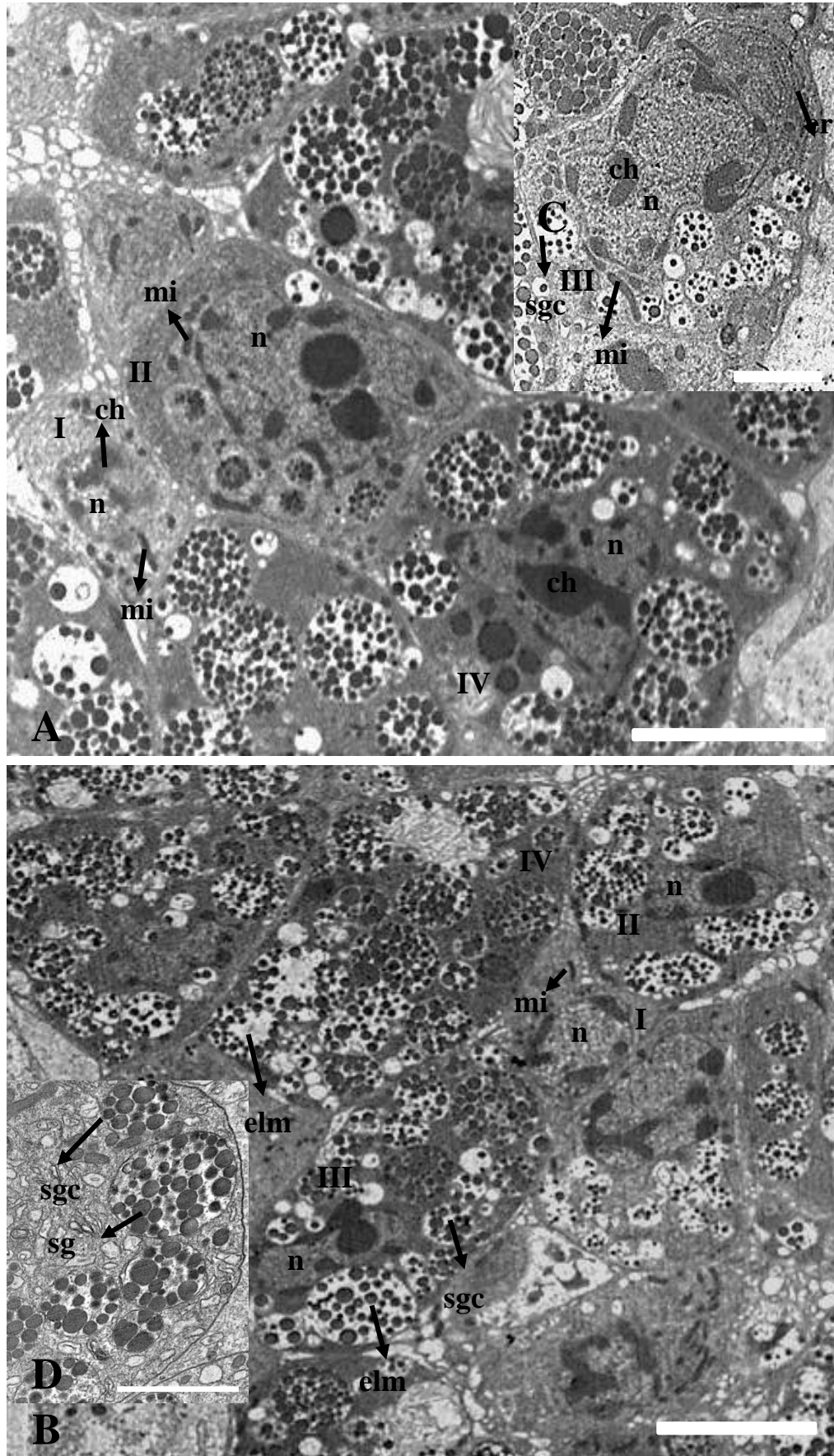
O estágio I representa células vitelogênicas imaturas, de formato irregular, com núcleo irregularmente arredondado, ocupando a maior parte do volume da célula, com elevada razão núcleo/citoplasma, cromatina difusa e ausência de glóbulos da casca no citoplasma.

O estágio II representa células vitelogênicas maiores, com aumento do volume do núcleo e do citoplasma, no entanto a razão núcleo/citoplasma diminui. O núcleo apresenta manchas eletrondensas de cromatina, mais condensada quando comparada com a do estágio anterior, o citoplasma apresenta mitocôndrias. A principal diferença observada com relação ao estágio anterior é a presença de glóbulos da casca, que podem aparecer de forma simples ou agregados em uma aglomeração de glóbulos da casca rodeados por uma membrana.

O estágio III representa células vitelogênicas com menor razão núcleo/citoplasma com uma cromatina maior e mais condensada, quando comparado com os estágios anteriores. O aspecto característico deste estágio é a presença de um maior número de aglomerados de glóbulos da casca que estão rodeados por uma membrana e localizados mais para a periferia da célula, além disso, cada aglomerado apresenta uma matriz eletrôn-lucente, que aumenta de tamanho com o desenvolvimento da célula. Cada aglomerado apresenta um aumento no número de glóbulos da casca no seu interior. Retículo endoplasmático rugoso apresenta-se numeroso paralelo ao redor do núcleo.

O estágio IV representa as células vitelogênicas maduras com grande número de aglomerados de glóbulos da casca localizados na periferia das células, presença de uma maior matriz eletrôn-lucente no interior dos aglomerados. Algumas células desse estágio apresentam núcleo até mesmo com nucléolo em outros o núcleo não foi visualizado.

Figura 15. Caracterização da vitelogênese em *Paratanaisia bragai* através da microscopia eletrônica de transmissão. A e B. Folículos vitelogênicos com células em vários estágios de desenvolvimento (I, II, III e IV). Barra de escala = 5 μ m e 2 μ m, respectivamente. No estágio I verifica-se o núcleo (n), cromatina (ch) e mitocôndria (mi). No estágio II observa-se o núcleo (n), cromatina (ch), mitocôndrias (mi) e aglomerados de glóbulos da casca (sgc). No estágio III há o núcleo (n), aglomerados de glóbulos da casca (sgc) e matriz eletrônica-lucente (elm). O estágio IV apresenta o núcleo (n), cromatina (ch), com numerosos glóbulos da casca (sgc) e matriz eletrônica-lucente (elm). C. Detalhe do estágio III com a presença de retículo endoplasmático (ER) próximo ao núcleo (n), presença de mitocôndrias (mi) e aglomerados da casca (sgc). Barra de escala = 2 μ m. D. Detalhe de vários aglomerados de glóbulos da casca (sgc) e os glóbulos da casca (sg) em seu interior. Barra de escala = 2 μ m.



A vitelogênese observada em *P. bragai* apresenta quatro estágios de desenvolvimento, desde células indiferenciadas (estágio I), passando por dois estágios de desenvolvimento intermediários, início da diferenciação (estágio II), avançado estágio de maturação (estágio III) e vitelócitos maduros (estágio IV), assim como observado em outros digenéticos, tais como *Maritrema felii* Gracenea, Montoliu e Deblock, 1993 (ŚWIDERSKI et al., 2011), *Metadena depressa* (GREANI et al., 2012) e *Acanthostomum (Atrophocaecum) anwaninesis* Wannas, 1977 (TAELEB e LASHEIN, 2013). No entanto, existem trabalhos como os de Irwin e Threadgold (1970), com *F. hepatica* e Sampour (2008) com *Haploporus lateralis* Looss, 1902 que apresentam vitelogênese dividida em três estágios de desenvolvimento, assim como, verificado por D'ávila et al. (2010) em *T. inopina*, onde os autores afirmam que o sistema reprodutor desta espécie e *T. bragai* são muito semelhantes. Algumas estruturas podem quando observadas na ultraestrutura, diferirem durante o processo de maturação, principalmente quando comparado com outros platelmintos (GREANI et al., 2012).

No presente estudo ratificou-se que no estágio I de desenvolvimento das células vitelogênicas, a presença de poucas mitocôndrias e a ausência de glóbulos da casca (GREANI et al., 2012; PODDUBNAYA et al., 2012; SAMPOUR, 2008; ŚWIDERSKI et al., 2011; TAELEB e LASHEIN, 2013).

A relação núcleo/citoplasma ao longo da vitelogênese diminui, em decorrência da síntese das inclusões citoplasmáticas, assim como foi observado por Świdorski et al. (2011) em *M. felii*, Greani et al. (2012) em *M. depressa*, Poddubnaya et al. (2012) em *Phyllodistomum angulatum* Linstow, 1907 e *Azygia lucii* (Muller, 1776), Taeleb e Lashein (2013) em *A.(A.) aswaninesis*.

A principal diferença observada, no presente estudo, entre o estágio I e o estágio II de desenvolvimento das células vitelogênicas é a presença no estágio II dos glóbulos da casca (GREANI et al., 2012; PODDUBNAYA et al., 2012; ŚWIDERSKI et al., 2011; TAELEB e LASHEIN, 2013).

De acordo com Świdorski et al. (2011) os glóbulos da casca são substâncias proteicas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, que são empacotados em pequenos glóbulos dentro de uma fina membrana ligada ao complexo de Golgi. Inicialmente pequenos grânulos esféricos do complexo de Golgi aparecem no interior de vesículas com material eletrólucido, há o crescimento e a diferenciação, e em seguida o surgimento de pequenas ilhas ou subunidades eletrondensas, que levam à transformação do grânulo proteico para os aglomerados dos glóbulos da casca, que apresentam em seu interior, glóbulos de vários tamanhos. De maneira, não tão detalhada, Poddubnaya et al. (2012) afirmaram que o material vitelínico que se condensa em vesículas originará os glóbulos da casca de diferentes tamanhos, menores no início e maiores ao longo do desenvolvimento.

Os resultados obtidos, no estudo, demonstram que o estágio III apresenta maior número de aglomerados dos glóbulos da casca que o estágio II, assim como observado por Świdorski et al. (2011), Greani et al. (2012), Poddubnaya et al. (2012) e Taeleb e Ashein (2013). Estes aglomerados apresentam vários glóbulos no seu interior, que segundo Poddubnaya et al. (2012) podem variar de 2-20 e que estão embutidos em uma fina matriz fibrilar. A presença de glicogênio neste estágio é controversa, pois Greani et al. (2012) não observaram em *M. depressa*, já Taeleb e Lashein (2013) observaram em *A.(A.) aswaninesis*. Durante a realização do estudo não foram realizados testes ultrahistoquímicos para a detecção de glicogênio.

O estágio de maturação, estágio IV, foi caracterizado pelo estudo presente, por apresentar numerosos aglomerados dos glóbulos da casca, com um grande número de glóbulos no seu interior. Foi observado que algumas células vitelogênicas, neste estágio, apresentavam núcleo e outras, não. Esta característica foi verificada na literatura, Świdorski et al. (2011) e Taeleb e Lashein (2013) afirmaram que no estágio de maturação, o núcleo

desaparece, no entanto, Greani et al. (2012) verificaram a presença de núcleo, assim como, Poddubnaya et al. (2012), no entanto estes autores classificaram o estágio de maturação das células vitelogênicas, como estágio V. A grande diferença do estágio IV, para os estágios anteriores é relatada na literatura quanto à presença de gotículas de lipídios. Esta observação não pode ser questionada pelo presente estudo, pois não foram realizados testes para a detecção de lipídios.

Apesar do presente estudo não ter verificado a presença de glicogênio e de gotículas lipídicas nas células vitelogênicas de *P. bragai*, pois não realizou testes para estes fins, é provável que estas substâncias ocorram, em decorrência das funções das células vitelogênicas, que segundo Irwin e Threadgold (1970), podem secretar proteínas e servir como reserva de nutrientes para o desenvolvimento do embrião. No entanto, para a localização destas substâncias, e em qual estágio elas se encontram, há a necessidade de estudos futuros.

A oogênese em *P. bragai* é caracterizada pela presença de três estágios de desenvolvimento: oogônia, oócitos primários e oócitos maduros, que são observados na (Figura 16).

No primeiro estágio, as oogônias são células menores de formato irregular, com um grande núcleo que ocupa quase que todo volume celular, ou seja, o citoplasma é reduzido. O núcleo apresenta manchas de cromatina e o citoplasma apresenta poucas mitocôndrias.

O segundo estágio, os oócitos primários, apresenta núcleo um pouco menor quando comparado com o estágio anterior. O citoplasma apresenta um grande número de mitocôndrias. O núcleo apresenta um grande nucléolo, com a presença de poros nucleares, e em algumas células deste estágio, há a presença o complexo sinaptonêmico (Figura 17A) no nucleoplasma, que caracteriza o estágio denominado de zigóteno-paquíteno da primeira divisão meiótica.

O terceiro estágio, os oócitos maduros, apresenta uma diminuição da razão núcleo/citoplasma, no entanto há um aumento de volume do citoplasma da célula. Há pequenos aglomerados de cromatina próximos a membrana nuclear. As mitocôndrias tendem a formar aglomerados (Figura 17B) e aumento em número conforme a maturação dos oócitos e corpos cromatóides aparecem frequentemente rodeados por mitocôndrias, que podem ser observadas com detalhe na (Figura 17D)

Verificou-se a presença de células acessórias alongadas (Figura 17C), localizadas na periferia da gônada de *P. bragai* e entre as células vitelogênicas.

Figura 16. Caracterização da oogênese em *Paratanaisia bragai* através da microscopia eletrônica de transmissão. A. Visão geral da gônada contendo os estágios I, II e III. No estágio I identifica-se o núcleo (n) e manchas de cromatina (ch), no estágio II, localiza-se o núcleo (n) e o nucléolo (nl) e o estágio III visualiza-se o núcleo (n). Barra de escala = 10 μ m. B. Detalhe dos três estágios. Estágio I visualiza-se o núcleo (n) e mitocôndrias (mi), assim como no estágio III e II, que também possui um nucléolo (nl) bem definido. Barra de escala = 2 μ m.

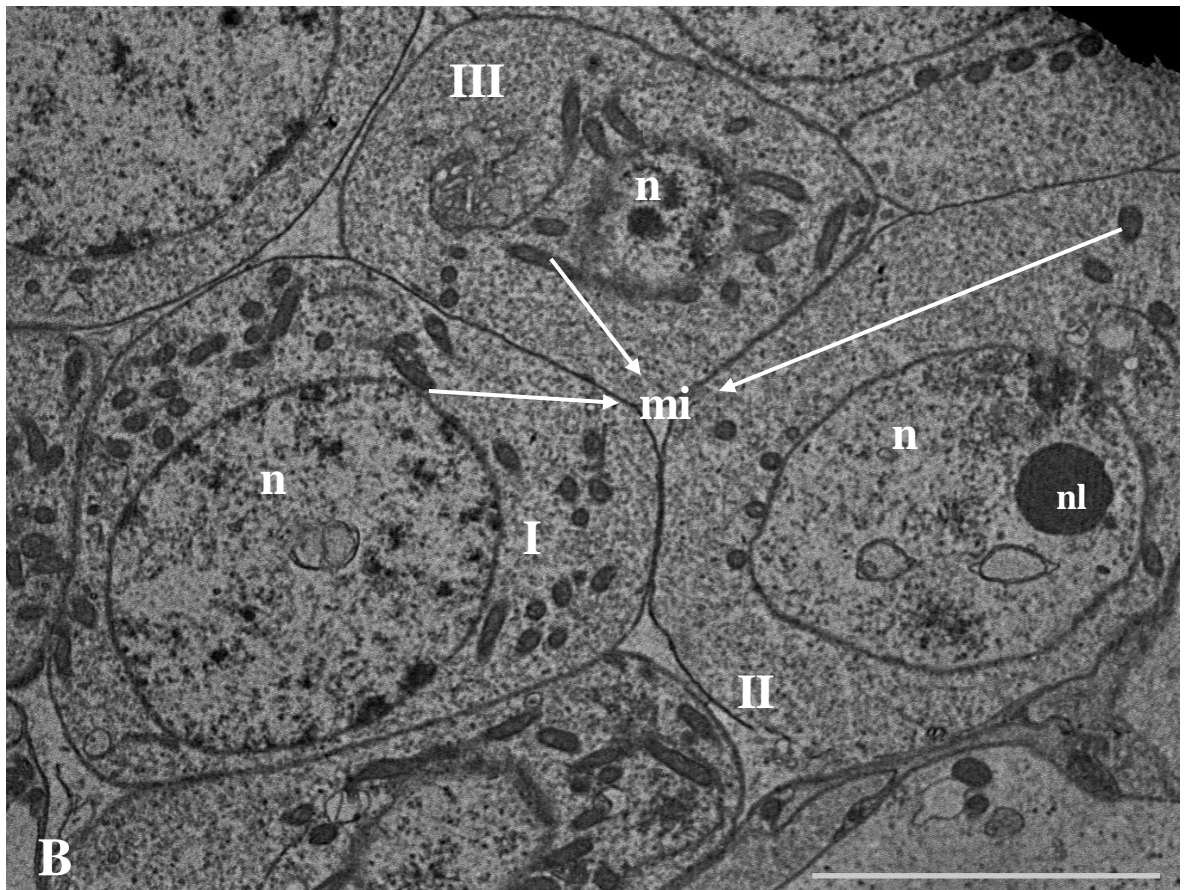
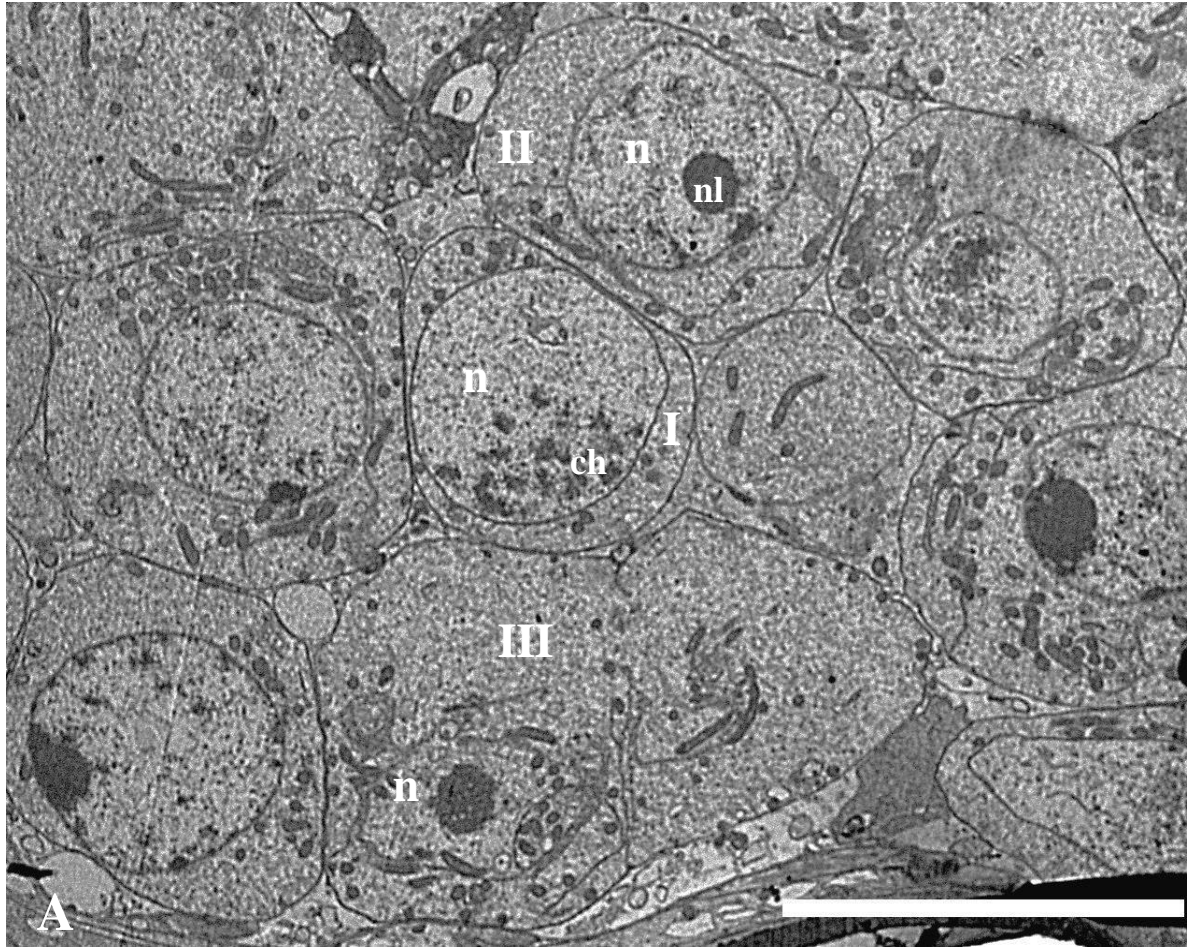
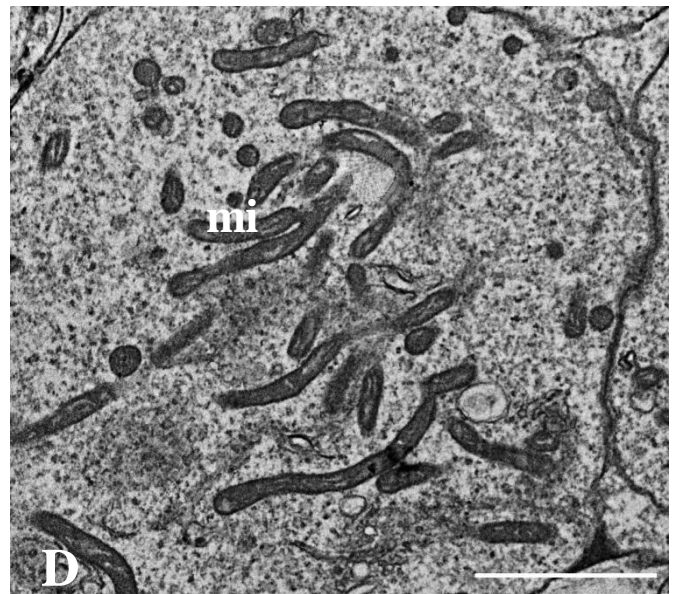
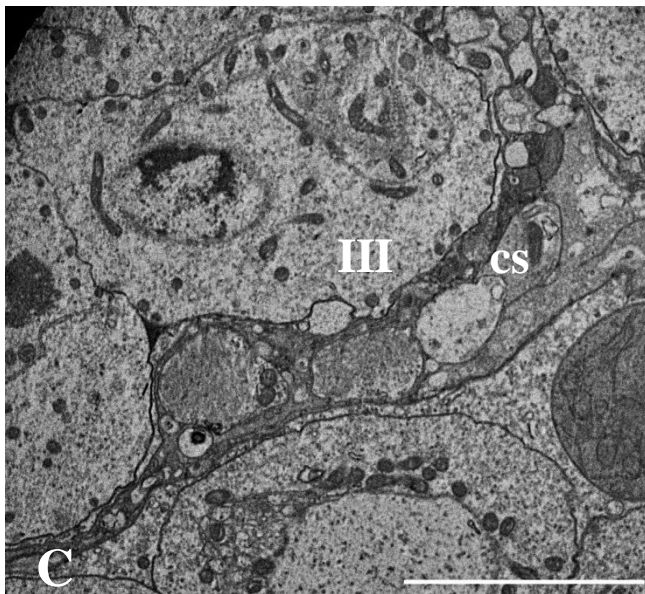
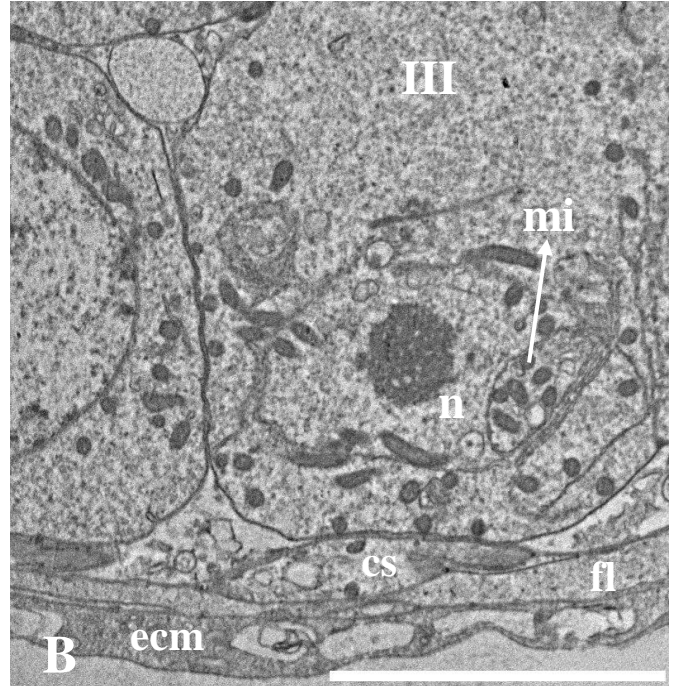
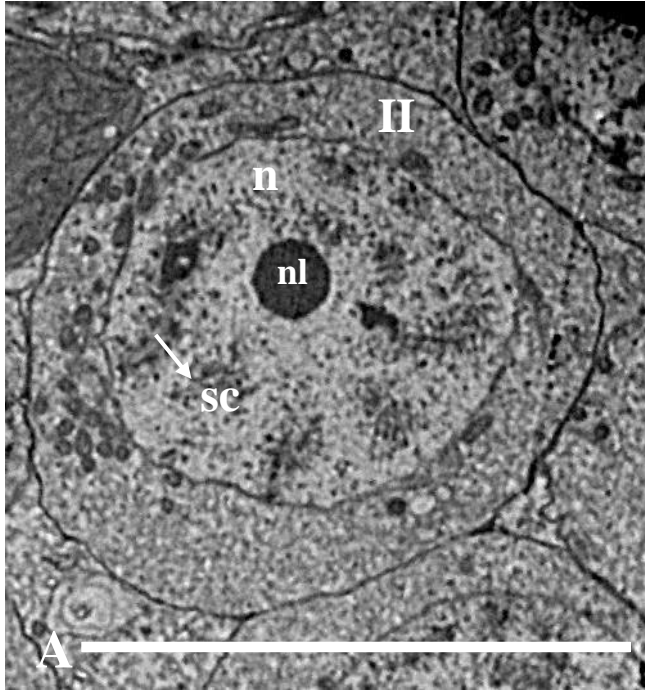


Figura 17. Caracterização da oogênese em *Paratanaisia bragai* através da microscopia eletrônica de transmissão. A. Detalhe do estágio II com a presença do núcleo (n), nucléolo (nl) e o complexo sinaptonêmico (sc). Barra de escala = 10µm. B. Detalhe do estágio III com núcleo (n) e aglomerados de mitocôndrias (mi), além disso, a visualização de uma célula acessória na periferia (cs) da gônada onde se verificou a matriz extracelular (ecm) e a camada fibrosa extracelular (fl). Barra de escala = 5µm. C. Visualização de uma célula acessória (cs) entre as células da oogênese, no detalhe uma célula em estágio III. Barra de escala = 5µm. D. Detalhe das mitocôndrias (mi). Barra de escala = 2µm.



A oogênese em *P. bragai* é caracterizada pela presença de três estágios, assim como observado por Cifrian et al. (1993) em *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) e Greani et al. (2012) em *M. depressa*. Já Björkman e Thorsell (1964) verificaram apenas dois tipos celulares em *F. hepatica*, oogônia e oócitos.

No presente estudo ratificou-se as estruturas observadas no estágio de oogônia de *P. bragai*, com Greani et al. (2012) ao verificar o tamanho reduzido da célula e o grande núcleo. Já o citoplasma com poucas mitocôndrias foi verificado também, por Cifrian et al. (1993), Charni et al. (2010) e Greani et al. (2012). Quanto ao formato da célula, há divergências, pois a oogônia de *P. bragai* apresenta formato irregular, assim como afirmaram Greani et al. (2012), já Cifrian et al. (1993), Charni et al. (2010) afirmaram que as células apresentavam formato elíptico e Björkman e Thorsell (1964) verificaram formato ovoide.

A presença do complexo sinaptonêmico no segundo estágio, oócito primário, é corroborada pelo estudo atual, assim como verificado por Cifrian et al. (1993) e Greani et al. (2012). No entanto, este complexo não foi verificado em todos os oócitos primários de *P. bragai* observados. Nos oócitos em que não foi possível a visualização deste complexo, foram classificados como segundo estágio, em decorrência da presença de nucléolo bem desenvolvido.

O oócito maduro em *P. bragai*, assim como em *D. dendriticum*, de acordo com Cifrian et al. (1993) e em *M. depressa* conforme Greani et al. (2012), é caracterizado pelo aumento do diâmetro, cromatina difusa no núcleo e mitocôndrias formando aglomerados.

A presença de células acessórias na oogênese em *P. bragai* ratifica os achados de Björkman e Thorsell (1964) que observaram a presença de células enfermeiras, que em trabalhos mais recentes, são denominadas de células acessórias, localizadas na periferia do ovário de *F. hepatica*. Charni et al. (2010) observaram células acessórias na periferia e entre as células germinativas de *D. sicula*, assim como observado para *P. bragai*, no presente estudo. Charni et al. (2010) verificaram também, que as células acessórias apresentam formato alongado, com muitas mitocôndrias, núcleo achatado com manchas de heterocromatina. Nas células acessórias de *P. bragai*, no entanto, não foi possível a observação do núcleo, apenas pouquíssimas mitocôndrias, células de formato alongado na periferia e irregular entre as células vitelogênicas.

Gremigni e Falleni (1998) afirmaram que as células acessórias podem oferecer informações relevantes, já que em alguns grupos estas células parecem ser ricas em organelas e produtos, sugerindo que participem do processo de produção do vitelo, enquanto que em outros grupos as células acessórias apresentam apenas um corpo central, com núcleo, uma fina borda e citoplasma quase desprovido de organelas e aparentemente inativo.

Karling (1940) in Gremigni e Falleni (1998) verificou que a organização celular da gônada feminina apresenta grande importância para o estudo da evolução dos platelmintos, inclusive com a possibilidade de fornecer informações para a definição da monofilia do grupo. Karling (1940) in Gremigni e Falleni (1998) verificou que a organização celular da gônada feminina tinha grande importância como característica dentro da evolução dos platelmintos, com caracteres plesiomórficos e sinapomórficos que podem caracterizar um grupo como monofilético.

Verifica-se assim, a importância da realização de estudos mais detalhados, envolvendo a caracterização ultraestrutural do sistema reprodutor feminino de trematódeos digenéticos, como subsídio para uma maior compreensão sobre a morfologia e a fisiologia gonadal, já que os resultados destes estudos contribuirão para a elucidação sobre a filogenia deste grupo. O presente estudo é o pioneiro na classificação das células do ovário e vitelário de *P. bragai*, no entanto, os estudos necessitam de continuidade para maior compreensão deste sistema.

4.4 Ovos de *Paratanaisia bragai*: microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e morfometria

A análise morfométrica de 90 ovos, cujos alguns desenhos encontram-se na (Figura 18A), demonstrou um comprimento médio igual a $41,83 \pm 2,74 \mu\text{m}$ (35,06 – 49,06) e largura média igual a $18,33 \pm 1,55 \mu\text{m}$ (13,79 – 22,49). E o opérculo apresenta $7,49 \pm 0,75 \mu\text{m}$ (6,59 – 8,24) de comprimento e $7,11 \pm 0,90 \mu\text{m}$ (5,76 – 7,80) de largura (Tabela 3).

As análises por microscopia de luz demonstraram que os ovos apresentavam formato elíptico e colorações diferentes, o que estava relacionado ao processo de tanificação da casca dos ovos de *P. bragai*. Foi possível observar o miracídio totalmente formado em seu interior (Figuras 18B - 18D), além da visualização do opérculo, não só no maior aumento como também, em menor aumento (Figuras 18C – 18D).

A diferença observada na coloração dos ovos de *P. bragai*, quando observados através da microscopia de luz, está relacionada ao processo de tanificação das proteínas, que ocorre no oótipo do parasito adulto de trematódeos digenéticos. O processo de tanificação das proteínas na casca dos ovos de *F. hepatica* foi verificado por Smyth (1954), que observou, através da histoquímica, forte reação positiva para a detecção da polifenol oxidase nos tecidos, através da técnica de catecol, nas células das glândulas vitelogênicas. Nesta reação compostos fenólicos são oxidados, resultando em quinonas que combinadas com proteínas resultam nas proteínas tanificadas (esclerotinas) cujos precursores, de acordo com Smyth e Clegg (1959), são as proteínas, fenóis e fenolases.

Tabela 3. Medidas dos ovos de *Paratanaisia bragai*.

Medidas (μm)	Ovos	Opérculo
	X \pm SD	X \pm SD
Comprimento	$41,83 \pm 2,74$ (35,06 – 49,06) μm	$7,49 \pm 0,75$ (6,59 – 8,24) μm
Largura	$18,33 \pm 1,55$ (13,79 – 22,49) μm	$7,11 \pm 0,90$ (5,76 – 7,80) μm

() Números entre parênteses representam os valores mínimo e máximo observados. X \pm SD = média \pm desvio-padrão.

Existe uma escassez na literatura quanto ao estudo dos ovos de *P. bragai*, principalmente utilizando microscopia eletrônica. Brandolini (2000) observou ovos de *P. bragai*, através da microscopia eletrônica de varredura e registrou o comprimento dos ovos $31,33 \mu\text{m}$ e a presença do opérculo. Sendo assim, o presente estudo apresenta especial relevância, pois apresenta detalhes da morfologia dos ovos de *P. bragai*.

Na microscopia eletrônica de varredura foram observados ovos agrupados (Figura 19 A) em um espécime que se rompeu ao longo do processamento, permitindo observá-los ainda no interior do corpo do parasito adulto. Ovos isolados também foram observados, permitindo uma melhor descrição de suas características morfológicas. Foi possível verificar, assim como na microscopia de luz que os ovos apresentam formato elíptico (Figura 19 B). Na região opercular a linha entre o opérculo e a casca do ovo apresenta-se bem evidente (Figuras 19 C – 19 D), região considerada a extremidade anterior do ovo. Foi possível observar, também, a região abopercular, considerada a extremidade posterior do ovo, ou seja, região contrária à

região opercular. Na região abopercular verificou-se a presença de um nó proeminente, que se destacava da superfície do ovo, com formato da letra “U” (Figura 19 E).

A região abopercular foi verificada por Krejci e Fried (1994) onde os autores propuseram que o nó da extremidade abopercular dos ovos de *Echinostoma* Rudolphi, 1809 fosse uma estrutura relacionada ao ponto de fixação do ovo em formação no oótipo do verme adulto.

O presente estudo compara a região abopercular de *P. bragai* com espécies de *Echinostoma* spp. Krejci e Fried (1994) compararam as espécies de *E. caproni* e *E. trivolvis*, onde os autores afirmam que o nó de *E. trivolvis* apresenta invaginações profundas com dobras na casca, e contrariamente *E. caproni* apresenta dobras superficiais. Resultado semelhante foi verificado por Fujino et al. (2000) para a espécie *E. caproni*. Na espécie *E. paraensei*, segundo Fujino et al. (2000) o nó apresenta-se com rugas e Pinheiro (2003) verificou dobras e invaginações. O presente estudo, no entanto, não observou dobras no nó da extremidade abopercular dos ovos de *P. bragai*. Acha e Szyfres (2003) observaram o alargamento da região abopercular nos ovos de *Paragonimus westermani* e *P. uterobilateralis*, característica não ratificada no presente estudo.

No presente estudo foi revelado que a casca dos ovos de *P. bragai* se apresenta lisa com aspecto poroso, utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Freitas (1951) afirma que a casca do ovo do referido parasito é lisa, sob microscopia óptica de luz. As fotomicrografias dos ovos de *P. bragai*, em Brandolini (2000) aparentam casca lisa. Estes autores, no entanto, não relataram o aspecto poroso da casca do ovo, o que está relacionada, respectivamente, com o tipo de microscópio e com o poder de resolução dos microscópios utilizados para fotografar os ovos. Brandolini (2000) apresentou uma imagem geral dos ovos, com aumento de 4699x. O presente estudo destaca a superfície da casca do ovo em um aumento de 15000x (Figura 19 F) e um ovo sem o opérculo, ainda no interior do helminto (Figura 19G)..

Na observação de cortes ultrafinos dos ovos de *P. bragai* ao microscópio eletrônico de transmissão foi possível visualizar a linha de inserção do opérculo e a casca do ovo, que se apresenta bem espessa. Medindo $0,34 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (0,29 – 0,50) de espessura nas extremidades, ou seja, nos polos e $0,31 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (0,24 – 0,36) de espessura nas laterais. A casca do ovo apresenta três camadas, uma camada interna, mais eletrondensa e mais fina, medindo $0,03 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (0,05 – 0,01) de espessura nas extremidades e $0,02 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (0,01 – 0,05) de espessura na região mediana, a camada intermediária, menos eletrondensa que a camada interna, constituindo praticamente toda a casca do ovo, que mede $0,24 \pm 0,04 \mu\text{m}$ (0,19 – 0,35) nas extremidades e $0,21 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (0,12 – 0,29) na região mediana e a camada externa que se apresenta a menos eletrondensa e mais espessa que a camada interna, medindo $0,09 \pm 0,03 \mu\text{m}$ (0,06 – 0,15) na lateral do ovo e $0,08 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (0,04 – 0,13) na região mediana (Figura 20A e Tabela 4).

No presente trabalho, ao analisar os cortes ultrafinos da região posterior do parasito, após o acetábulo, foram verificados ovos fixados pela extremidade posterior a uma estrutura, que pareceu ser o oótipo (Figuras 20B – 20E). De acordo com Freitas (1951) o ovário de *P. bragai* é pré-testicular deslocado lateralmente, localizados no terço médio do corpo. Os testículos estão localizados na metade do corpo do parasito e o acetábulo está localizado no terço médio do corpo (Byrd e Denton, 1950). Os óvulos ao saírem do ovário passam através do oviduto para o oótipo, e seguem para o útero (Rey, 2008). O oviduto se origina a partir da margem média dorsal do ovário, passando póstero-lateralmente para dar origem ao oótipo (Byrd e Denton, 1950; Stunkard, 1945). Sendo assim, os cortes da parte pós-acetabular do parasito, incluem regiões do aparelho genital masculino e feminino de *P. bragai*. Logo, o presente estudo, pode supor que a estrutura na qual os ovos estavam fixados, seja o oótipo. De acordo com Rey (2008) é no oótipo que o ovo será moldado e que receberá células do vitelo.

Tabela 4. Medidas da espessura da casca do ovo de *Paratanaisia bragai* realizada com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão.

() Números entre parênteses representam os valores mínimo e máximo observados. $X \pm SD$ = média \pm desvio-

Medidas (μm)	Espessura da casca dos ovos de <i>Paratanaisia bragai</i>			
	Todas as camadas	Camada interna	Camada média	Camada externa
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$
Extremidades	$0,34 \pm 0,06$ (0,29 – 0,50)	$0,03 \pm 0,01$ (0,01 – 0,05)	$0,24 \pm 0,04$ (0,19 – 0,35)	$0,09 \pm 0,03$ (0,06 – 0,15)
Região mediana	$0,31 \pm 0,05$ (0,24 – 0,36)	$0,02 \pm 0,01$ (0,01 – 0,05)	$0,21 \pm 0,05$ (0,12 – 0,29)	$0,08 \pm 0,02$ (0,04 – 0,13)

padrão. Medidos sete ovos.

Os ovos de *P. bragai* apresentam formato elíptico, o que é ratificado com as medidas de comprimento e largura dos ovos. Os valores médios da largura e do comprimento, do presente estudo, apresentam uma relação média igual a 1:2,28. A relação de largura/comprimento dos ovos de *P. bragai* é mencionada na revisão de Freitas (1951), onde o autor demonstra várias medições dos ovos que a relação de largura/comprimento se mantém maior que 1:2, com uma média igual a 1:2,31. Sendo assim, as análises morfométricas do presente estudo estão de acordo Freitas (1951). No trabalho de Freitas (1951) os ovos apresentam comprimento de 0,034 – 0,015 mm e largura de 0,015 – 0,019. Nas medidas dos ovos, 0,031 por 0,013 mm do trabalho de Santos (1934) observa-se que a relação de largura/comprimento se mantém maior que 1:2, assim como no trabalho de Tubanguí e Masiluñgan (1941) com medidas de 30 – 33 μm de comprimento e 12 - 13 μm de largura e Byrd e Denton (1950) com medidas de 30 – 34 μm de comprimento e 16 – 22 μm largura, resultados ratificados no presente estudo.

Figura 18: Morfologia dos ovos de *Paratanaisia bragai*. A. Desenhos dos ovos elaborados ao estereomicroscópio com câmara clara. Barra de escala = 50 μm . B. Vista geral dos ovos, observados na microscopia de campo claro. Barra de escala = 70 μm . C. Vista geral dos ovos, evidenciando a região do opérculo (op), observados na microscopia de campo claro. Barra de escala = 20 μm . D. Ovo com o miracídio (m) em seu interior, evidenciando a extremidade anterior (ae) mostrando a região do opérculo (op) e a extremidade posterior (pe). O ponto de inserção do opérculo no ovo é mostrado pelas setas, observado na microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Barra de escala = 7 μm .

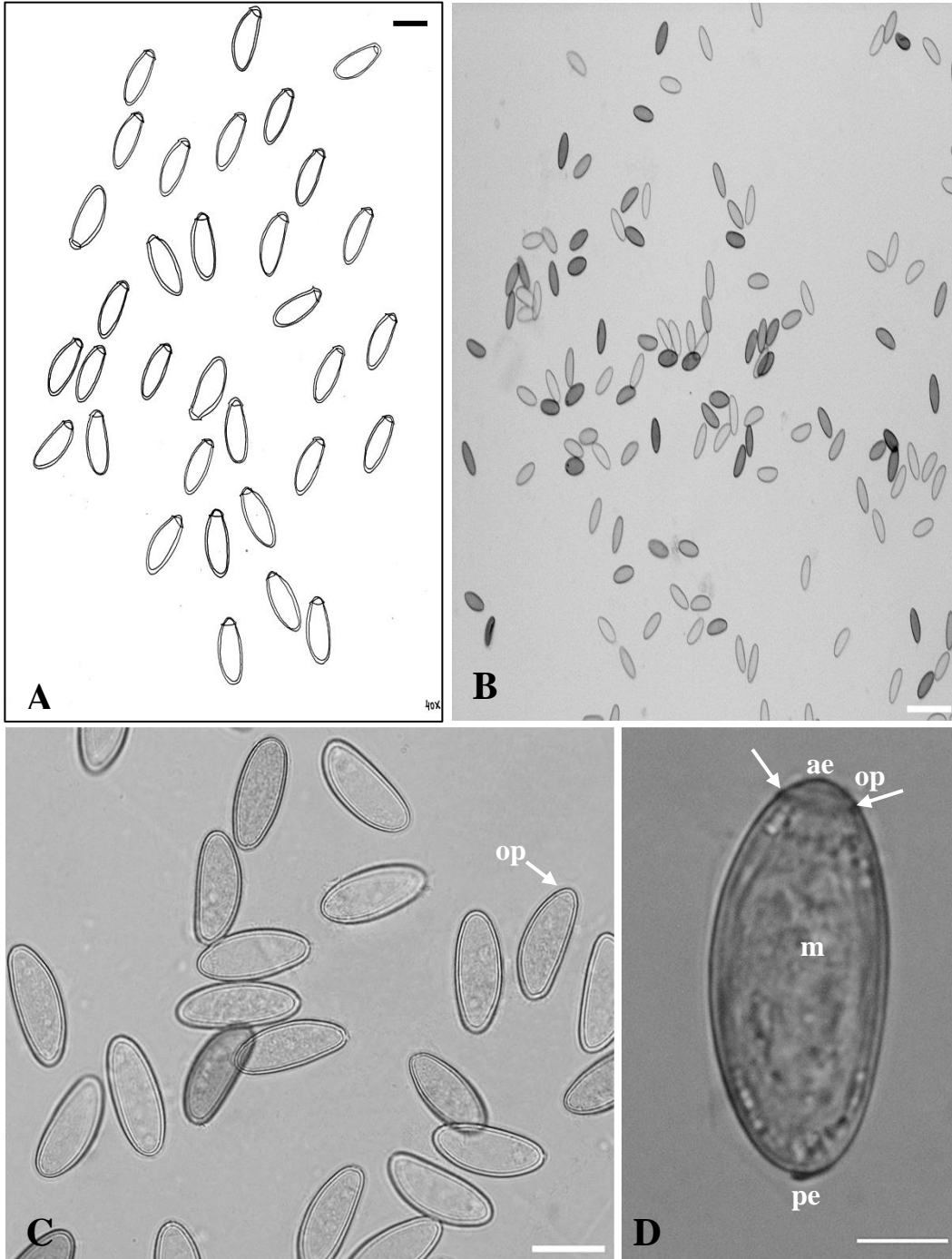


Figura 19: Ovos de *Paratanaisia bragai*. A. Vista geral de um conjunto de ovos presentes no parasito adulto, após seu rompimento, observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 100 μm . B. Vista geral de um ovo, evidenciando a presença da região do opérculo (op) e a região abopercular, com o nó (no), observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 10 μm . C. Vista superior da região opercular (op), observado ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 10 μm . D. Vista lateral da região opercular (op) e do nó (no) da região abopercular, observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 10 μm . E. Vista lateral da região do opérculo (op) e vista superior do nó (no) na região abopercular, observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 10 μm . F. Detalhe da superfície do ovo, evidenciando superfície lisa com aspecto poroso. Barra de escala = 10 μm . G. Observação dos ovos inseridos no interior do parasito, evidenciando um ovo sem opérculo (osp), observados ao microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala = 20 μm .

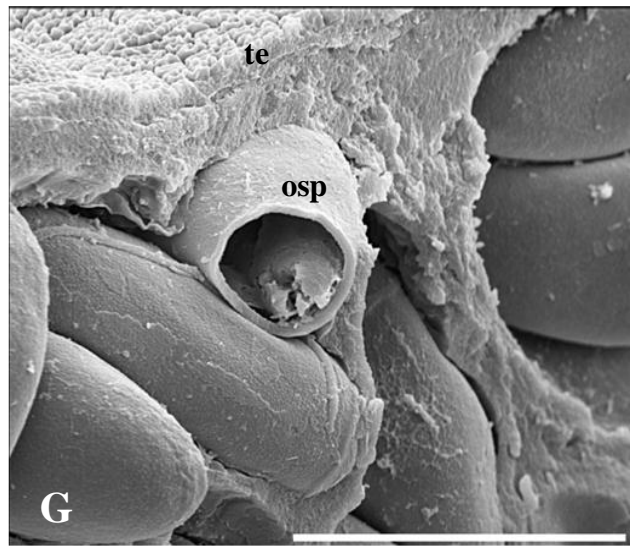
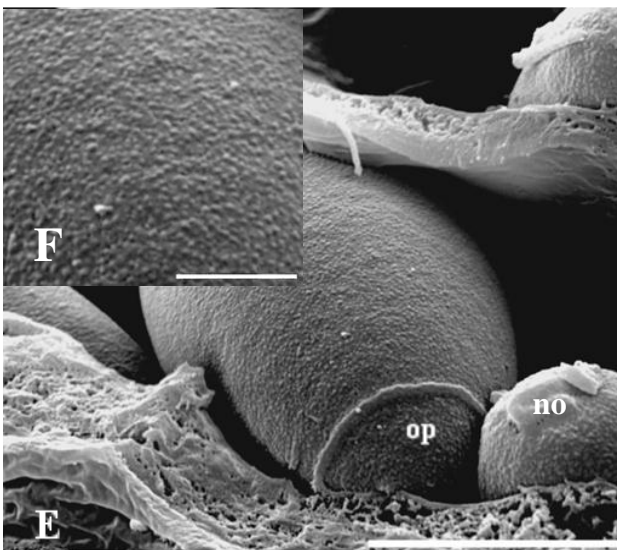
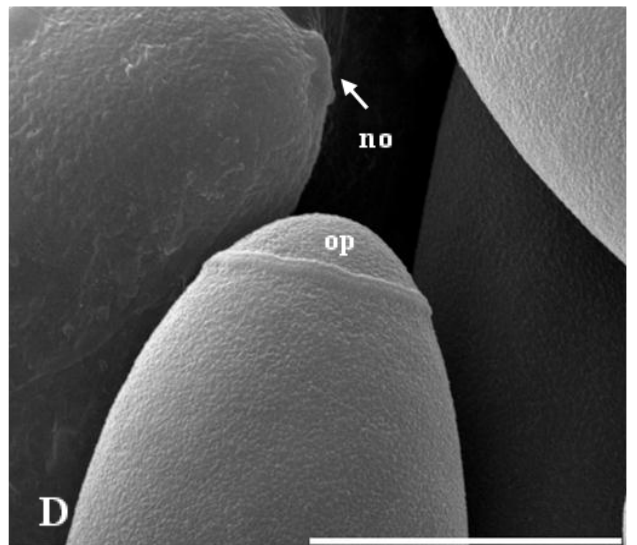
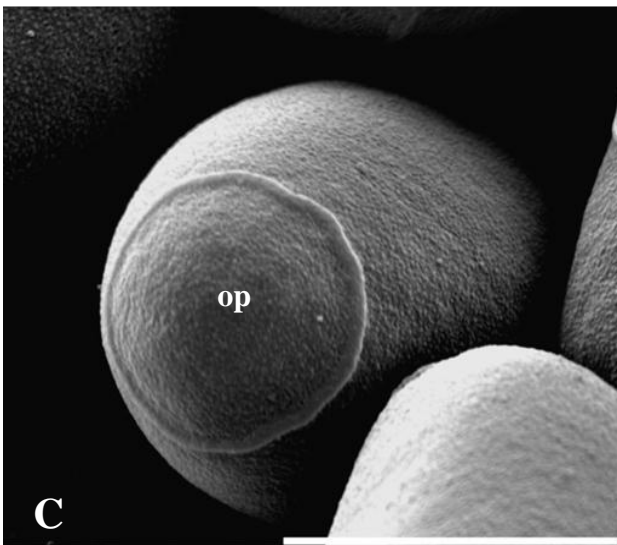
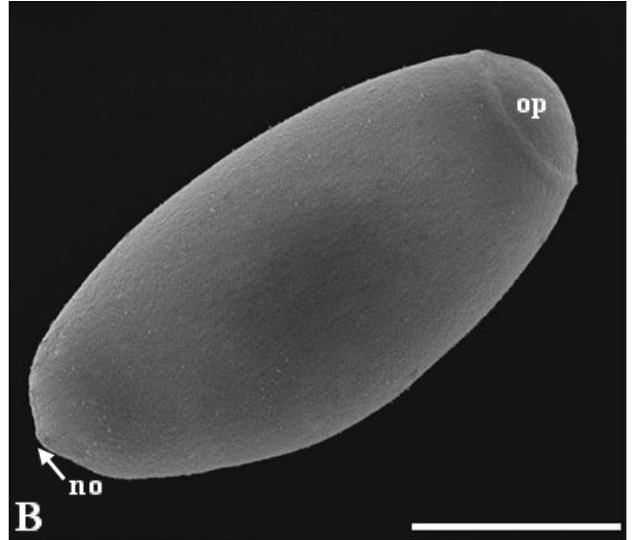
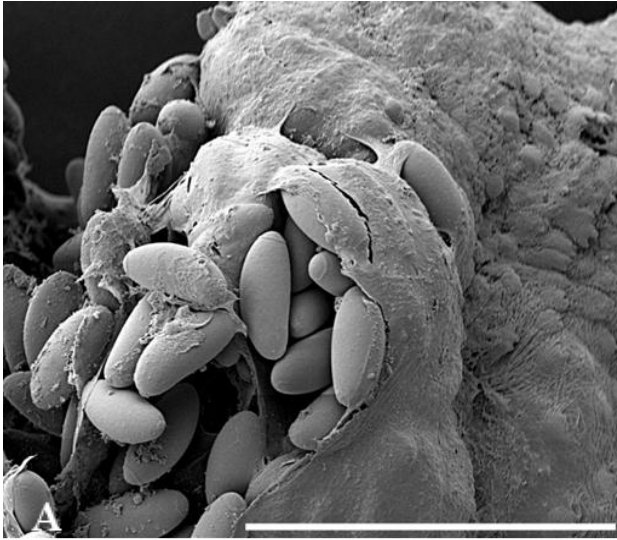
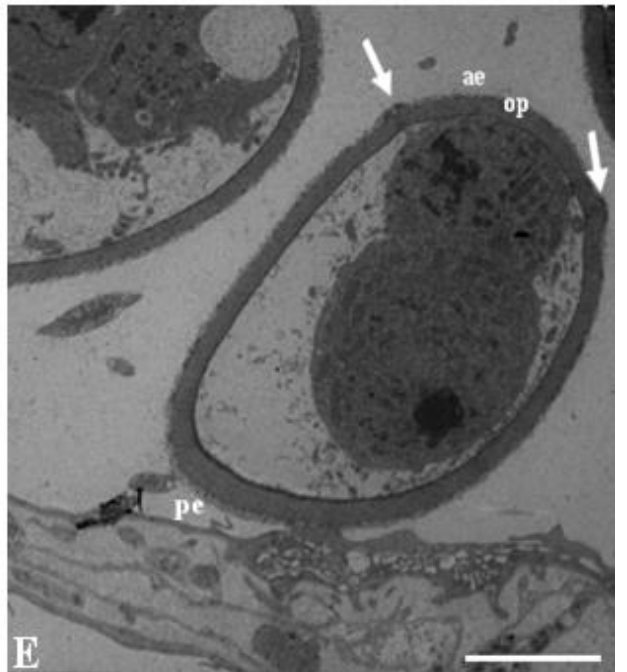
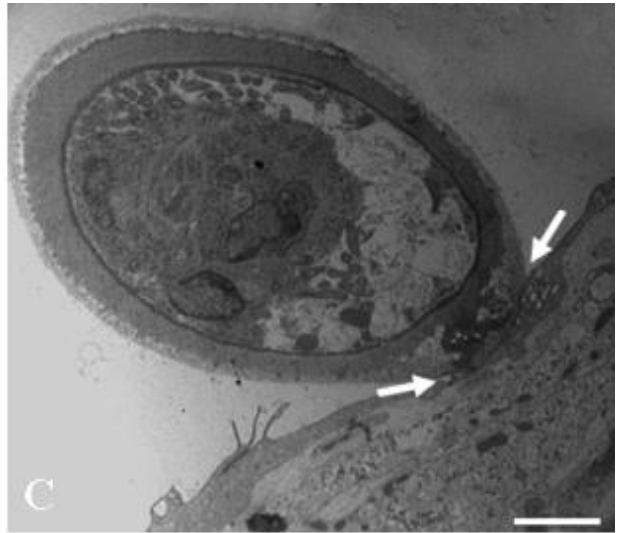
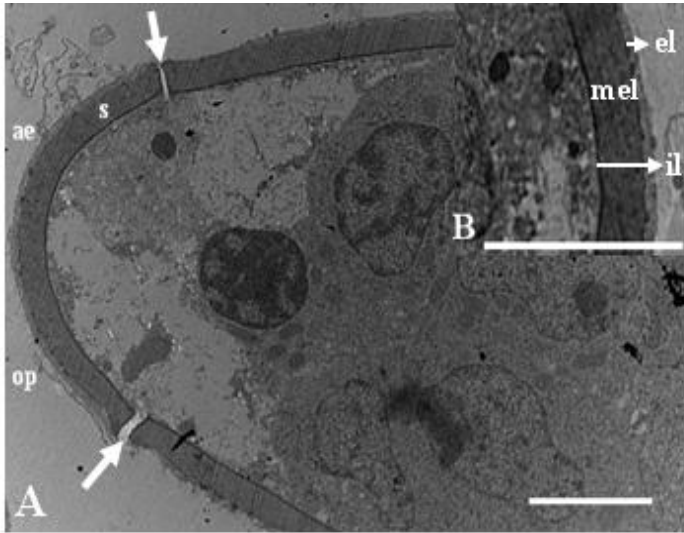


Figura 20: Ovo de *Paratanaisia bragai* observados ao microscópio eletrônico de transmissão. A. Ovo evidenciando sua casca (s) e a extremidade anterior (ae) mostrando a região do opérculo (op). O ponto de inserção do opérculo no ovo é mostrado pelas setas. Barra de escala = 1 μm . B. Detalhe das camadas da casca do ovo. Camada externa (el), a camada média (mel), mais espessa, e a camada interna (il). Barra de escala = 2 μm . C. Ovo fixado, indicado pelas setas, no tecido. Barra de escala = 2 μm . D. Detalhe de dois pontos de fixação, indicado pelas setas, do ovo com o tecido. Barra de escala = 2 μm . E. Ovo evidenciado a região do opérculo (op) e o ponto de inserção do opérculo no ovo mostrado pelas setas na extremidade anterior (ae). A extremidade posterior (pe), região abopercular apresenta um ponto de fixação no tecido, mostrado pelas setas. Barra de escala= 5 μm .



A formação da casca do ovo dos platelmintos está relacionada aos seguintes fatores: a estrutura da genitália da fêmea, a história de vida e nutrição do parasito e as características físico-químicas do ambiente (SMYTH e CLEGG, 1959).

Smyth e Clegg (1959) ao estudarem a classe Cestoda propuseram dois tipos de formação dos ovos, os que maturam fora do útero e dentro do útero. Os referidos autores supunham que a espessura da casca do ovo estivesse relacionada ao local de maturação dos ovos, ou seja, na água ou no útero. Sendo assim, ovos que apresentam desenvolvimento total no útero não necessitariam de uma espessa casca para a sua proteção, diferentemente dos ovos que completam o seu desenvolvimento na água. No entanto, esta relação de espessura da casca e local de maturação dos ovos, só foi mencionada para os casos observados por Smyth e Clegg (1959), e não pode ser generalizada, já que os referidos autores exemplificam outros espécimes de Cestoda que apresentam maturação fora do útero e apresentam casca fina, o que contradiz a relação estabelecida por estes autores, estes casos são considerados exceções à relação estabelecida.

De acordo com Rey (2008) os ovos dos trematódeos digenéticos podem conter o embrião completamente formado ou uma fase intermediária, dependendo da espécie.

Alguns trematódeos digenéticos das famílias: Haploporidae Nicoll, 1914, Zoogonidae Odhner, 1902, Ptychogonimidae Dollfus, 1937, Haploplachnidae Poche, 1926 e Cyclocoelidae Stossich, 1902, por apresentarem ovos que se desenvolvem ainda no interior do útero apresentariam frequentemente ovos com casca mais fina.

Smyth (1956) sugeriu que a espessura da casca do ovo possa estar relacionada à distribuição das glândulas vitelinas. Glândulas vitelinas mais extensas nas laterais do corpo de muitos trematódeos e espécimes da ordem Pseudophyllidea da classe Cestoda, parecem estar correlacionadas à produção de ovos com uma grossa casca de escleroproteína (SMYTH, 1956). Já os espécimes da ordem Cyclophyllidea da classe Cestoda apresentam glândulas vitelinas com pequenas e médias distribuições, sendo assim, Smyth (1956) propôs uma associação entre a pequena distribuição das glândulas vitelinas dessa referida ordem, com a presença de uma fina cápsula não esclerotizada. No entanto, existem exceções a esta relação, ou seja, a espessura da casca está relacionada a outros fatores.

Com os resultados obtidos, no presente estudo, através da microscopia eletrônica de transmissão dos ovos de *P. bragai*, buscou-se verificar a existência de uma relação entre a espessura da casca do ovo com os tipos de infecção: ativa e passiva. No entanto, existe uma escassez de trabalhos científicos que abordem a espessura da casca dos ovos de trematódeos digenéticos. Assim, como relatado anteriormente, vários são os fatores que contribuem para a formação da casca dos ovos, e ainda existem exceções dentro dessas variáveis. Sendo assim, o presente trabalho, sugere a continuação do estudo sobre a casca dos ovos dos trematódeos digenéticos, pois ao se estabelecer uma relação entre os tipos de infecção e a espessura da casca dos ovos, pode-se compreender melhor o ciclo de vida desses parasitos, que contribuiria para adoção de medidas de controle das parasitoses por eles provocadas.

4.5 Miracídio de *Paratanaisia bragai*

Na microscopia de luz foi possível observar que o miracídio se apresenta alongado com comprimento de 29,0 µm, largura de 3,9 µm na extremidade anterior, 12,8 µm na região mediana e 5,8 µm na extremidade posterior do corpo. Foi observado também, com a ruptura da casca do ovo, produzido pela pressão da lamínula, o miracídio, ainda no interior do ovo (Figura 21A). Utilizando a microscopia de contraste de interferência diferencial foi possível a visualização da extremidade anterior com a presença do *terebratorium*, a extremidade posterior e com a variação do foco, foi possível observar o corpo da larva coberto por cílios

(Figura 21B). A microscopia eletrônica de transmissão possibilitou a visualização das células germinativas do miracídio no interior do ovo (Figuras 21C – 21D).

Muitos trabalhos destacam a morfologia do “terebratorium”, pois esta estrutura auxilia a adesão e penetração da larva no molusco. LoVerde (1975) ao comparar os miracídios de *S. haematobium* e *S. japonicum* encontrou diferença nas dobras da membrana da papila apical (“terebratorium”) das duas espécies. Eklun-Natey et al. (1985) afirmam que o padrão de anastomose da membrana de *S. haematobium* é em formato de roseta e de *S. japonicum* é na forma de uma colmeia, estes padrões seriam estáveis, sendo assim Eklun-Natey et al. (1985) concordam com a hipótese, de diferença genética, que fora levantada por LoVerde (1975), no entanto além desta, este autor estabeleceu mais duas hipóteses: artefatos da preparação do material ou diferenças fisiológicas do miracídio no período da fixação. Wilson (1969) verificou em *F. hepatica* que a papila apical é desprovida de células epiteliais ciliadas, mas com a presença de uma fina camada de citoplasma enrugado. Pan (1980) verificou, na descrição do “terebratorium” de *S. mansoni* que os ductos secretores se abrem para o meio, no centro da papila.

Wilson (1969a) verificou que a musculatura do *terebratorium* de *F. hepatica* apresenta fibras circulares e longitudinais que estão aderidas umas às outras e à camada mais superficial por numerosos desmossomos. O “terebratorium” se contrai como uma unidade, não havendo o deslizamento de uma fibra em relação à outra. Mais tarde, LoVerde (1975) afirmou que é possível que a papila apical se molde como uma ventosa.

Pinheiro et al. (2005) observou que o “terebratorium” de *E. paraensei* é altamente muscular, com fibras musculares dispostas em dois sentidos diferentes, e a presença de dobras na superfície da papila apical, características que indicam que o “terebratorium” poderia auxiliara a fixação das larvas no molusco.

No estudo atual foi possível observar muitos cílios na superfície externa do miracídio, característica dos miracídios dos trematódeos digenéticos. Esta característica foi corroborada por Wilson (1969) em *F. hepatica*, Sakamoto e Ishii (1978) em *S. japonicum*, Pinheiro et al. (2004) e Pinheiro et al. (2005) em *E. paraensei* e por Francisco et al. (2012) em *Prosorhynchus crucibulum* (Rudolphi, 1819).

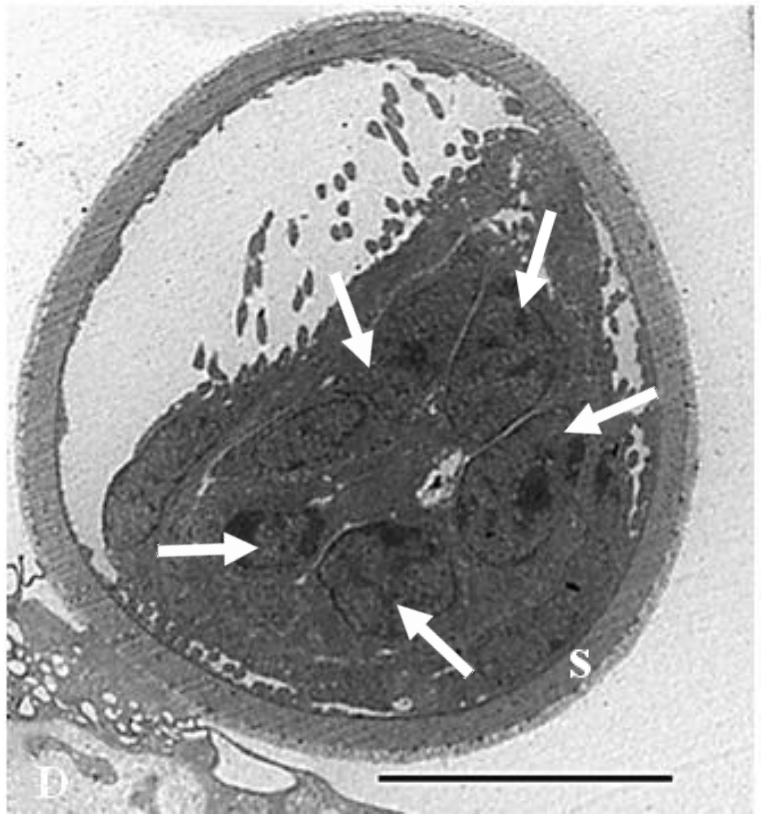
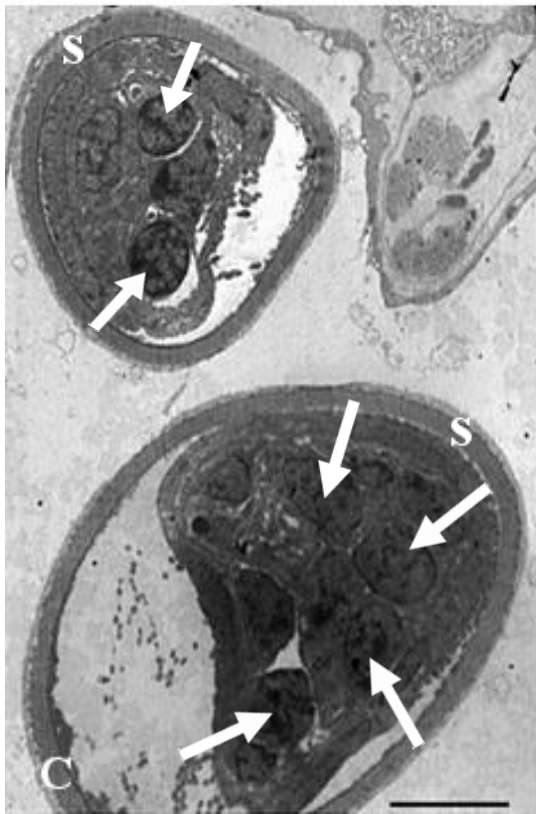
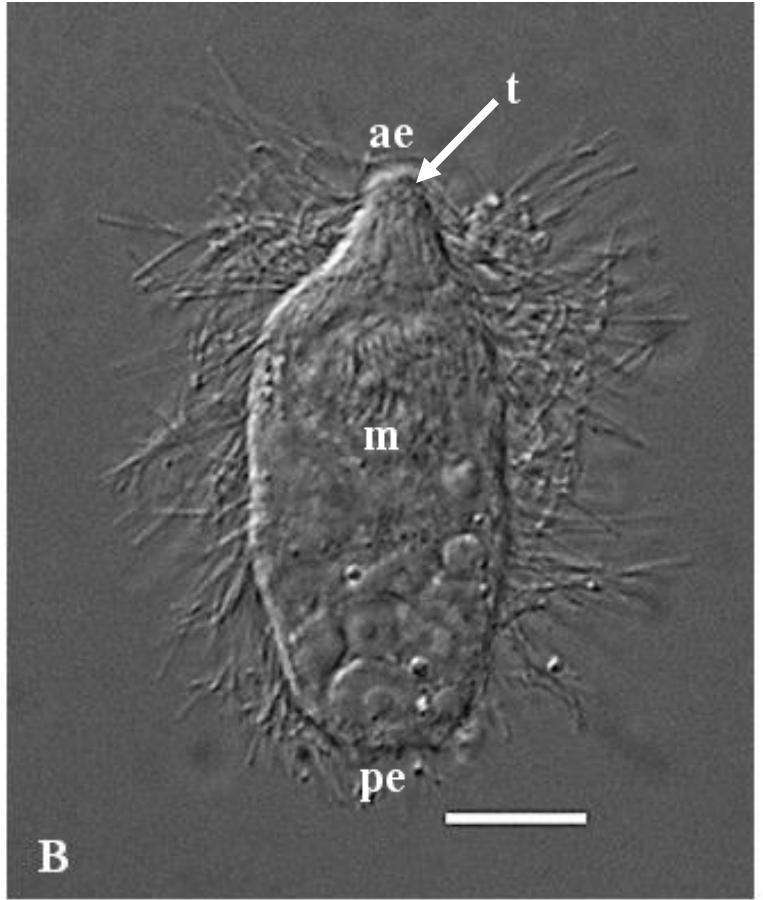
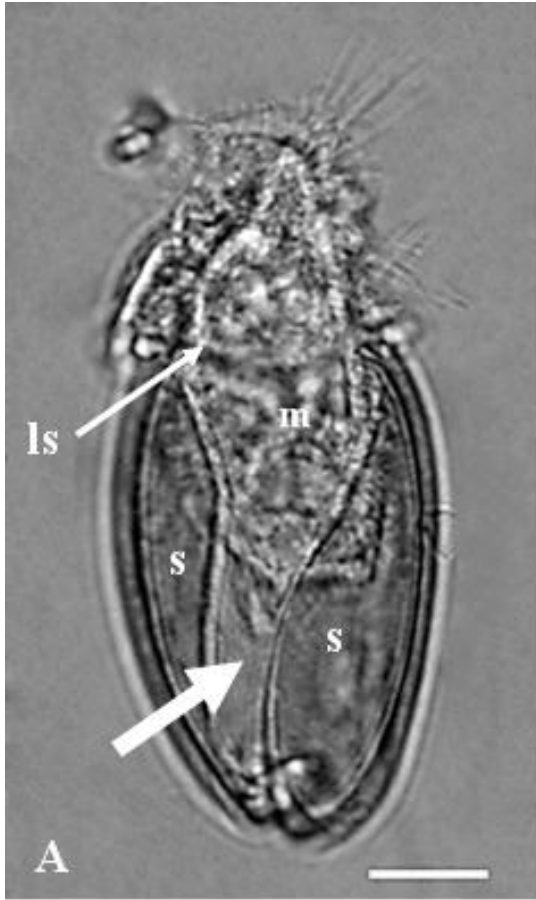
Através da microscopia de contraste de interferência diferencial, Franco-Acuña (2001) observou células germinativas, predominantemente localizadas na região posterior do corpo dos miracídios de *E. coelomaticum*, que se desenvolveriam e dariam origem ao estágio larval seguinte, os esporocistos, característica observada no presente estudo.

Os resultados aqui apresentados são os primeiros registros de imagens por microscopia do miracídio de *P. bragai*. Maldonado (1945a) realizou um estudo sobre o ciclo de vida de *T. bragai* e apresentou uma representação esquemática do miracídio.

A medição, comprimento, do miracídio de *P. bragai* realizada pelo presente estudo ratifica o trabalho de Maldonado (1945a). O estudo atual verificou um comprimento de 29 µm e Maldonado (1945a) de 30 µm, único valor informado pelo referido autor.

Pela primeira vez, um detalhado estudo da morfologia dos ovos usando diferentes técnicas de microscopia e a observação do miracídio no interior do ovo é apresentado, trazendo novas e importantes informações acerca da biologia e da morfologia de *P. bragai*, amparando futuros estudos sobre este parasito, sua morfologia, biologia e controle.

Figura 21. Miracídio de *Paratanaisia bragai*. A. Ovo com linha de sutura (ls) do opérculo, seta mais fina, e a abertura da casca (s) do ovo, seta mais larga, na ruptura da casca do ovo produzida pela pressão da lamínula, visualizando o miracídio (m), observado na microscopia de luz de campo claro. Barra de escala = 7 μm . B. Miracídio (m) mostrando a extremidade anterior (ae), com o *terebratorium* (t), extremidade posterior (pe) e os cílios (ci), observados na microscopia de interferência diferencial (DIC). Barra de escala = 7 μm . C e D. Miracídio (m) no interior do ovo, evidenciado por sua casca (s), e as células germinativas demonstradas pelas setas, observados na microscopia eletrônica de transmissão. Barra de escala = 2 μm .



4.6 Cercárias de *Paratanaisia bragai*

As cercárias visualizadas, tanto na microscopia de luz, quanto na microscopia eletrônica de varredura, apresentam corpo cilíndrico que se afunila ligeiramente na região posterior do corpo, ou seja, a região pré acetabular é mais larga. O corpo apresenta-se coberto com um tegumento rugoso. A ventosa oral é subterminal (Figuras 22A – 22C) e (Figuras 23A – 23C). O acetábulo apresenta-se no terço médio do corpo, de forma destacada (Figuras 22B – 22D) e (Figuras 23A – 23C).

Maldonado (1945a) afirma que a região pré-acetabular é mais espessa, pois as glândulas cistogênicas são maiores nessa região. A presença do tegumento rugoso, também foi verificada por Maldonado (1945a), no entanto o autor não relata a presença de papilas ao redor da ventosa oral, como verificado nas (Figuras 24A – 24D), tão pouco que entre a ventosa oral e o acetábulo, o tegumento, começa a se moldar em linhas paralelas, para a formação das escamas (Figuras 24E – 24F) como pode ser visto uma estrutura semelhante a uma escama na (Figura 25E).

Foi possível verificar cercárias com formatos diferentes em determinadas regiões do corpo, como por exemplo, a região da ventosa oral, que pode ser mais bem visualizada nas (Figuras 23A – 23C). Maldonado (1945a) afirma que as ventosas são as primeiras estruturas a aparecerem nas cercárias, sendo a ventosa oral formada por uma constrição da parte mais anterior do corpo da cercária, como pode ser visualizado nas (Figuras 23A e 23 C) e mais detalhadamente na (Figura 23A).

A ventosa oral é subterminal e a cavidade oral apresenta formato de “Y” como pode ser observado na (Figura 24A), resultados que ratificam Maldonado (1945a) que afirma que a cavidade oral aparece como uma depressão na ventosa oral e em decorrência do crescimento do dorso da cercária, tanto a ventosa oral como a sua cavidade se tornam subventral ao longo do desenvolvimento. Além disso, a ventosa oral apresenta várias papilas como pode ser observado nas (Figuras 24B – 24D).

Outra região da cercária que apresentou formatos diferentes foi o acetábulo e sua cavidade. Nas (Figuras 22B – 22D) e na (Figura 25A) o acetábulo apresenta-se com destaque em forma de um botão, já nas (Figuras 25B – 25E) o acetábulo aparece com forma mais arredondada. A cavidade do acetábulo apresenta-se totalmente fechada nas (Figuras 25A – 25C) e aberta na (Figura 25D). Maldonado (1943), no entanto, afirma que os cercárias apresentavam acetábulo bem desenvolvido, mas que atrofiava durante o seu desenvolvimento no hospedeiro definitivo, mas que ocasionalmente poderia ser mantida no parasito adulto como forma rudimentar, característica que não está de acordo com os resultados do presente estudo, já que foi visualizado acetábulo nas cercárias na microscopia de luz e eletrônica de varredura. Além disso, o próprio autor dois anos depois, Maldonado (1945a) afirma que o acetábulo surge como um botão perto do meio do corpo, e ao longo do desenvolvimento torna-se globular, além disso, o autor declara que a cavidade do acetábulo varia em tamanho, em decorrência do estágio de contração das cercárias, características estas ratificadas no presente estudo.

Foi possível observar a vesícula excretora (Figura 22A) com formato alongado no meio do corpo da cercária, característica corroborada por Maldonado (1945a) que afirma que a vesícula excretora apresenta formato claviforme, e é a única parte visível do sistema excretor.

Em algumas cercárias foi possível observar uma estrutura semelhante a uma cauda rudimentar (Figura 22C) e (Figuras 23B – 23F), resultado este, que ratifica as observações realizadas por Maldonado (1945a), onde o autor relata que algumas cercárias apresentavam uma cauda rudimentar, que era representada por uma pequena ponta. No entanto, em outras cercárias a ponta da região posterior encontrava-se retorcida, dando a impressão de uma cauda

rudimentar. No presente estudo, as (Figuras 22C e 23F) não aparentam que a região posterior esteja retorcida, mas sim a continuação da parede do tegumento da extremidade posterior para formar uma estrutura em formato de botão, sendo assim, essa estrutura poderia ser considerada uma cauda rudimentar, apesar da não visualização dessa modificação da extremidade posterior nas (Figuras 22A e 23A), o que pode estar relacionado à posição da cercária no momento da fotografia, já que esta ponta aparenta estar voltada para a região dorsal do corpo da cercária, como observado na (Figura 23E).

Brandolini e Amato (2006), no entanto, afirmaram que não visualizaram botão ou qualquer modificação na extremidade posterior das cercárias de *P. bragai*. Estas autoras, porém, realizaram a observação das cercárias, apenas, em cortes histológicos do molusco *S. octona* infectado.

A presença ou ausência de cauda rudimentar nas cercárias de *P. bragai* é de extrema relevância na classificação do tipo cercariano. Pinto e Melo (2013a) apresentam uma chave de identificação das cercárias, na qual, na primeira dicotomia é necessário ter a informação de cauda presente ou ausente, se ausente a cercária é classificada no tipo cercariaeum, se a cauda estiver presente, segue-se para a segunda dicotomia da chave, cauda simples, seguindo para a terceira dicotomia da chave de classificação, cauda curta em forma de protuberância ou taça, atingindo o tipo cercariano microcerca. Pinto e Melo (2013b), no entanto, afirmaram que o tipo cercariano de *P. bragai* é cercariaeum, baseados nos trabalhos de Keller e Araújo (1992) e de Brandolini e Amato (2006).

As diferenças observadas quanto às medidas das cercárias, formato da ventosa oral, acetábulo, presença ou ausência de cauda rudimentar pode estar relacionado aos diferentes tempos de desenvolvimento das cercárias visualizadas, ou seja, a existência de cercárias mais ou menos desenvolvidas do que outras. Essa afirmação ratifica Maldonado (1945a) que afirma que a maioria dos esporocistos produzem várias cercárias em intervalos diferentes, além disso, o autor afirma que a capacidade reprodutiva dos esporocistos de primeira geração depende em grande parte da disponibilidade de espaço dentro do hospedeiro, e esse processo pode durar até dois meses. As técnicas empregadas e a espécie de molusco utilizada como hospedeiro intermediário, também, podem ser considerados possíveis fatores que atuaram nas diferenças observadas do presente estudo com os demais trabalhos citados.

Figura 22. Cercária de *Paratanaisia bragai* utilizando a microscopia de luz. A. Vista geral de uma cercária mostrando o corpo com a ventosa oral (vo) na extremidade anterior e o acetábulo (a) no terço médio do corpo, além da presença da vesícula excretora (eb). Barra de escala = 20 μm . B. Vista geral de uma cercária com detalhe para a ventosa oral (os) e o acetábulo (a). Barra de escala = 20 μm . C. Cercária com ventosa oral (os) e o acetábulo (a), além da visualização de uma estrutura semelhante a uma cauda rudimentar (seta). Barra de escala = 20 μm . D. Detalhe do acetábulo de uma cercária. Barra de escala =7 μm .

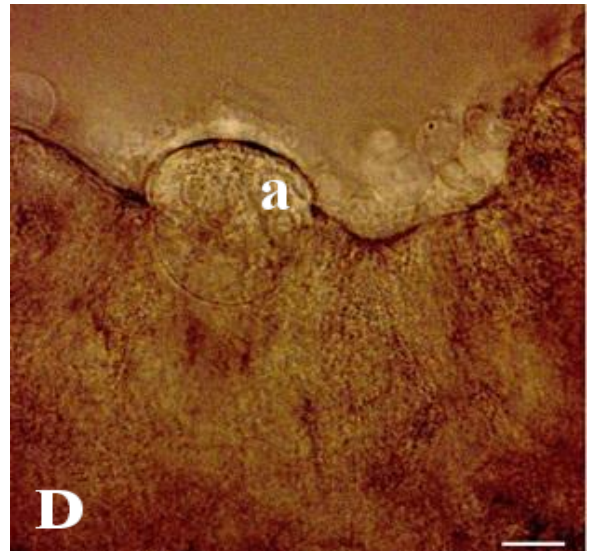
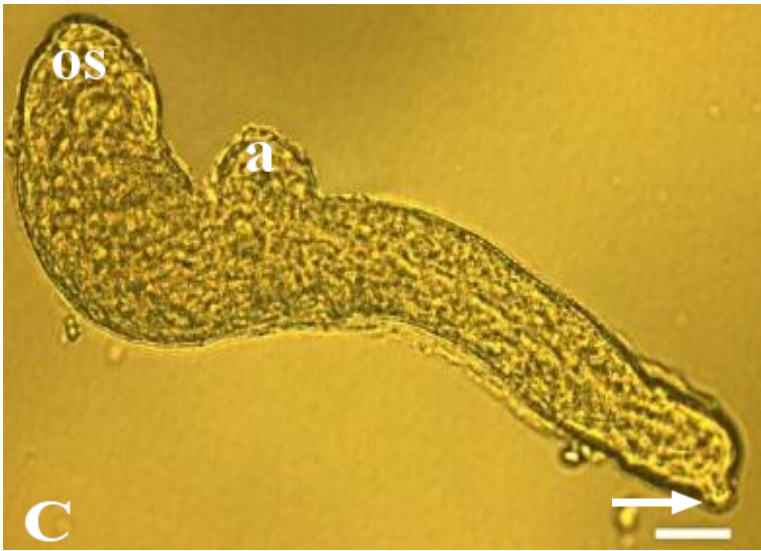
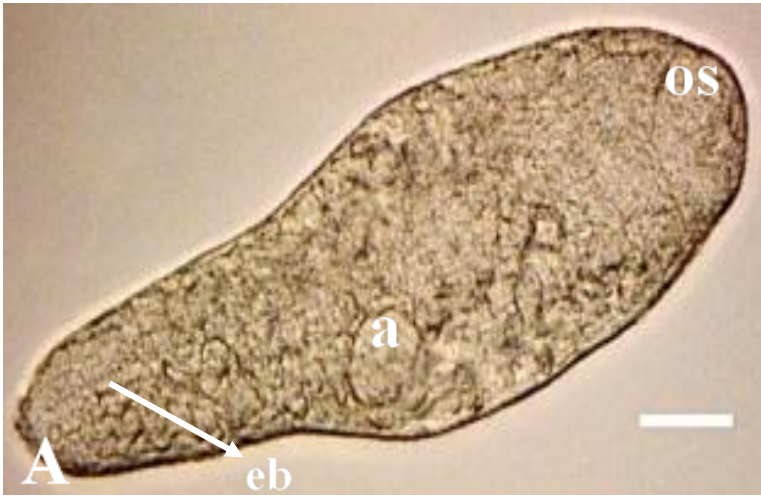


Figura 23. Cercária e metacercária de *Paratanaisia bragai* utilizando a microscopia eletrônica de varredura. A. Vista geral de uma cercária mostrando o corpo com a ventosa oral (vo) na extremidade anterior e o acetábulo (a) no terço médio do corpo. Barra de escala = 100 μm . B e C. Vista geral de uma cercária com detalhe para a ventosa oral (os) e o acetábulo (a), além da visualização de uma estrutura semelhante a uma cauda rudimentar (seta). Barra de escala = 50 μm e 100 μm , respectivamente. D, E e F. Detalhe da estrutura semelhante à cauda rudimentar (seta) na região posterior de uma cercária. Barra de escala = 20 μm , 40 μm e 20 μm , respectivamente.

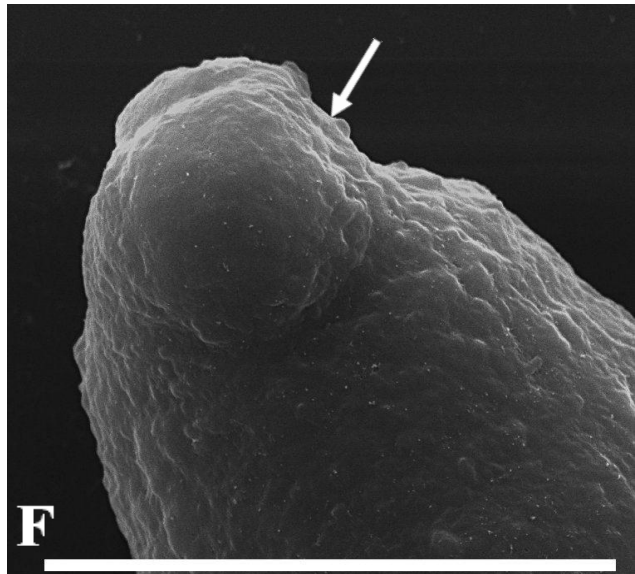
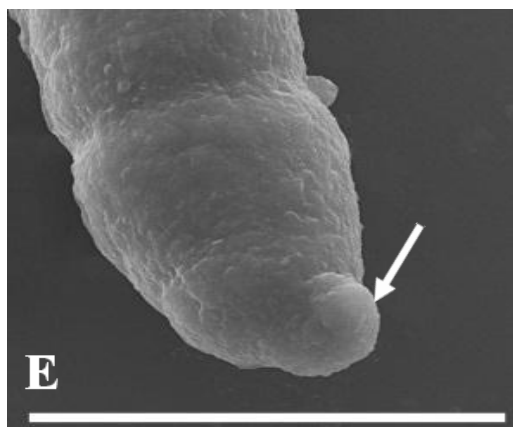
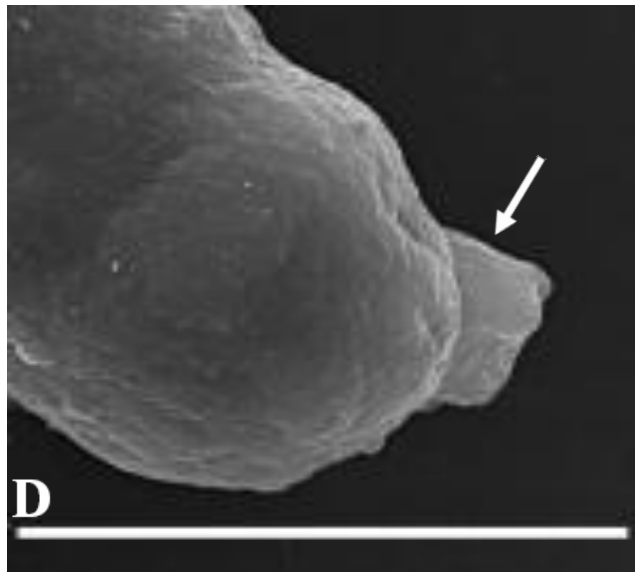
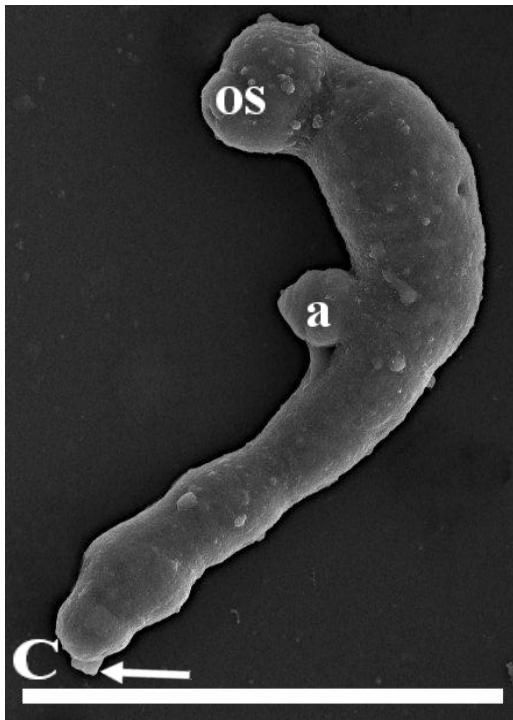
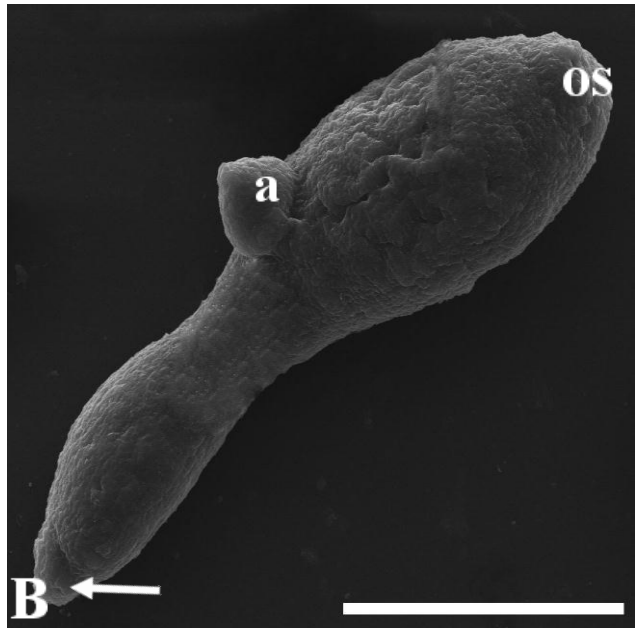
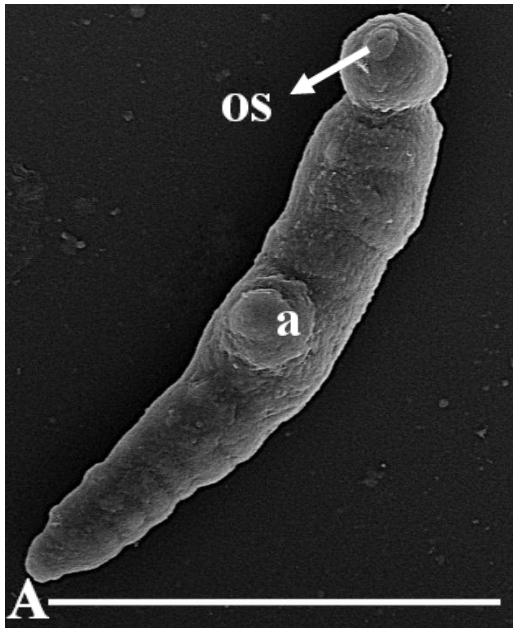


Figura 24. Região anterior da cercária de *Paratanaisia bragai* utilizando a microscopia eletrônica de varredura. A. Detalhe da ventosa oral (os). Barra de escala = 20 μm . B, C e D. Ventosa oral (os) com presença de papilas (setas). Barra de escala = 40 μm , 20 μm e 10 μm , respectivamente. E. Vista geral do tegumento da cercária da ventosa oral (os) até o acetábulo (a). Barra de escala = 20 μm . F. Detalhe do tegumento irregular. Barra de escala= 5 μm .

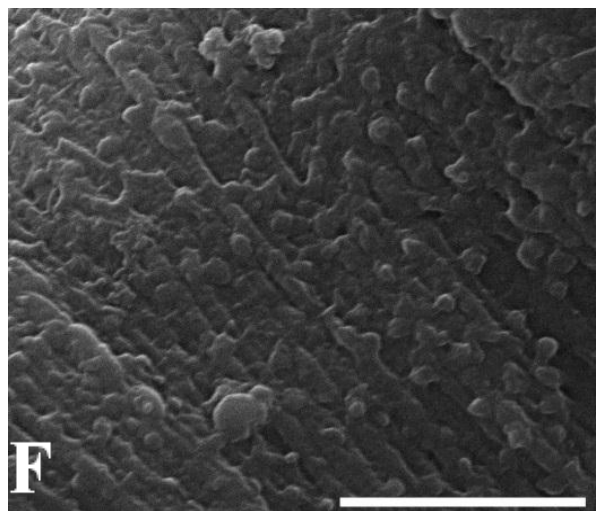
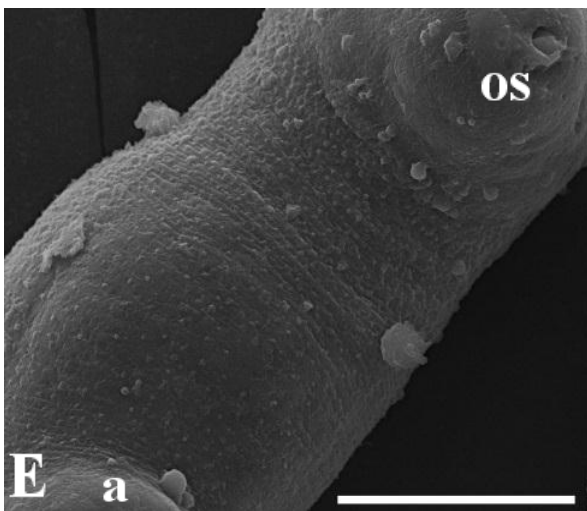
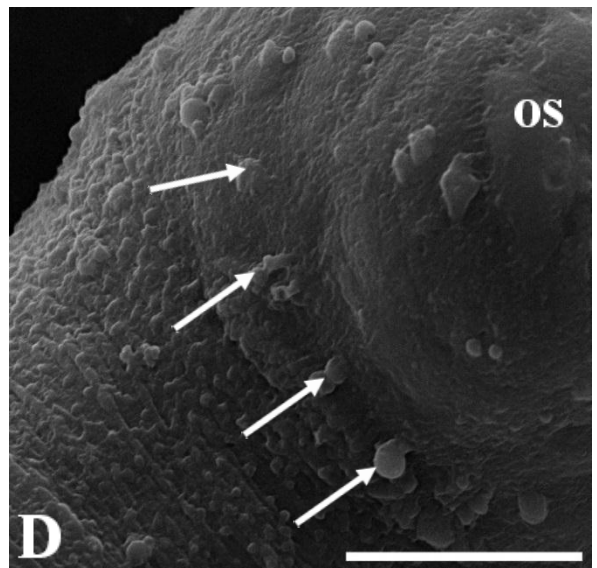
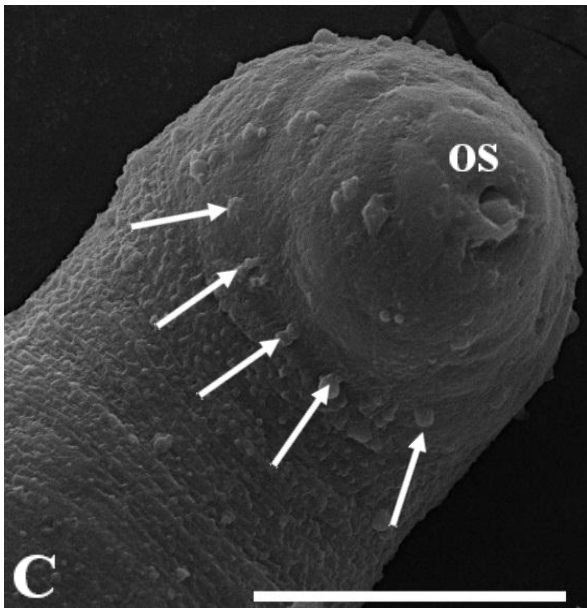
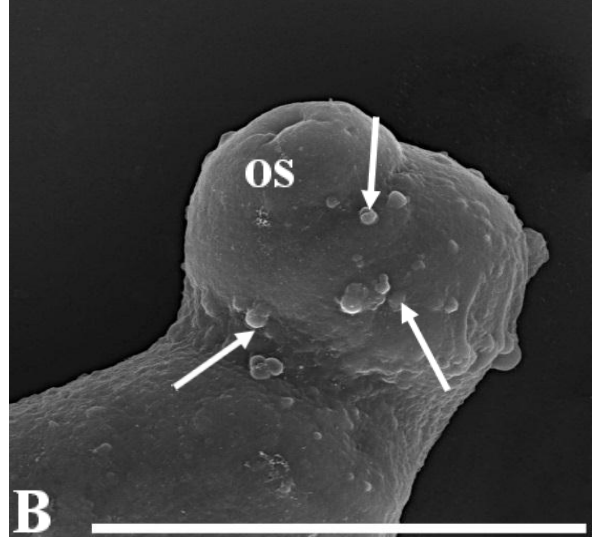
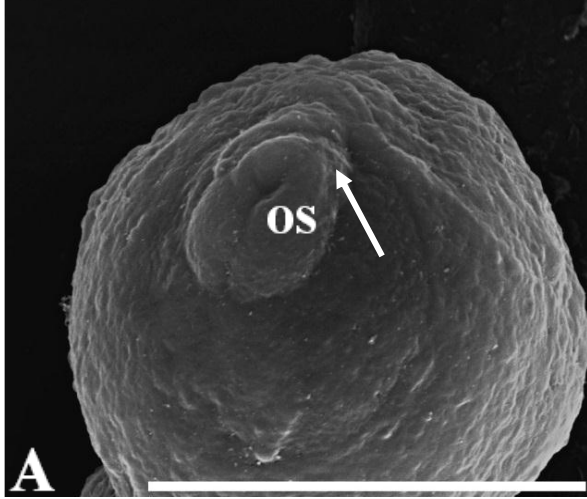
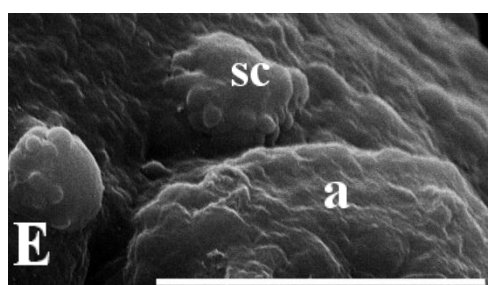
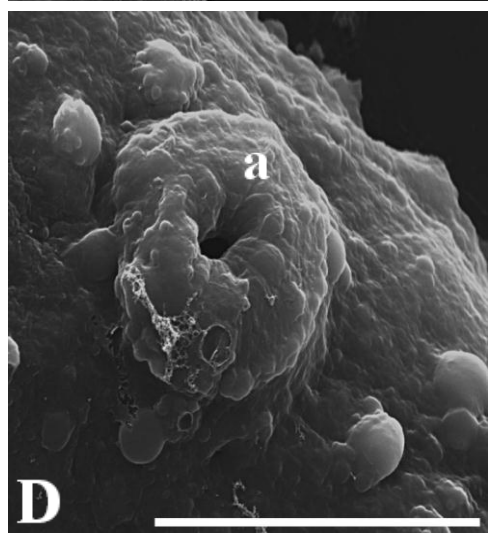
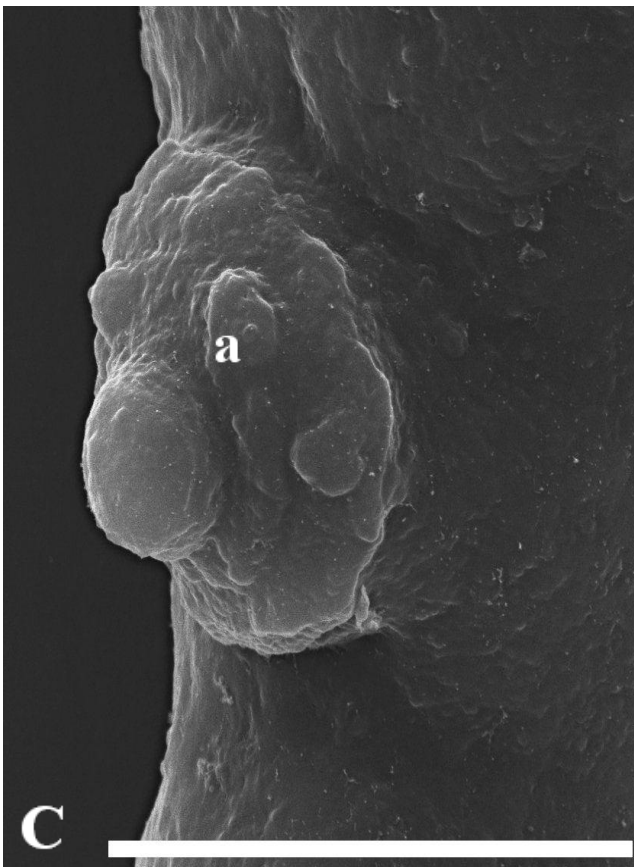
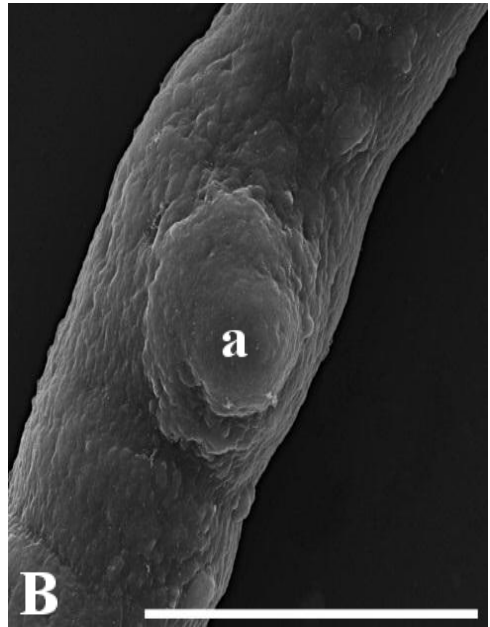
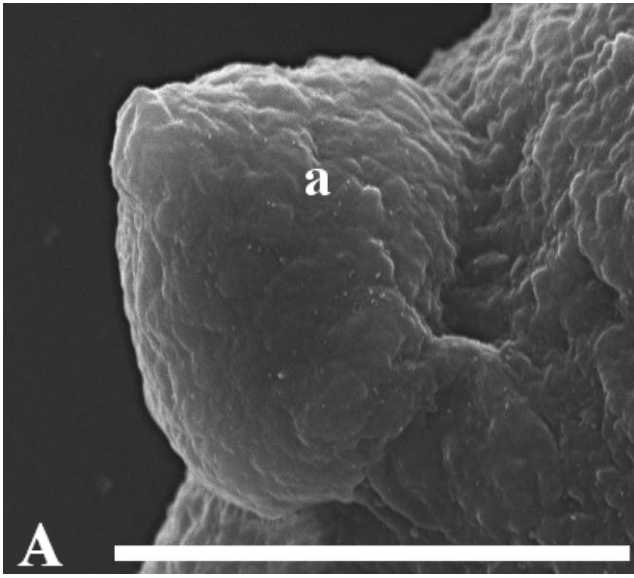


Figura 25. Região do terço médio da cercária de *Paratanaisia bragai* utilizando a microscopia eletrônica de varredura. A, B, C e D. Diferentes formações de acetábulo (a) das cercárias visualizadas. Barra de escala = 20 μm , 40 μm , 20 μm e 20 μm , respectivamente. E. Detalhe de uma escama (sc) com várias divisões próximas a região do acetábulo (a). Barra de escala= 10 μm .



As análises morfométricas das cercárias por microscopia de luz e varredura são demonstradas na tabela 5.

As medidas das cercárias aferidas no presente estudo, tanto por microscopia de luz, quanto por microscopia eletrônica de varredura, foram divergentes das medidas das cercárias de *P. bragai* observadas por Keller e Araújo (1992) com comprimento variando de 230 a 350 μm , estes autores, apesar de utilizarem *L. unilamellata* como hospedeiro intermediário, igual ao do presente estudo, utilizaram *Gallus gallus* como hospedeiro definitivo. Já Maldonado (1945a) apresentou médias bem maiores do que as observadas no estudo atual, este autor apesar de ter utilizado *C. livia* como hospedeiro definitivo, igual ao do presente estudo, utilizou *S. octona* como hospedeiro intermediário. Maldonado (1945a) verificou cercárias com comprimento médio igual a 400,00 μm ; espessura média do corpo de 50,00 μm , neste parâmetro o autor não diferenciou a espessura do corpo das cercárias em regiões, tais como anterior, acetabular e posterior, como realizado no estudo atual. No entanto, visualmente o autor afirma que as cercárias apresentavam um corpo que se afinava ligeiramente na região posterior, característica, também, relatada por Keller e Araújo (1992) e Brandolini e Amato (2006) com a visualização das cercárias em cortes histológicos. Já o presente estudo, além da visualização, comprovou o afinamento, através das medidas da espessura do corpo das cercárias de *P. bragai* realizadas por região do corpo, ou seja, há uma diminuição nas medidas no sentido da região anterior para a região posterior do corpo, como pode ser verificado na Tabela 5.

Tabela 5. Medidas comparativas das cercárias de *Paratanaisia bragai*.

Medidas (μm)	Presente estudo	Presente estudo	Maldonado (1945a)
	Luz	MEV	
	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD
Comprimento	204,50 \pm 46,61 (155,71 – 248,57)	158,01 \pm 29,25 (129,27 – 187,74)	400,00
Largura Região Anterior	42,93 \pm 1,43 (41,43 – 44,28)	29,76 \pm 2,95 (27,10 – 32,93)	
Largura Região Acetábulo	41,43 \pm 12,20 (30,00 – 54,28)	24,63 \pm 3,92 (21,34 – 28,97)	50,00
Largura Região Posterior	26,45 \pm 4,01 (22,86 – 30,77)	18,91 \pm 1,12 (17,92 – 20,12)	
Ventosa Oral – Diâmetro Maior	34,14 \pm 4,29 (30,00 – 38,57)	20,81 \pm 3,99 (16,46 – 24,29)	45,00
Ventosa Oral – Diâmetro Menor	27,29 \pm 7,92 (20,00 – 35,71)	19,06 \pm 4,71 (14,02 – 23,36)	-
Acetábulo – Diâmetro Maior	20,51 \pm 4,38 (15,71 – 24,28)	18,73 \pm 4,05 (15,85 – 23,06)	25,00
Acetábulo – Diâmetro Menor	18,02 \pm 3,01 (15,71 – 21,43)	17,39 \pm 3,62 (14,63 – 21,49)	
Distância da ventosa oral até o acetábulo	67,32 \pm 10,01 (57,14 – 77,14)	60,80 \pm 6,58 (55,66 – 68,22)	150,00
Distância do acetábulo até a ponta da extremidade posterior	89,04 \pm 30,62 (68,57 – 124,28)	72,58 \pm 9,44 (64,63 – 83,02)	210,00
Hospedeiro intermediário	<i>Leptinaria unilamellata</i>	<i>Leptinaria unilamellata</i>	<i>Subulina octona</i>

() Números entre parênteses representam os valores mínimo e máximo observados. X \pm SD = média \pm desvio-padrão. Luz- Microscopia de luz. MEV- Microscopia eletrônica de varredura. Medidas três cercárias.

4.7 Metacercárias de *Paratanaisia bragai*

As metacercárias de *P. bragai* obtidas através da infecção experimental do molusco *L. unilamellata*, foram visualizadas por meio de cortes histológicos, corados com Hematoxilina-Eosina e tricrômico de Gomori; observadas através da microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC); microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos.

O exame dos cortes histológicos possibilitou a visualização das metacercárias distribuídas pela massa visceral do molusco, com a percepção da ventosa oral e do acetábulo (Figura 26A), além das escamas, que foram visualizadas nos cortes corados com tricrômico de Gomori, no entanto, a observação das escamas, na microscopia de luz revelou uma imagem semelhante a espinhos, como pode ser verificado nas (Figuras 26A - 26B). As medidas das metacercárias presentes nos cortes histológicos apresentaram comprimento médio de $87,20 \pm 11,84 \mu\text{m}$ (73,04 – 107,94) e largura média de $60,29 \pm 12,58 \mu\text{m}$ (45,22 – 81,74) conforme Tabela 6 que, também, apresenta medidas comparativas com Maldonado (1945a) e Keller e Araújo (1992).

Com o corante tricrômico de Gomori, foi possível observar que a ventosa oral e o acetábulo das metacercárias, apresentaram coloração quase que totalmente avermelhada e em outras, azul esverdeada, que representa a presença de fibras musculares; e colágeno, respectivamente (Figuras 26B – 26C). Na (Figura 26B) observa-se contornando o corpo da metacercária, pontos pretos, característico da presença de núcleo. A coloração de esverdeada para o azul, confirma a presença de colágeno, que nas (Figuras 26B – 26C) aparece, em grande parte no corpo da metacercária. As escamas apresentam coloração avermelhada, característico de fibras musculares (Figuras 26B – 26C). A identificação da composição das estruturas, através das técnicas de coloração está de acordo com Luna (1989).

A composição das escamas necessita de um estudo mais aprofundado, já que há poucas informações sobre este assunto na literatura. Existem trabalhos com a análise dos espinhos de *S. mansoni*, como por exemplo, Morris e Threadgold (1968) afirmam que os espinhos do adulto de *S. mansoni*, apresentam uma estrutura cristalina, além disso, estes autores relatam que os espinhos do parasito macho estão dobrados quando em contato com o tegumento do parasito fêmea, o que indicaria a flexibilidade dos espinhos, no entanto, de acordo com Hockley (1973) esta característica não foi observada por outros autores. Os espinhos ou as escamas de outros digenéticos, quase que certamente, apresentam a estrutura de rede cristalina, afirma Hockley (1973). Cohen et al. (1982) afirmam que os espinhos presentes no tegumento de *Schistosoma* sp. são formados por uma estrutura de cristais de actina.

Os cortes histológicos das metacercárias corados com Hematoxilina-Eosina, não destacaram as ventosas, tão pouco a presença de escamas, o que está relacionado à natureza química dessas estruturas, já que esse corante evidencia os núcleos e o citoplasma e não especificamente a composição do material (Figura 26D).

Com a técnica de microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) as metacercárias foram observadas como material fresco e fixado, onde foi possível a visualização das ventosas e da faringe. As metacercárias sem fixação apresentam um cisto transparente e refringente, essa característica permaneceu, de forma menos acentuada, nas metacercárias fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (Figuras 27A – 27C). As metacercárias não fixadas apresentaram comprimento médio de $104,96 \pm 7,38 \mu\text{m}$ (94,14 – 110,47) e largura média de $83,93 \pm 8,97 \mu\text{m}$ (71,43 – 91,91), já as metacercárias fixadas apresentaram comprimento médio de $100,79 \pm 7,56 \mu\text{m}$ (110,47 – 91,43) e largura média de $69,68 \pm 4,28 \mu\text{m}$ (64,76 – 76,19), que pode ser verificado na Tabela 6.

Utilizando a técnica da microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que as

metacercárias (Figura 27D) apresentavam comprimento médio $98,65 \pm 15,83 \mu\text{m}$ ($77,53 - 114,70$) e largura média de $62,63 \pm 6,06 \mu\text{m}$ ($50,00 - 68,63$) e a análise das metacercárias na microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos dos moluscos infectados, demonstrou um comprimento médio de $88,87 \pm 18,80 \mu\text{m}$ ($70,93 - 117,65$) e largura média de $62,63 \pm 6,06 \mu\text{m}$ ($50,00 - 68,63$), de acordo com a Tabela 6.

O presente estudo ao analisar as metacercárias através de diversos métodos verificou divergências quanto às medidas aferidas em cada técnica utilizada e também, diferenças com outros autores. O comprimento médio e a largura média, obtidos dos cortes histológicos e da microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos, foram as menores medidas quando comparadas com as demais técnicas. Ao analisar essas duas técnicas, percebe-se uma semelhança das médias apresentadas, conforme Tabela 6.

Quando se observa a largura média das metacercárias, verificam-se resultados semelhantes entre os métodos utilizados no presente estudo, com exceção da largura média do material fresco observado na microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). A análise do comprimento médio não apresenta grandes divergências entre as médias obtidas da microscopia de luz do material fresco e do material fixado, e da microscopia eletrônica de varredura, como pode ser verificado na Tabela 6.

Tabela 6. Medidas comparativas das metacercárias de *Paratanaisia bragai* através de diversas técnicas e com outros autores.

Metacercárias de <i>Paratanaisia bragai</i>			
Técnicas	Medidas (μm)		
	Comprimento	Largura	
	X \pm SD	X \pm SD	
Corte histológico	$87,20 \pm 11,84$ (73,04 – 107,94)	$60,29 \pm 12,58$ (45,22 – 81,74)	
Material fresco - (DIC)	$104,96 \pm 7,38$ (94,14 – 110,47)	$83,93 \pm 8,97$ (71,43 – 91,91)	
Presente estudo			
Material fixado - (DIC)	$100,79 \pm 7,56$ (91,43 – 110,47)	$69,68 \pm 4,28$ (64,76 – 76,19)	
MEV	$98,65 \pm 15,83$ (77,53 – 114,70)	$64,42 \pm 6,36$ (58,69 – 75,00)	
MEV dos cortes histológicos	$88,87 \pm 18,80$ (70,93 – 117,65)	$62,63 \pm 6,06$ (50,00 – 68,63)	
Maldonado (1945a)	-	146,00	36,00
Keller e Araújo (1992)	Material fresco – luz	110,00 – 160,00	90,00 – 130,00

() Números entre parênteses representam os valores mínimo e máximo observados. X \pm SD = média \pm desvio-padrão. Corte histológico – n=7; Material fresco (DIC) – n= 4; Material fixado (DIC) – n= 6; MEV – n= 5; MEV cortes histológicos – n= 7.

A literatura disponível apresenta divergências em relação às dimensões da metacercária de *P. bragai*. Segundo Maldonado (1945) a metacercária apresentava 146 μm de comprimento por 36,00 μm de largura; para Keller e Araújo (1992) as metacercárias

apresentavam formato elipsoide, medindo de 110,00-160,00 μm x 90,00-130,00 μm . O presente estudo diverge das observações feitas por Maldonado (1945a), já que o comprimento da metacercária registrado pelo referido autor está bem acima das medidas observadas no presente estudo, tanto para as metacercárias visualizadas nos cortes histológicos como na microscopia de contraste de interferência diferencial, em material fresco ou fixado, microscopia eletrônica de varredura e cortes histológicos observados na microscopia eletrônica de varredura.

Para a largura da metacercária, as medidas verificadas por Maldonado (1945a) estão bem abaixo das apresentadas no presente trabalho. As medidas de comprimento das metacercárias obtidas no presente estudo se assemelham às apresentadas por Keller e Araújo (1992), principalmente quando se compara as médias desses autores com as médias obtidas da microscopia de luz do material fresco, do presente estudo. Essa semelhança, na obtenção das médias das metacercárias, pode ser decorrente da utilização da mesma espécie de hospedeiro intermediário, o molusco *L. unilamellata*, e, também, do uso mesma técnica, a microscopia de luz com material sem fixação.

Maldonado (1945a) não informou se o material foi fixado ou não, além disso, utilizou *S. octona* para o processo de infecção. Dessa forma, as divergências verificadas entre as dimensões da metacercária de *P. bragai* apresentadas por este autor e as verificadas no presente estudo, e também as diferenças de médias observadas entre as diferentes técnicas no presente estudo, podem estar relacionadas às diferenças nas técnicas empregadas e à espécie de molusco utilizada como hospedeiro intermediário. Visto que, no presente estudo, as metacercárias foram obtidas a partir de infecções experimentais em *L. unilamellata*.

Os cistos das metacercárias de *P. bragai* observados na microscopia de luz, com material fresco e fixado, apresentam-se com formato elipsoide, conforme descrito por Maldonado (1945a), Keller e Araújo (1992) e Brandolini e Amato (2006); transparentes, ratificando o observado por Maldonado (1945a) e Brandolini (2000); refringentes, assim como observado por Brandolini (2000). A parede que forma o cisto da metacercária é composta, aparentemente, por três camadas, sendo uma camada externa, uma média e uma interna (Figura 26A), também visualizadas nos cortes histológicos apresentando uma reação fortemente positiva ao tricrômico de Gomori (Figura 26C). Algumas metacercárias observadas apresentaram cistos com coloração azul esverdeada, em quase sua totalidade, que caracteriza a presença de colágeno, outras apresentaram cisto com a coloração azul esverdeada e avermelhada, esta última evidenciando a presença de fibras musculares. As colorações que definem suas respectivas estruturas estão de acordo com Luna (1989).

Brandolini (2000) verificou através de testes histoquímicos, dos cortes histológicos, e do tecido infectado de *S. octona*, que o cisto da metacercária de *P. bragai* apresenta glicoconjugados e tecido elástico, como por exemplo, colágeno, detectado com o auxílio do tricrômico de Gomori, resultado este, corroborado através dos cortes histológicos no presente estudo. A natureza elástica, também foi relatada por Maldonado (1945a).

Maldonado (1945a) afirmou que o cisto da metacercária de *P. bragai* apresenta-se coriáceo, ou seja, uma estrutura resistente que foi comprovada por Brandolini e Amato (2006) que realizaram uma forte compressão do cisto contendo a metacercária, no entanto o mesmo não se rompia. A resistência e a composição elástica dos cistos das metacercárias, segundo Brandolini (2000), devem estar relacionadas à proteção para que a metacercária passe, de forma intacta, pelo trato digestório do molusco, protegendo-a na ação mecânica e digestiva, mantendo assim, a sua viabilidade.

Com a microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos, visualizou-se detalhadamente a estrutura presente nos cistos das metacercárias de *P. bragai* (Figura 28 A). Foi possível verificar a espessura do cisto da metacercária, que se apresenta mais espesso na região mediana com média de $5,17 \pm 0,93$ (4,31 – 7,10) e nas extremidades mais delgada com

média de $4,69 \pm 0,52$ ($3,82 - 5,49$). Além disso, observou-se a presença de três camadas na estrutura dos cistos (Figura 27 B). Uma camada interna que se apresenta mais espessa nas extremidades, com $1,88 \pm 0,33$ ($1,37 - 2,18$) de média e mais fina na região mediana $1,58 \pm 0,41$ ($0,82 - 1,91$) de média. Uma camada média, que dentre as demais, é a mais espessa, tanto nas extremidades com média de $2,45 \pm 0,32$ ($1,91 - 2,85$), quanto na região mediana, com média de $2,89 \pm 1,06$ ($1,89 - 4,91$). No entanto, a camada média apresenta-se mais espessa na região mediana, em comparação com as extremidades, diferentemente da camada interna. E a camada externa, que é a mais fina de todas, tanto nas extremidades com média de $0,70 \pm 0,12$ ($0,55 - 0,82$), quanto na região mediana com média de $0,88 \pm 0,18$ ($0,56 - 1,13$). Assim como, a camada média, a camada externa apresenta-se mais espessa na região mediana e mais delgada nas extremidades, e também, aparenta uma porosidade na sua superfície externa (Figura 28 B). O resultado do presente estudo ratifica as medidas de espessura do cisto, como única camada, das metacercárias de *P. bragai*, informadas por Maldonado (1945a), $4,0 - 7,5 \mu\text{m}$, no entanto o autor não informa o local do cisto que foi medido, ou seja, extremidade ou região mediana. As medidas podem ser vistas na Tabela 7.

Tabela 7. Medidas da espessura do cisto da metacercária de *Paratanaisia bragai* realizada com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos do tecido infectado de *Leptinaria unilamellata*.

Medidas (μm)	Espessura da parede do cisto das metacercárias de <i>Paratanaisia bragai</i>			
	Todas as camadas	Camada interna	Camada média	Camada externa
	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD
Extremidades	$4,69 \pm 0,52$ ($3,82 - 5,49$)	$1,88 \pm 0,33$ ($1,37 - 2,18$)	$2,45 \pm 0,32$ ($1,91 - 2,85$)	$0,70 \pm 0,12$ ($0,55 - 0,82$)
Região mediana	$5,17 \pm 0,93$ ($4,31 - 7,10$)	$1,58 \pm 0,41$ ($0,82 - 1,91$)	$2,89 \pm 1,06$ ($1,89 - 4,91$)	$0,88 \pm 0,18$ ($0,56 - 1,13$)

() Números entre parênteses representam os valores mínimo e máximo observados. X \pm SD = média \pm desvio-padrão. Medidas quatro metacercárias.

De acordo com Fried (1994) as cercárias de muitos digenéticos se encistam produzindo cistos de metacercárias, no segundo hospedeiro intermediário, como por exemplo, *Clonorchis sinensis* (Looss, 1907) em peixes e *E. trivolvis* em moluscos, ou também sobre a vegetação, como *F. hepatica*.

Normalmente, antes do encistamento, as cercárias aumentam sua atividade, as ventosas fixam-se ao tecido do hospedeiro ou substrato, o material cistogênico é liberado para as glândulas cistogênicas para a formação de parte ou toda a parede do cisto. Foi sugerido que as cercárias que realizam o encistamento no hospedeiro intermediário podem receber a contribuição de secreções e/ou tecidos do hospedeiro para a formação da parede do cisto (FRIED, 1994). A ligação, do tecido do molusco contribuindo para a formação do cisto da metacercárias de *P. bragai* pode estar sendo demonstrada na (Figura 28 C).

A estrutura das metacercárias encistadas varia de uma espécie para a outra. Fried (1994) faz uma rápida revisão sobre a estrutura da parede dos cistos das metacercárias, afirmando que os cistos das metacercárias que encistam sobre a vegetação, geralmente apresentam mais camadas do que os cistos que encistam no hospedeiro intermediário. Dixon (1965) verificou que o cisto de *F. hepatica*, com encistamento sobre a vegetação, é composto por quatro camadas principais; a camada I é a mais externa e mais espessa, no entanto incompleta, pois cobre a metacercária dorsalmente e lateralmente, apenas, sendo composta de

tanino-proteína; a camada II é fibrosa e fina, intimamente aderida à região interna da camada I e composta por mucoproteínas e mucopolissacarídeos, atualmente denominados de glicoconjugados a camada III apresenta três subcamadas, com larguras relativas em diferentes regiões do cisto com mucopolissacarídeos, em geral; e a camada IV formada por lamelas de lipoproteínas e mucopolissacarídios. Já os cistos das metacercárias que encistam no hospedeiro intermediário apresentam três camadas, como visualizado em *E. trivolvis* por Gulka e Fried, 1979 e em *S. globulus* por Huffman (1986), resultados semelhantes ao presente estudo.

Sendo assim, o conhecimento da composição do cisto das metacercárias é importante, pois contribui para o esclarecimento da resistência da metacercária a determinados fatores intrínsecos e/ou extrínsecos.

Figura 26. Metacercária de *Paratanaisia bragai* visualizadas com o auxílio da microscopia de luz dos cortes histológicos de *Leptinaria unilamellata* infectada. A. Vista geral da metacercária, corada com tricrômico de Gomori, evidenciando a ventosa oral (os) e o acetábulo (a). Barra de escala = 20 µm. B. Metacercária, corada com tricrômico de Gomori, evidenciando o acetábulo (a), o núcleo (n) das células e a presença de escamas (sc). Barra de escala= 20 µm. C. Metacercária, corada com tricrômico de Gomori, com a visualização das camadas da parede do cisto, camada externa (el), camada média (mel) e camada interna (il), além das escamas (sc). Barra de escala = 20 µm. D. Metacercária, corada com Hematoxilina-Eosina, evidenciando o acetábulo (a). Barra de escala= 20 µm.

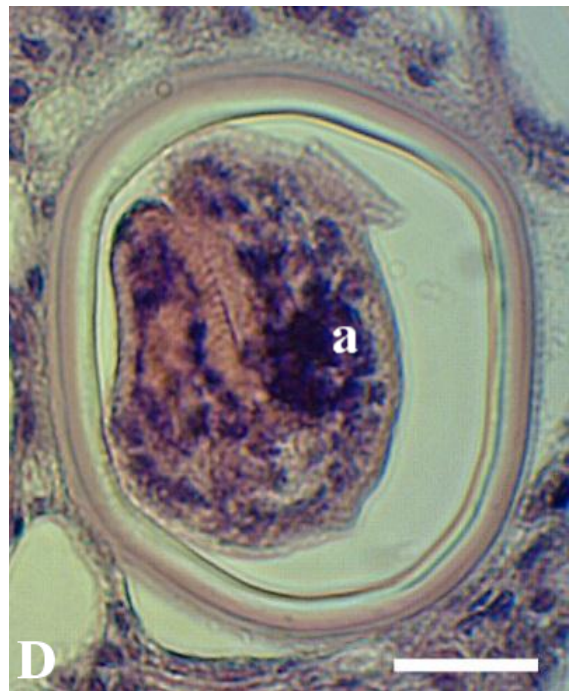
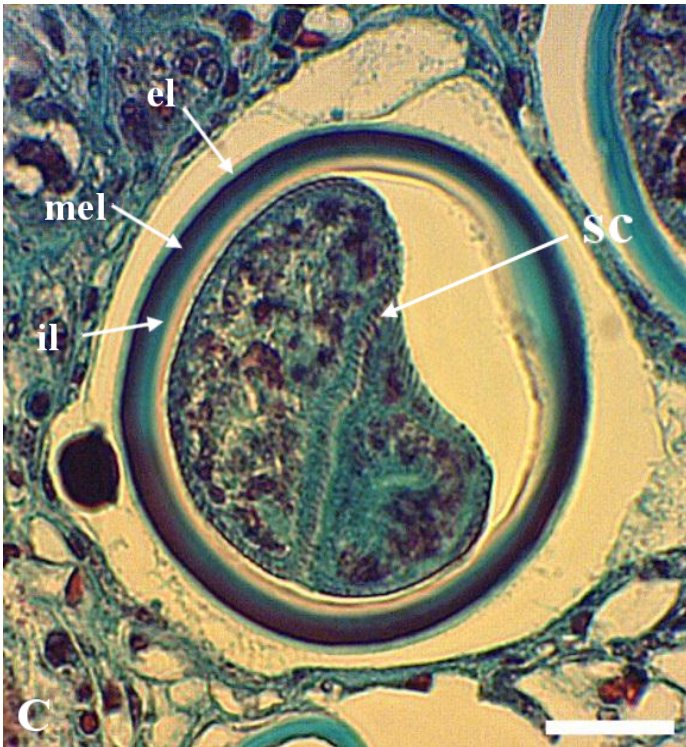
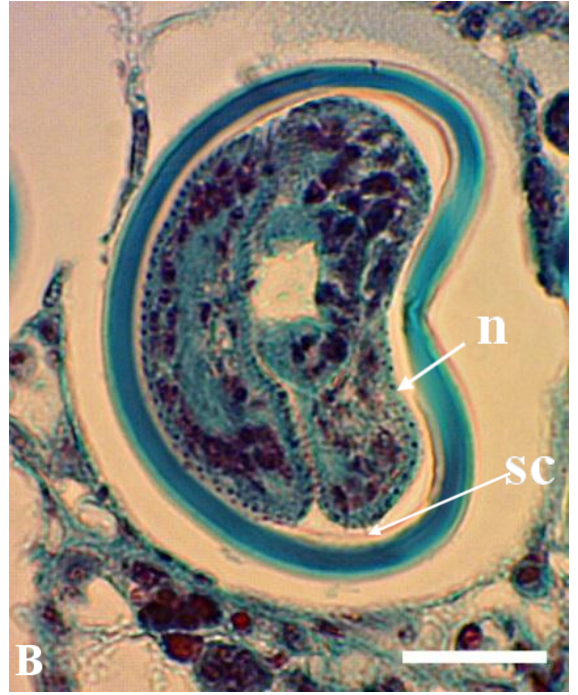
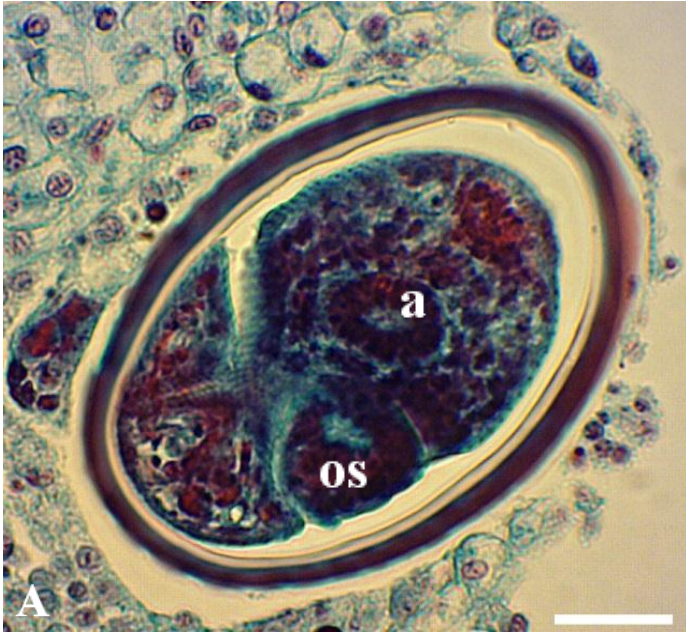


Figura 27. Metacercária de *Paratanaisia bragai*. A. Metacercária, não fixada, em vista geral, evidenciando a ventosa oral (os), o acetábulo (a) e as camadas da parede do cisto, camada externa (el), camada média (mel) e camada interna (il). Barra de escala = 20 μm . B. Metacercária, não fixada, em vista geral, evidenciando a ventosa oral (os), o acetábulo (a) e a faringe (ph). Barra de escala= 20 μm . C. Metacercária, fixada, evidenciando a ventosa oral (os) e o acetábulo (a) e as camadas do cisto, camada externa (el), camada média (mel) e camada interna (il). Barra de escala = 20 μm . D. Metacercária visualizada em microscopia eletrônica de varredura. Barra de escala= 50 μm .

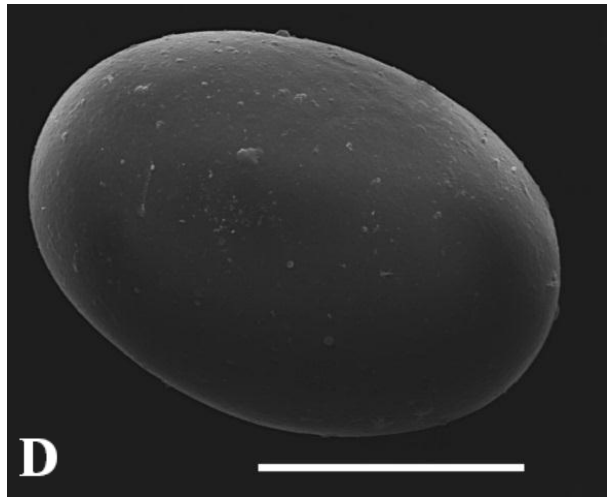
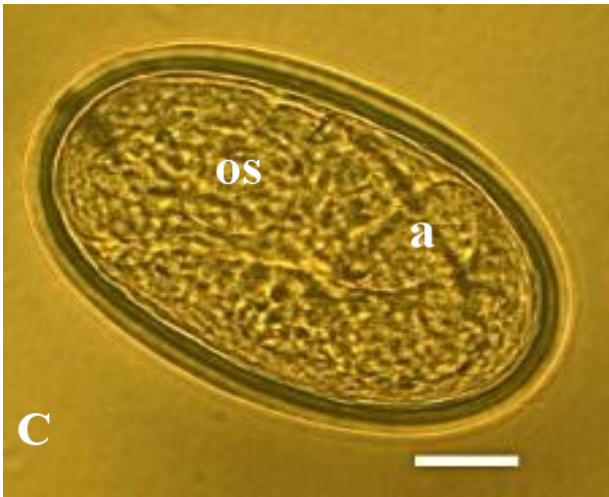
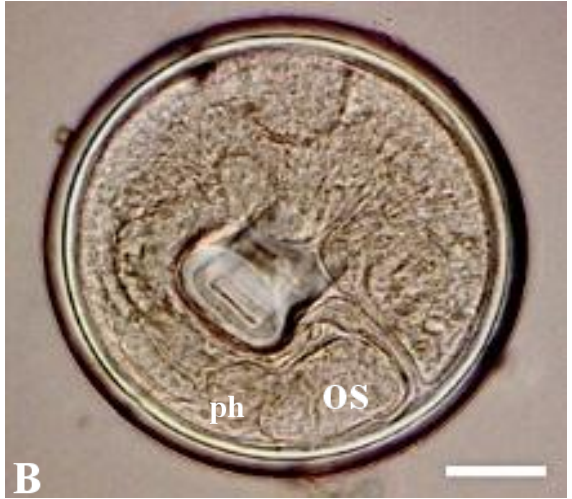
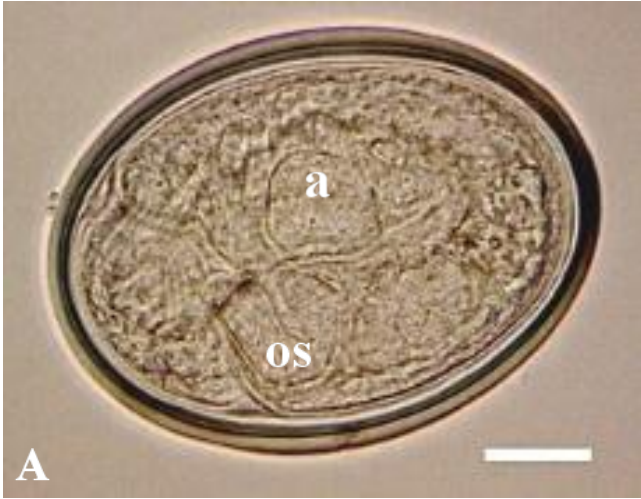
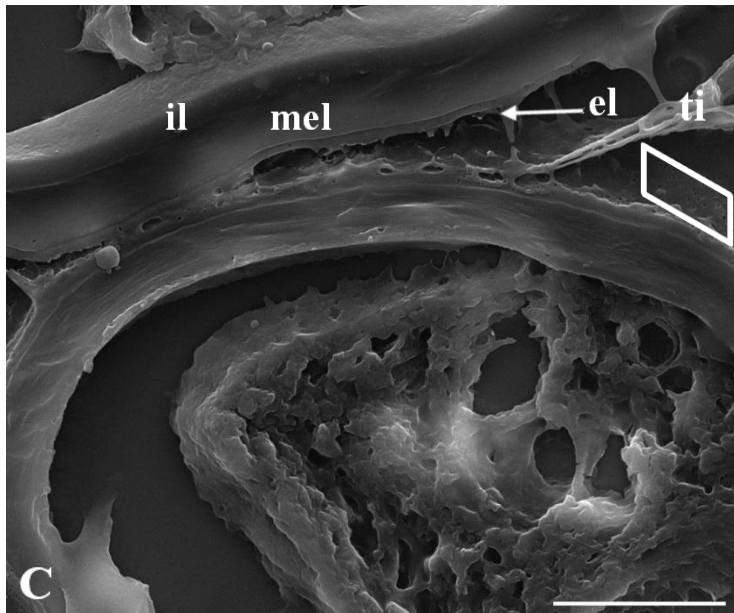
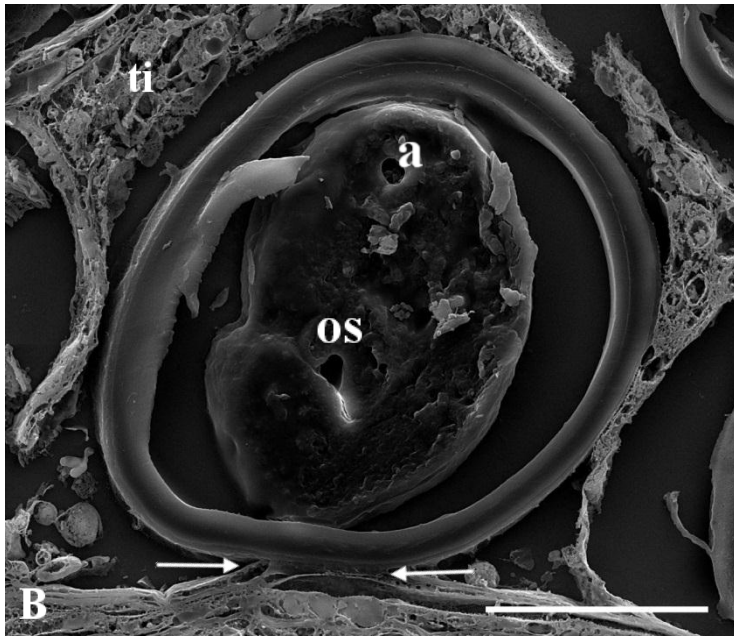
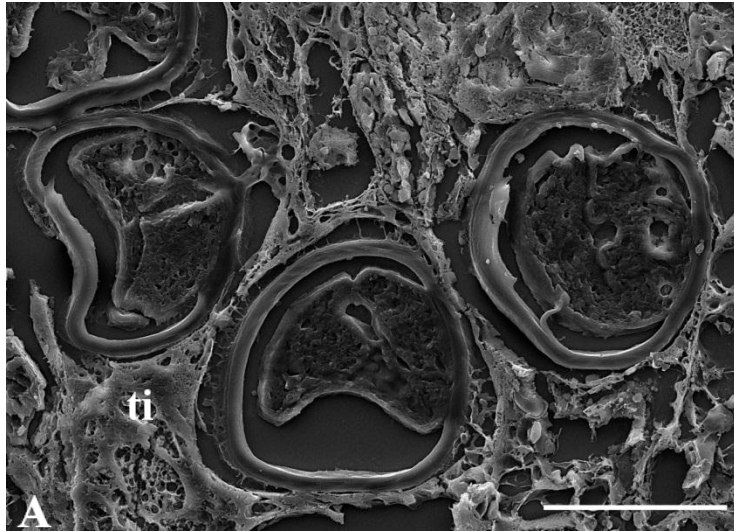


Figura 28. Metacercária de *Paratanaisia bragai*, visualizada através da microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos do tecido infectado de *Leptinaria unilamellata*. A. Visão geral das metacercárias no tecido (ti) infectado do molusco. Barra de escala = 50 μ m. B. Metacercária no tecido (ti) infectado do molusco, evidenciando a ventosa oral (os) e o acetábulo (a). As setas demonstram o contato da parede do cisto da metacercária com o tecido de *L. unilamellata*. Barra de escala= 30 μ m. C. Detalhe da estrutura da parede do cisto da metacercária presente no tecido (ti) do molusco infectado, evidenciando a camada externa (el), camada média (mel) e camada interna (il), além disso, a camada externa apresenta-se porosa (retângulo). Barra de escala= 10 μ m.



4.8 Adulto

Na microscopia de contraste de interferência diferencial, foi possível observar que o estágio adulto de *P. bragai*, apresenta corpo alongado e achatado, com a presença da ventosa oral, subterminal, na extremidade anterior do corpo, logo em seguida a faringe, ratificando o observado por diversos autores (SANTOS, 1934; STUNKARD, 1945; BYRD e DENTON, 1950; FREITAS, 1951; FRANCO, 1965), a presença de acetábulo, e glândulas vitelogênicas, em ambos os lados do corpo do parasito (Figuras 29A – 29C).

Os dados morfométricos foram compilados na tabela 8. As medidas obtidas do parasito adulto na microscopia de luz (Tabela 8) são de $1712,00 \pm 86,43 \mu\text{m}$ (1600 – 1840) comprimento médio, largura média na região anterior de, $470,00 \pm 56,12 \mu\text{m}$ (410 – 540), largura média na região do acetábulo de, $490,00 \pm 48,48 \mu\text{m}$ (430 – 540) e largura média na região posterior igual a $452,00 \pm 38,34 \mu\text{m}$ (410 – 500). Essas medidas foram maiores quando comparadas com as realizadas pela microscopia eletrônica de varredura, que apresentou comprimento médio de $1295,69 \pm 232,77 \mu\text{m}$ (1028,17 – 1451,92), largura média na região do acetábulo de $250,68 \pm 32,96 \mu\text{m}$ (230,76 – 288,73), largura média na região do acetábulo de $289,82 \pm 46,19 \mu\text{m}$ (244,18 – 336,54) e largura média na região posterior de $280,65 \pm 32,11 \mu\text{m}$ (255,81 – 316,90). A literatura revela muitas variações com relação ao tamanho do parasito adulto de *P. bragai*, tanto em comprimento quanto em largura. Santos (1934) afirma que o comprimento do estágio adulto pode chegar até $3000,00 \mu\text{m}$, e largura de $600,00 \mu\text{m}$, não diferenciando as regiões do corpo, ou seja, anterior, acetabular e posterior. A variação de Santos (1934) no comprimento é bem ampla e se encaixa, nas medidas obtidas pelo presente estudo, tanto pela microscopia de luz, quanto pela microscopia eletrônica de varredura, já o quesito largura, está de acordo somente com as medidas obtidas através da microscopia de luz. Stunkard (1945) afirma que o comprimento do parasito varia entre (1200 – 3000) μm e largura (200 – 450). Em comprimento, os valores se enquadram nas medidas obtidas no presente estudo, pelas duas técnicas de microscopia utilizadas. Já em largura é mais semelhante com os resultados obtidos com a microscopia de luz.

As medidas obtidas na literatura (BYRD e DENTON, 1950; FREITAS, 1951; BRANDOLINI e AMATO, 2007) se assemelham as aferidas pela microscopia de luz. Franco (1995), no entanto observou parasitos bem maiores, dos verificados pelos demais autores, com comprimento variando entre (3490 – 4260), conforme (Tabela 8).

A ventosa oral, no presente estudo apresentou medidas de $181,86 \pm 13,88 \mu\text{m}$ (164,21 – 200,00) diâmetro maior e $156,36 \pm 9,07 \mu\text{m}$ (140 – 170) para o diâmetro menor, na microscopia de luz, valores semelhantes aos encontrados por Byrd e Denton (1950) e Freitas (1951), já na microscopia eletrônica de varredura observou-se diâmetro maior de $115,11 \pm 11,59 \mu\text{m}$ (103,22 – 126,37) e diâmetro menor de $98,14 \pm 21,19 \mu\text{m}$ (77,42 – 119,78), valores esses, semelhantes aos encontrados por Stunkard (1945) e Brandolini e Amato (2007). Santos (1934) e Franco (1965) apresentaram valores bem maiores do que os observados na literatura, conforme (Tabela 8).

A faringe, visualizada apenas na microscopia de luz, apresentou valores médios de diâmetro maior $87,55 \pm 15,53 \mu\text{m}$ (65,26 – 102,94) e diâmetro menor de $65,36 \pm 9,79 \mu\text{m}$ (54,74 – 78,57), valores que se encaixam dentro da amplitude de variação dos obtidos por Byrd e Denton (1950) e Freitas (1951), no entanto são menores aos fornecidos por Franco (1965) e Santos (1934), esse último, na verdade não foi confirmado por nenhum dos autores citados, conforme (Tabela 8).

O esôfago não foi observado em nenhum espécime do presente estudo, assim como ocorreu no trabalho de Santos (1934), diferindo de Stunkard (1945) que verificou a presença de um esôfago curto, visualizado apenas quando a extremidade posterior do parasito é estendida. Byrd e Denton (1950) demonstram um esôfago de tamanho variável, característica ratificada por Freitas (1951) e posteriormente por Franco (1995) que relatam, que os espécimes observados apresentam variabilidade no tamanho do esôfago, ou seja, existiam espécimes com esôfago nulo, longo, dilatado e sem dilatação.

Através da coloração do parasito com Hematoxilina-Eosina (Figura 29B), foi possível observar, com mais detalhes a presença das glândulas vitelogênicas que são extra-cecais, e se prolongam para a região pré-ovariana, assim como observado por Freitas (1951) e Byrd e Denton (1951), além disso, apresentam comprimento médio, do lado do ovário, de $903,33 \pm 84,70 \mu\text{m}$ ($810,00 - 1047,62$), terminando a $695,56 \pm 56 \mu\text{m}$ ($570,00 - 780,00$), e as glândulas vitelogênicas do lado oposto ao ovário, apresentam comprimento médio de $878,57 \pm 174,70$ ($660,00 - 1095,24$), terminando a $651,51 \pm 93,23 \mu\text{m}$ ($523,81 - 780,00$). As medidas das glândulas vitelogênicas, enquadram-se na amplitude de variação, quando comparadas aos resultados obtidos por Freitas (1951), pois de acordo com esse autor, o campo vitelínico do lado do ovário mede ($600,00 - 2010,00$) μm de comprimento e termina a ($500,00 - 1640,00$) μm da extremidade posterior, já o campo vitelínico oposto ao ovário apresentava ($740,00 - 1880,00$) μm de comprimento, terminando a mesma distância do lado do ovário. No entanto, os valores obtidos no presente estudo são bem maiores do que os observados por Santos (1934) e menores quando comparados aos verificados por Franco (1965), conforme verificado na (Tabela 8).

A localização das glândulas vitelogênicas é utilizada como caracterização do gênero da subfamília Tanaisiinae. Freitas (1959) descreveu o gênero *Paratanaisia*, incluindo três espécies *T. bragai*, *T. confusa* e *T. robusta* que apresentam os campos vitelogênicos ultrapassando anteriormente à zona ovariana, sendo *P. bragai* a espécie tipo. O gênero *Paratanaisia* foi mantido por Kanev et al. (2002).

Os cecos intestinais são paralelos às glândulas vitelogênicas, de ambos os lados do corpo do parasito, de formato sinuoso, e fusionados na extremidade posterior, a $230,00 \mu\text{m}$ da região posterior do corpo, ratificando o observado por Santos (1934). Os resultados de Freitas (1951), também, são corroborados pelo presente estudo, já que este autor relata a presença dos cecos intestinais dorsais às gônadas, mais ou menos sinuosos e fusionados a $100 - 450 \mu\text{m}$ da extremidade posterior do corpo. Byrd e Denton (1950), também, observaram os cecos paralelos às margens do corpo, que se fusionam próximo à extremidade posterior do corpo. A distância entre o ceco e o final do corpo, de acordo com Byrd e Denton (1950) varia de um quinto a um oitavo do comprimento do parasito, relação essa que confere com as medidas do presente estudo e as aferidas por Freitas (1951). Franco (1995) observou que os cecos intestinais também se fusionam, a ($580,00 - 610,00$) μm da extremidade posterior do corpo, medidas essas bem elevadas, quando comparadas as observadas no presente estudo. No entanto, se encaixam na variação proposta por Byrd e Denton (1950), já que Franco (1995) observou parasitos adultos medindo ($3490,00 - 4260,00 \mu\text{m}$).

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível ter uma visão geral do parasito, com a presença da ventosa oral, a abertura oral e o acetábulo (Figura 30 A). Com o detalhamento da ventosa oral, foram observadas papilas externas, ao redor da ventosa, dispostas de forma irregular, assim como observado por Brandolini e Amato (2007), além disso, foi possível verificar papilas interna como verificado nas (Figuras 30B - 30D). Em *S. mansoni*, verificou-se que a superfície interna da ventosa oral de

ambos os sexos apresentam pequenos espinhos que apontam em direção à boca, sendo ausentes na superfície externa da ventosa (HOCKLEY, 1973).

Foi observada uma parede com musculatura em fileiras paralelas no interior da cavidade oral (Figuras 30E – 30F). As papilas externas apresentam diâmetro maior de $4,52 \pm 1,20 \mu\text{m}$ ($8,33 - 2,42$) e diâmetro menor de $3,62 \pm 0,83 \mu\text{m}$ ($5,55 - 2,35$) e as papilas internas, apresentam-se menores com $2,24 \pm 0,66 \mu\text{m}$ ($3,53 - 1,65$) de diâmetro maior e $1,68 \pm 0,29 \mu\text{m}$ ($2,09 - 1,43$) de diâmetro menor.

A visualização do acetábulo, através da microscopia de luz apresentou grande dificuldade, em decorrência do seu tamanho reduzido, por isso não foram informadas suas medidas na (Tabela 8), sendo confirmada a sua presença na microscopia eletrônica de varredura. Tanto é que muitos trabalhos científicos, relatam a ausência dessa ventosa no parasito adulto (SANTOS, 1934; BYRD e DENTON, 1950; FRANCO, 1965). Byrd e Denton (1950), no entanto, afirmam que *P. bragai* é um parasito dístome. Maldonado (1945a) ainda afirma que o acetábulo é atrofiado, medindo menos que $40,00 \mu\text{m}$ de diâmetro, ou mesmo ausente em alguns espécimes.

O presente estudo, ao analisar a morfologia do acetábulo através da microscopia eletrônica de varredura, verifica que apesar do seu tamanho reduzido, o acetábulo não é atrofiado e foi observado em todos os espécimes analisados na microscopia eletrônica. O acetábulo apresenta diâmetro maior igual a $38,36 \pm 6,96 \mu\text{m}$ ($28,77 - 45,39$) e diâmetro menor de $31,59 \pm 7,04 \mu\text{m}$ ($21,75 - 38,16$), resultados que estão de acordo com a amplitude de variação de: Freitas (1941) com (30 – 100) e (30 -80) de comprimento e largura, respectivamente; Stunkard (1945) com (40,00 – 50,00) μm de diâmetro e Brandolini e Amato (2007) com média de $40,83 \mu\text{m}$ ($37,70 - 43,96$) de comprimento e largura média de $20,41 \mu\text{m}$ ($18,30 - 22,52$). Além disso, o presente estudo verificou a distância da ventosa oral até o acetábulo $490,82 \pm 54,71 \mu\text{m}$ ($429,58 - 534,88$) e a distância do acetábulo até a ponta da extremidade posterior $746,54 \pm 160,19 \mu\text{m}$ ($563,38 - 860,46$). Esses parâmetros não foram colocados na (Tabela 8), pois somente o estudo atual aferiu essas medidas. Tais medidas ratificam a observação realizada por Stunkard (1945) e Brandolini (2000) que o acetábulo está localizado no terço médio do corpo, já que o comprimento do parasito adulto obtida no presente estudo através da microscopia eletrônica foi de $1295,69 \pm 232,77 \mu\text{m}$ ($1028,17 - 1451,92$). O acetábulo apresenta papilas, com diâmetro maior de $1,79 \pm 0,41 \mu\text{m}$ ($2,65 - 1,40$) e diâmetro menor de $1,51 \pm 0,52 \mu\text{m}$ ($2,35 - 0,88$), disposta irregularmente, ao redor de sua borda, além da observação da ausência de escamas próximas a região do acetábulo (Figuras 31A – 31D), características abordadas por Brandolini e Amato (2007), estas autoras afirmam ainda, a presença de protuberâncias no tegumento que circunda o acetábulo, tal estrutura foi observada no presente estudo em outros locais do tegumento do parasito, sendo denominadas de papilas. Hockley (1973), também, verificou a presença de papilas sensoriais, além de espinhos, mas na superfície interna do acetábulo, de ambos os sexos de *S. mansoni*, sendo esta última estrutura, ausente na superfície externa das ventosas.

O estudo atual verificou com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura a presença do poro genital que se localiza acima do acetábulo, na região ventral do corpo com $30,59 \mu\text{m}$ de diâmetro maior e $26,18 \mu\text{m}$ de diâmetro menor, somente um poro genital foi observado (Figuras 32A – 32B), confirmando os resultados obtidos por Stunkard (1945) que ainda afirma que o poro genital está localizado abaixo da extremidade anterior do ovário ou mesmo no nível da margem cefálica do ovário, e que o átrio genital é comum para os aparelhos genital feminino e masculino (BYRD e DENTON, 1950). Freitas (1951) afirma que o poro genital é mediano, assim como relatado por Franco (1995) e Brandolini (2000).

Em decorrência da posição do poro genital que serve como saída para o ducto masculino, o presente estudo observou o cirro evertido, com ornamentações em formato de roseta, que se projeta através poro genital na (Figura 32C), assim como sugerido por Byrd e Denton (1950) que afirmam que o cirro de *T. bragai*, é curto e robusto, e que está contido na bolsa do cirro localizada posteriormente ao poro genital. O cirro é o órgão copulador dos digenéticos, que pode estar ou não contido na bolsa do cirro, sendo um tubo muscular, que durante a cópula, ocorre a eversão de sua parede, projetando-se para fora (REY, 2008).

De acordo com Dawes (1968) o cirro dos digenéticos geralmente apresenta parede com musculatura circular e longitudinal e espinhos. A presença de espinhos foi verificada em *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 por Srimuzipo et al. (2000). Esses autores visualizaram o cirro em forma de salsicha e ornamentado com espinhos de variados tamanhos e afiado, além de observarem falsas estrias na sua região dorsal. Naem et al. (2012) observou que o cirro de *Fascioloides magna* Bassi, 1875 apresenta superfície lisa, com pequenos poros na região dorsal do órgão, e que em determinadas zonas entre a dobra do cirro, existiam pequenos poros e grupos de pequenos espinhos.

D'ávila et al. (2010) verificaram que o cirro de *T. inopina* é muscular e de formato cilíndrico, afirmando ainda, que o sistema reprodutor de *T. bragai* é semelhante na morfologia geral ao descrito para *T. inopina*. No entanto, D'ávila et al. (2010) não relatam nenhuma ornamentação na estrutura do cirro.

O poro excretor foi verificado na extremidade posterior, subterminal na região dorsal do corpo do parasito, assim como observado por Brandolini (2000), apresentando um diâmetro maior de $12,27 \pm 9,16 \mu\text{m}$ ($18,75 - 5,79$) e diâmetro menor de $3,95 \pm 1,49 \mu\text{m}$ ($5,00 - 2,89$) (Figura 32D).

A Tabela 8 apresenta uma comparação entre os parâmetros morfométricos observados no presente estudo e dados obtidos pelos demais autores

Tabela 8. Medidas comparativas de determinadas estruturas do estágio adulto de *Paratanaisia bragai*.

Medidas (μm)	Medidas comparativas de determinadas estruturas do estágio adulto de <i>Paratanaisia bragai</i>							
	Presente estudo (DIC)	Presente estudo MEV	Santos (1934)	Stunkard (1945)	Byrd e Denton (1950)	Freitas (1951)	Franco (1965)	Brandolini e Amato (2007)
	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD
Comprimento	1712,00 \pm 86,43 (1600 – 1840)	1295,69 \pm 232,77 (1028,17 – 1451,92)	Até 3000	(1200 – 3000)	1990,00 \pm - (1620 – 2550)	(1670 – 3950)	(3490 – 4260)	1735 \pm - (1674,80 – 1756,34)
Largura Região A	470,00 \pm 56,12 (410 – 540)	250,68 \pm 32,96 (230,76 – 288,73)						
Largura Região Ac	490,00 \pm 48,48 (430 – 540)	289,82 \pm 46,19 (244,18 – 336,54)	660	(200 – 450)	420,00 \pm - (320 – 530)	(450 – 700)	(910 – 1030)	-
Largura Região P	452,00 \pm 38,34 (410 – 500)	280,65 \pm 32,11 (255,81 – 316,90)						
VO Diâmetro Maior	181,86 \pm 13,88 (164,21 – 200,00)	115,11 \pm 11,59 (103,22 – 126,37)	500	(100 – 145)	190,00 \pm - (140 – 230)	(180 – 300)	(270 – 310)	133,47 \pm - (128,44 – 140,07)
VO Diâmetro Menor	156,36 \pm 9,07 (140 – 170)	98,14 \pm 21,19 (77,42 – 119,78)	410		170,00 \pm - (130 – 200)	(150 – 270)	(230 – 320)	102,07 \pm - (98,61 – 103,34)
Faringe Diâmetro Maior	87,55 \pm 15,53 (65,26 – 102,94)	-	160	(45 – 65)	80,00 \pm - (60 – 90)	(50 – 110)	(120 – 130)	-
Faringe Diâmetro Menor	65,36 \pm 9,79 (54,74 – 78,57)	-			60,00 \pm - (40 – 80)	(40 – 100)	(90 – 130)	-
Acetábulo Diâmetro Maior	-	38,36 \pm 6,96 (28,77 – 45,39)	-	(40 – 50)	-	(30 – 100)	-	40,83 \pm - (37,70 – 43,96)
Acetábulo Diâmetro Menor	-	31,59 \pm 7,04 (21,75 – 38,16)	-		-	(30 – 80)	-	20,41 \pm - (18,30 – 22,52)

Continuação da Tabela 8.

Medidas (μm)	Presente estudo Luz (DIC)	Presente estudo MEV	Santos (1934)	Stunkard (1945)	Byrd e Denton (1950)	Freitas (1951)	Franco (1965)	Brandolini e Amato (2007)
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$
Glândulas vitelogênicas – lado do ovário	903,33 \pm 84,70 (810,00 – 1047,62)	-	-	-	-	(600 – 2010)	(1980 – 2460)	-
Término na Extremidade posterior	695,56 \pm 83,95 (570 – 780)	-	320	-	-	(500 – 1640)	(1080 – 1580)	-
Glândulas vitelogênicas – lado oposto ao ovário	878,57 \pm 174,70 (660,00 – 1095,24)	-	-	-	-	(740 – 1880)	(1830 – 2460)	-
Término na Extremidade posterior	651,51 \pm 93,23 (523,81 – 780,00)	-	320	-	-	(500 – 1640)	(1060 – 1390)	-

()Números entre parênteses representam os valores mínimo e máximo observados. $X \pm SD$ =média \pm desvio-padrão. A = anterior. Ac = acetábulo. P= posterior. VO = ventosa oral.

- = Ausência.

DIC = Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial.

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 29. Estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia de luz. A. Vista geral do helminto com destaque para a ventosa oral (os), a faringe (ph) e o acetábulo (a). Barra de escala = 200 μm . B. Vista geral do helminto com destaque para a ventosa oral (os), a faringe (ph), o ovário (o), os cecos intestinais (ic), o acetábulo (a) e glândulas vitelogênicas (vg). Barra de escala = 200 μm . C. Detalhe da ventosa oral (os) e da faringe (ph). Barra de escala = 40 μm .

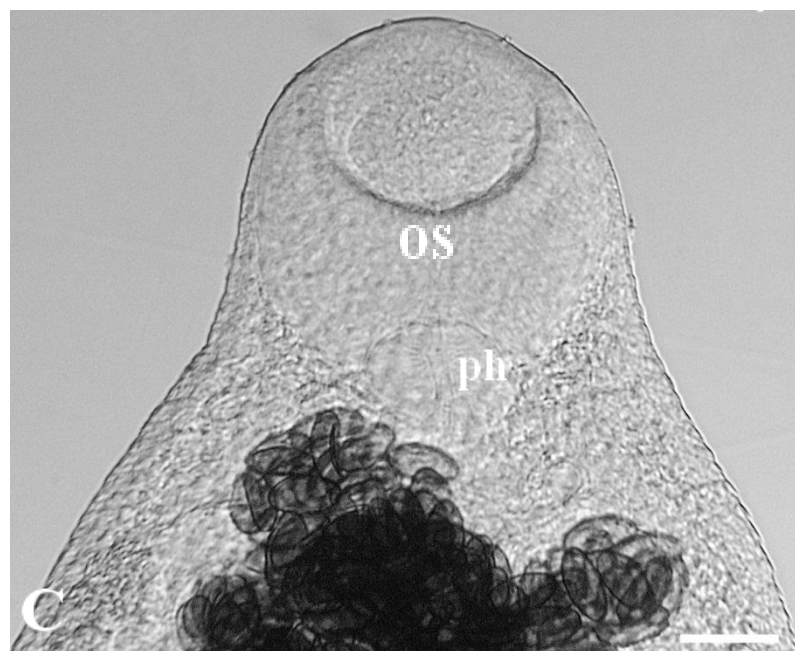
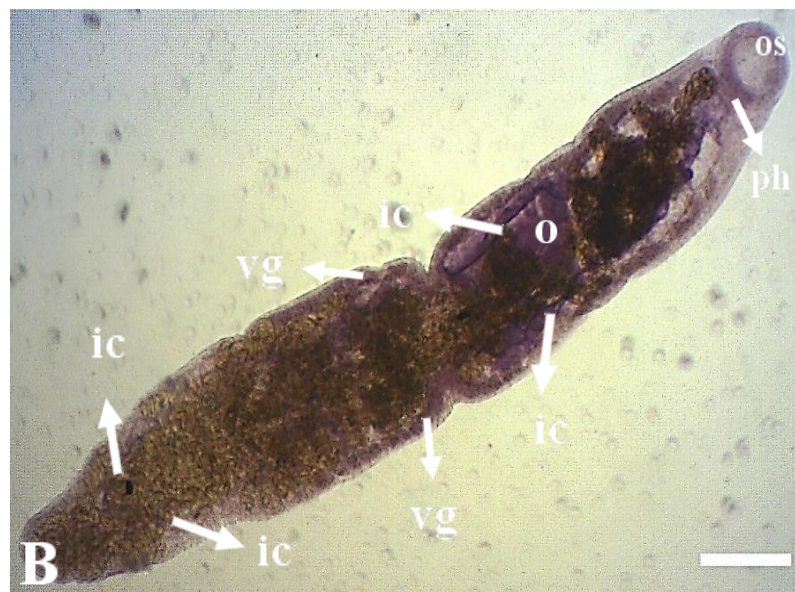
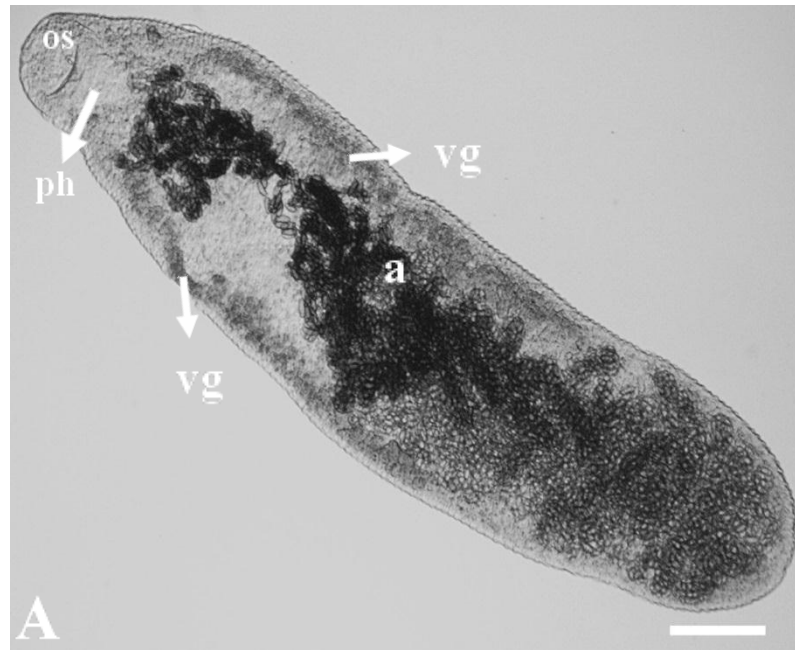


Figura 30. Estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de varredura. A. Vista geral do helminto com destaque para a ventosa oral (os), abertura oral (oo) e o acetábulo (a). Barra de escala = 250 μm . B. Detalhe da ventosa oral (os), com destaque para a presença de papilas externas (exp) ao redor da ventosa e papilas internas (ip), no interior da abertura oral (oo). Barra de escala = 50 μm . C. Detalhe das papilas internas (ip) da região da ventosa oral. Barra de escala = 10 μm . D. Ventosa oral (os) com papilas externas (exp) ao seu redor e a abertura oral (oo). Barra de escala = 100 μm . E e F. Detalhe da região interna da abertura oral (oo) da ventosa oral (os), com a visualização da parede lateral com uma musculatura em fileiras paralelas. Barra de escala = 50 μm e 20 μm , respectivamente.

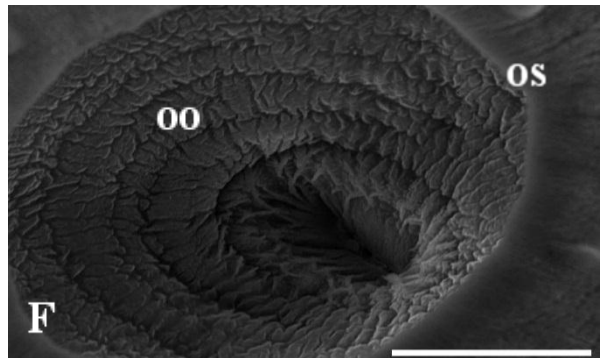
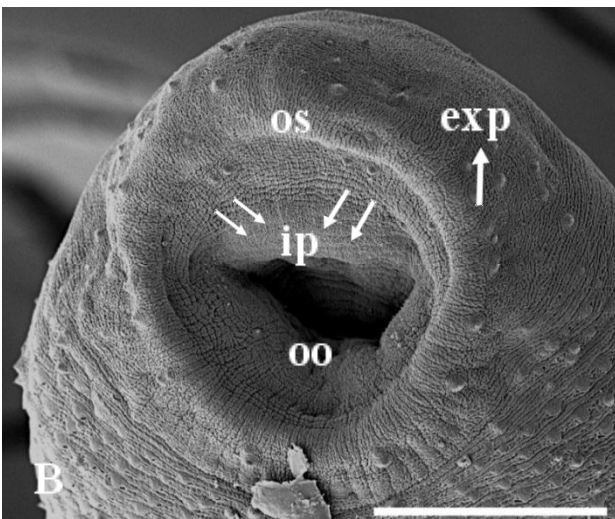
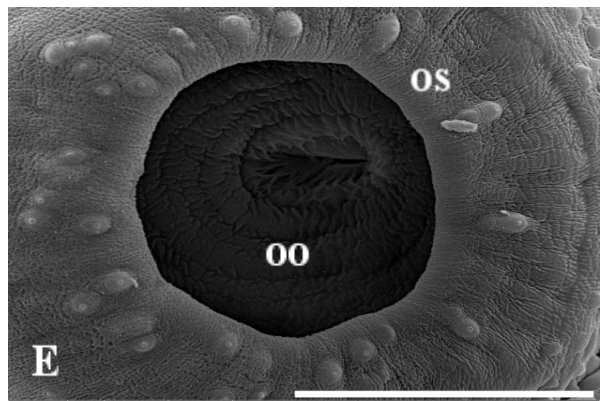
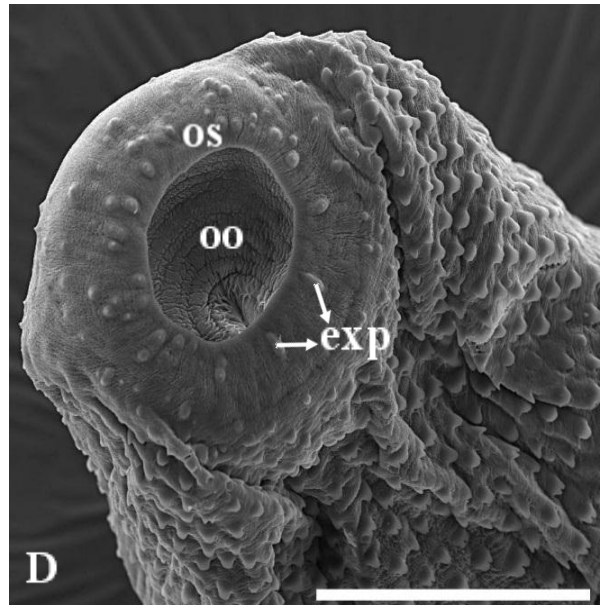
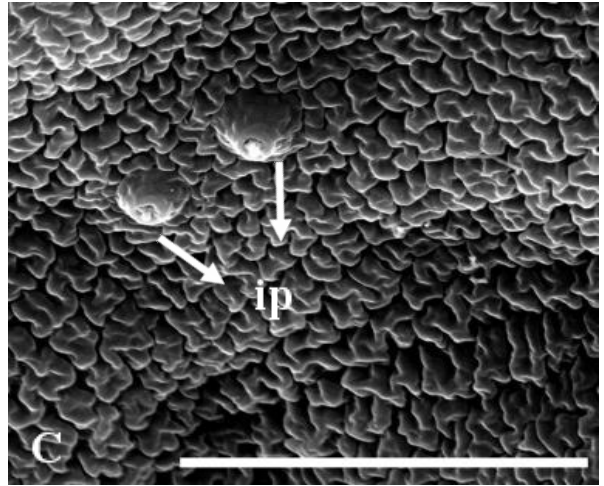
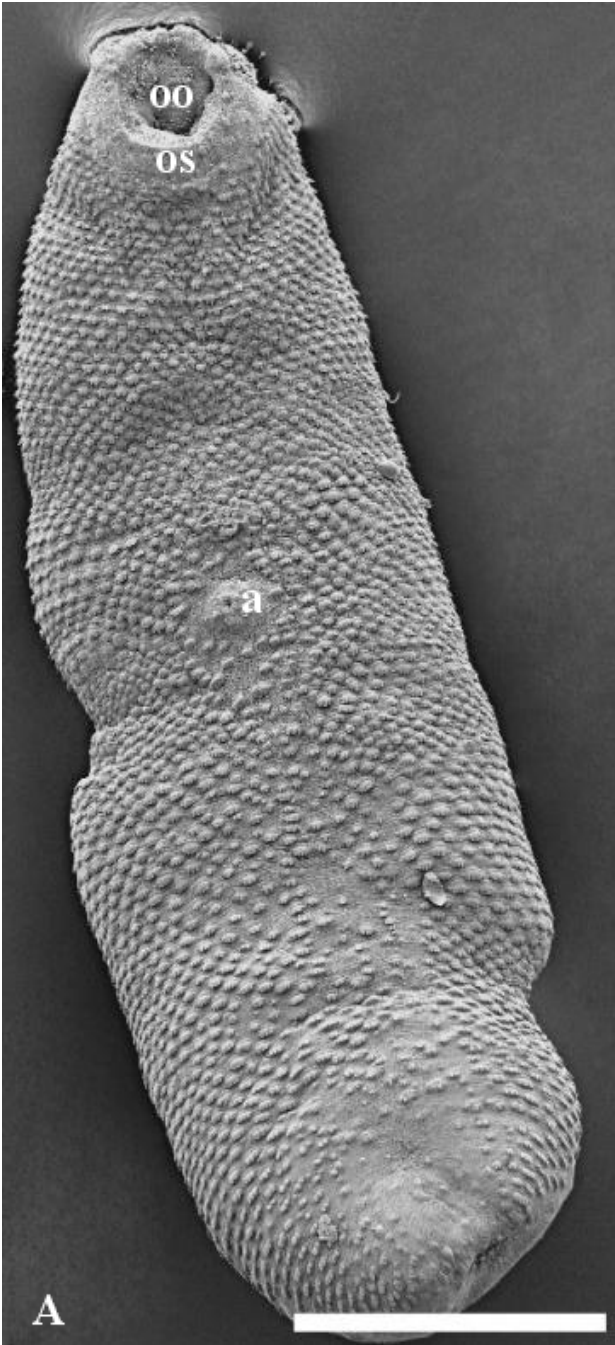


Figura 31. Região do terço médio do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de varredura. A, B, C e D. Diferentes visualizações do acetábulo (a), evidenciando a presença de papilas (pa) ao seu redor e uma área adjacente periférica (*) sem a presença de escamas. Barra de escala = 50 μm , 30 μm , 40 μm e 50 μm , respectivamente.

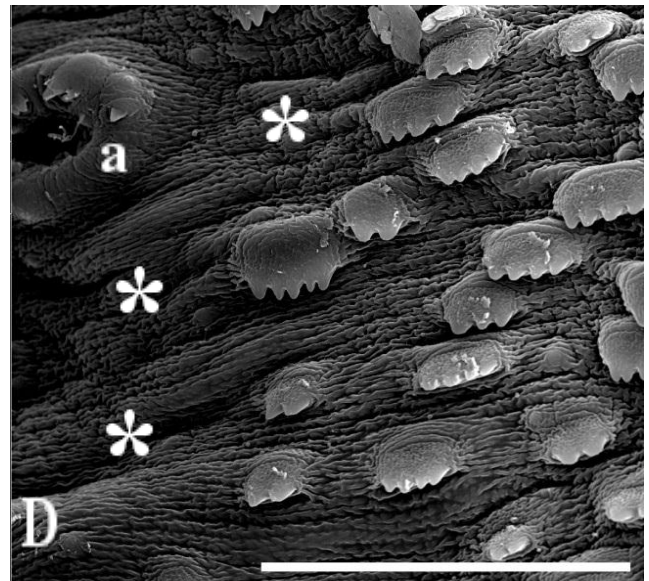
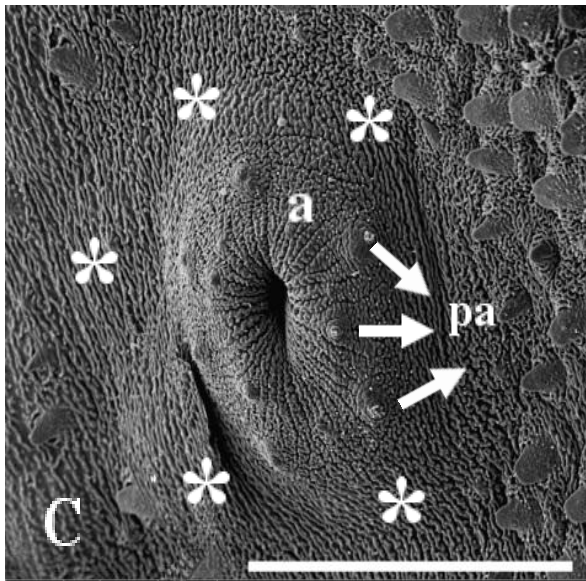
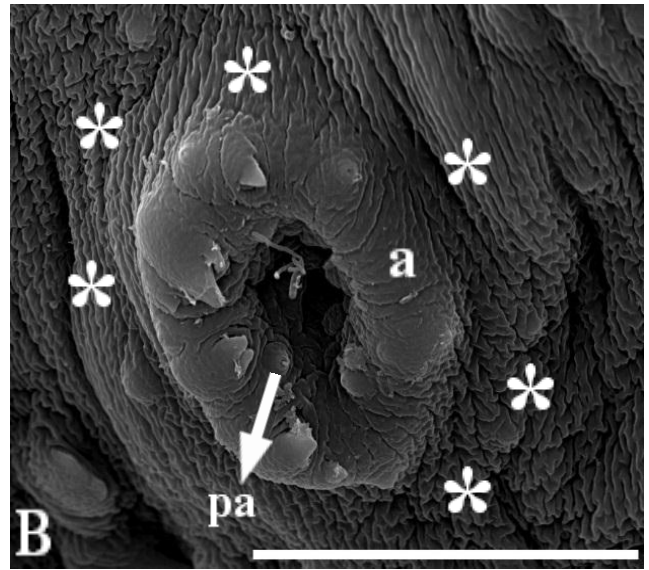
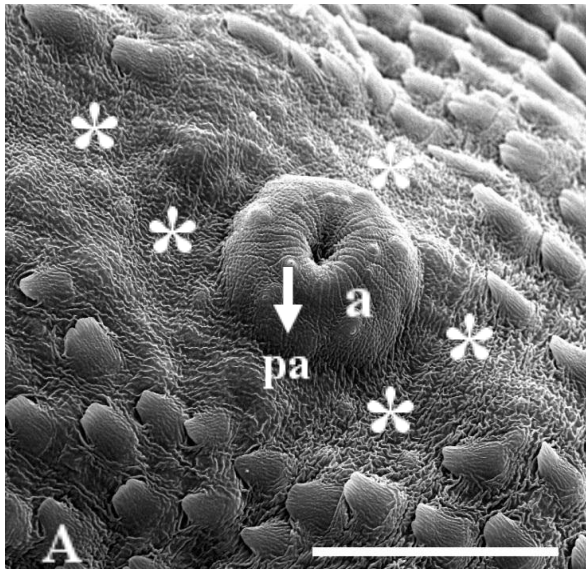
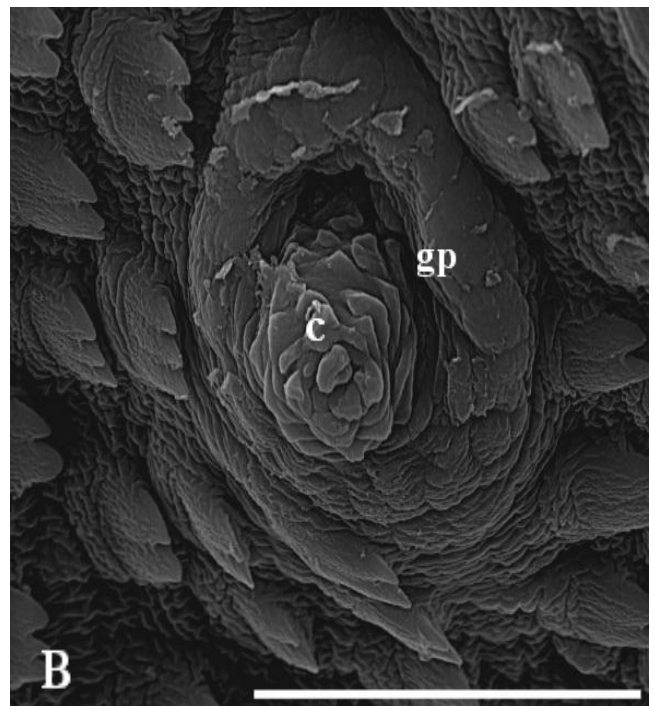
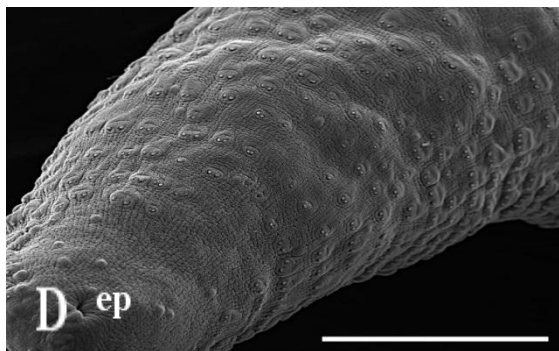
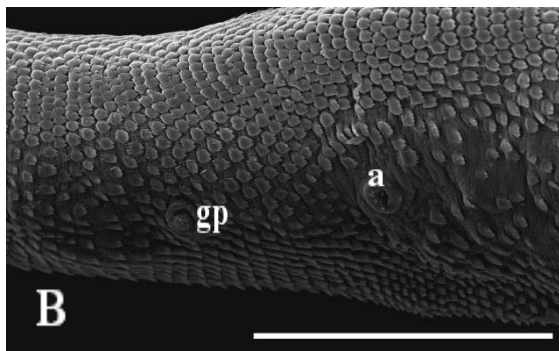
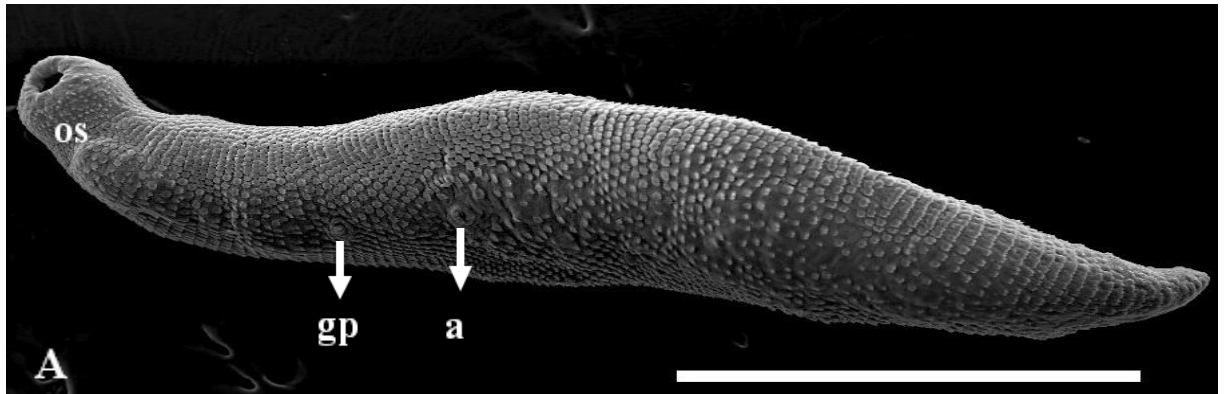


Figura 32. Estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observado através da microscopia eletrônica de varredura. A. Vista geral do helminto, na região ventral, evidenciando a ventosa oral (os), a localização do poro genital (gp) e do acetábulo (a). Barra de escala = 500 μm . B. Detalhe da presença do poro genital (gp) e do acetábulo (a). Barra de escala = 200 μm . C. Detalhe do poro genital (pg) com a presença do cirro (c) evertido. Barra de escala = 30 μm . D. Detalhe do poro excretor (ep) na região dorsal posterior. Barra de escala= 100 μm .



4.8.1 Tegumento do estágio adulto de *Paratanaisia bragai*

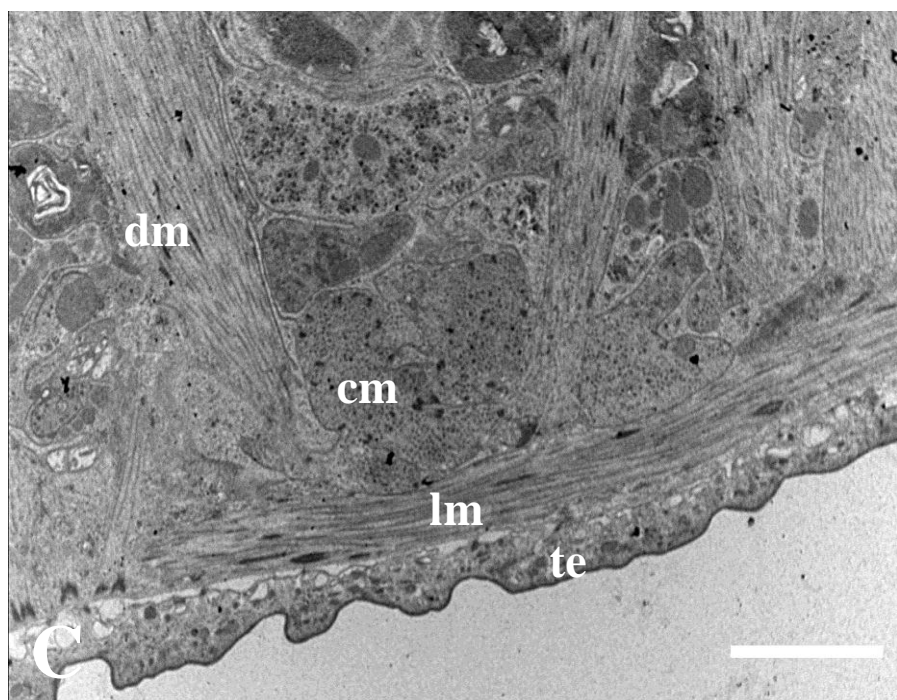
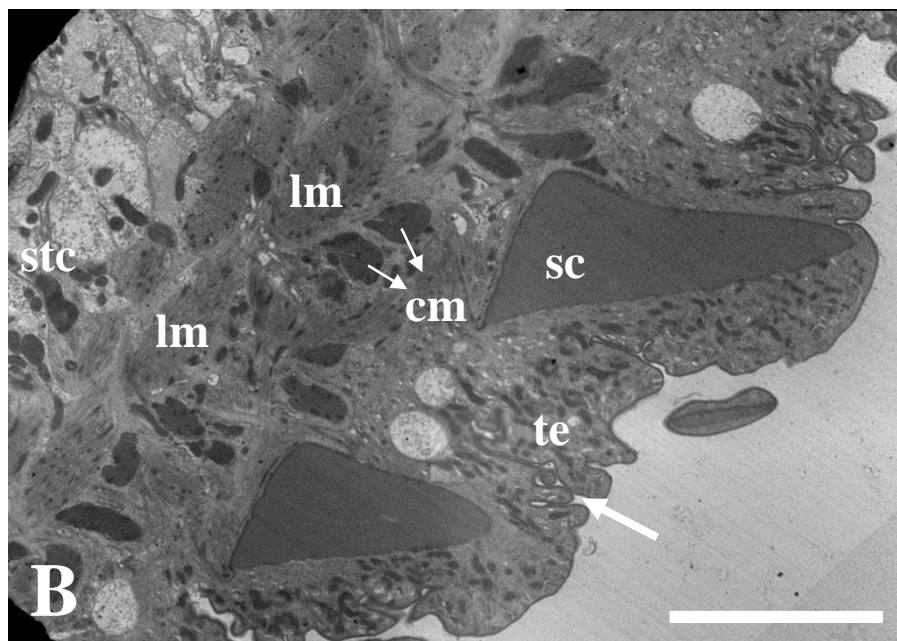
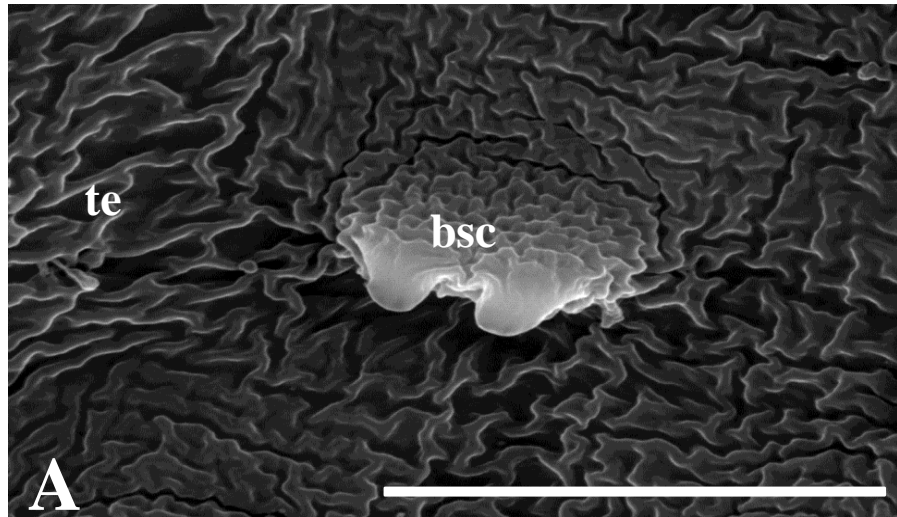
No presente estudo observou-se, através da microscopia eletrônica de varredura, que o tegumento de *P. bragai* apresenta aspecto enrugado e com várias escamas na face ventral e poucas na face dorsal do parasito (Figura 33A), assim como observado por Brandolini e Amato (2007). À microscopia eletrônica de transmissão, o tegumento se apresentou com muitas invaginações e dividido em uma camada externa sincicial e os núcleos visualizados na camada mais interna, abaixo da musculatura (Figura 33B), assim como verificado por Threadgold (1963) em *F. hepatica*.

As fibras musculares são geralmente organizadas em camadas circulares e longitudinais. Particularmente no adulto de *S. mansoni*, também são observadas fibras dispostas radialmente, que são proeminentes nas ventosas e frequentemente estão associadas aos espinhos (HOCKLEY, 1973). Hockley (1973) verificou tanto fibras circulares e longitudinais, na região anterior e mediana do corpo de *S. mansoni*, assim como verificado em *P. bragai*. Já as fibras radiais (Figura 33C) foram visualizadas, apenas na região anterior do corpo do parasito, de maneira proeminente, o que pode ser um indicativo da observação da ventosa oral. Chi et al. (1988) observaram em *M. yokogawai*, a presença de feixes de musculatura bem desenvolvida, próximo as ventosas oral e ventral. Embora estes autores relatado somente a presença de fibras longitudinais e circulares, quando observa a imagem da ultraestrutura da ventosa oral, são claramente visualizadas também as fibras radiais. O mesmo ocorrendo no trabalho de Cousin et al. (1995) que visualizaram na ultraestrutura da ventosa oral das cercárias de *S. mansoni*, a presença de fibras musculares circulares que se juntavam ao complexo de fibras longitudinais, e projetavam-se radialmente em relação a borda da ventosa.

D'ávila et al. (2010) afirma que a musculatura do corpo de *T. bragai* é composta de fibras externas circulares, fibras intermediárias longitudinais e fibras diagonais que se inter cruzam, formando a camada interna da parede do corpo. Adicionalmente, comentam que a contração da musculatura circular e longitudinal, respectivamente, estende e encurta o parasito, já a musculatura diagonal propicia o movimento lado-a-lado e certa torção. Já a ventosa oral e o acetábulo são formados por fibras musculares meridionais e equatoriais, bem como as fibras radiais que atingem as paredes interna e externa da ventosa oral. Contrariamente, o estudo atual, somente registra a presença de musculatura radial na região anterior do parasito.

Sebelová et al. (2004) afirmaram que os músculos meridionais provavelmente derivam das fibras somáticas longitudinais e atuam para abrir a concavidade da ventosa, já os músculos equatoriais seriam derivados das fibras somáticas circulares que na contração atuaria na sucção. Músculos dorsoventrais, como as fibras radiais, correm entre as superfícies interna e externa das ventosas, e se contraem para fechá-la.

Figura 33. Tegumento de *Paratanaisia bragai*. A. Através da microscopia eletrônica varredura visualizou-se o tegumento (te) enrugado, na raiz de uma escama bífida (bsc) na região ventral do corpo do parasito. Barra de escala = 10 μm . B. Tegumento (te) com invaginações (seta larga) observado através da microscopia eletrônica de transmissão, com visualização das escamas (sc), musculatura circular (cm), musculatura longitudinal (lm) e célula subtegumental (stc). Barra de escala = 2 μm . C. Região anterior do corpo do helminto verificada através da microscopia eletrônica de transmissão, com a presença do tegumento (te), musculatura circular (cm), musculatura longitudinal (lm) e musculatura diagonal (dm). Barra de escala = 1 μm .



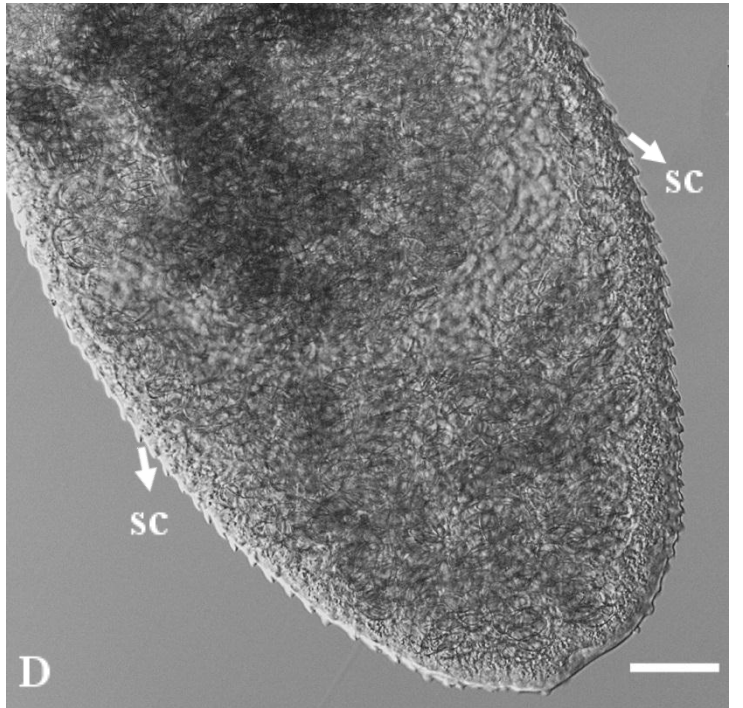
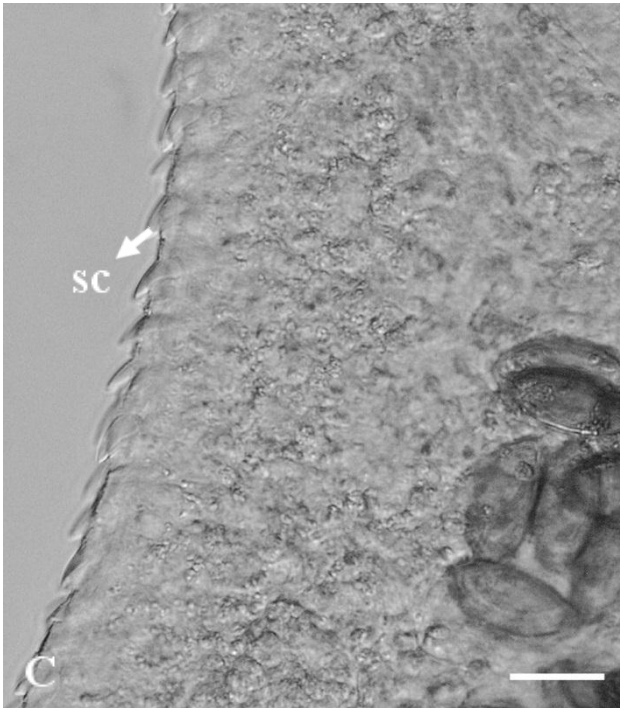
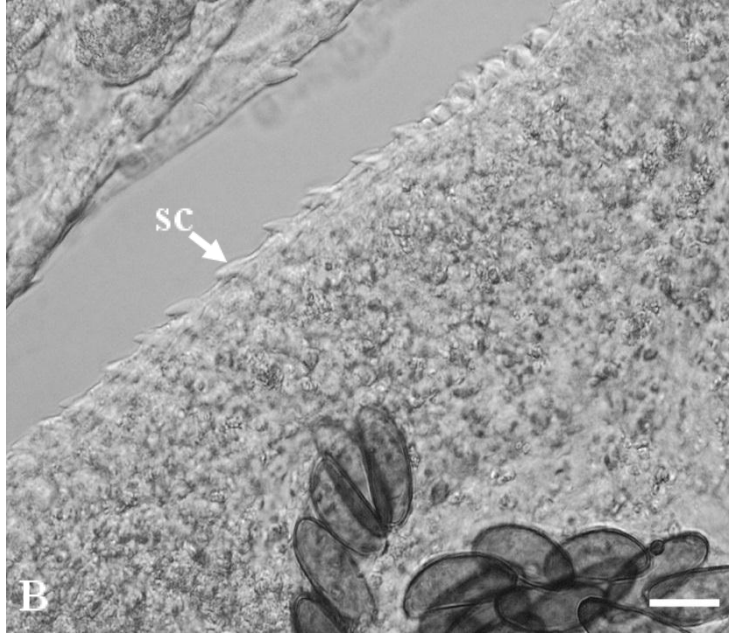
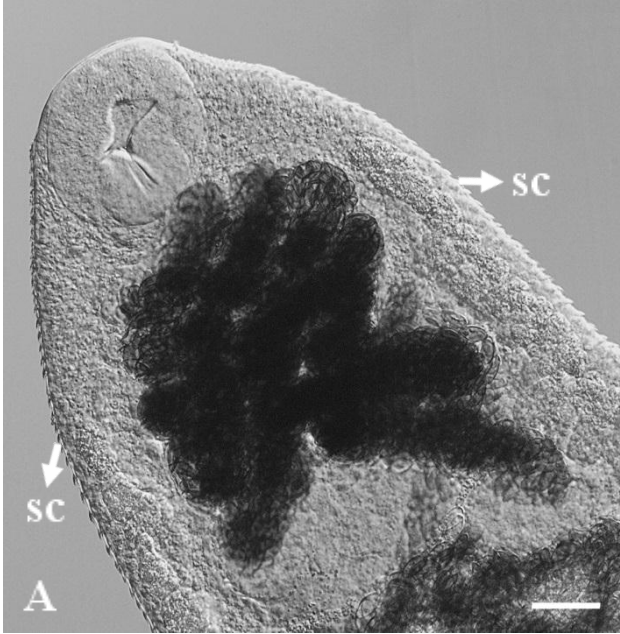
4.8.1.1 Escamas

No presente trabalho foi verificado, através das técnicas de microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão à presença de escamas no tegumento de *P. bragai*.

Com a microscopia de luz foi verificado escamas apenas na lateral do corpo do parasito, que, na verdade, aparentavam espinhos (Figura 34A – 34D).

Na microscopia eletrônica de varredura observou-se que na face ventral do corpo do parasito, as escamas são dispostas em fileiras transversais, e voltadas sempre para a extremidade posterior do corpo do helminto. As escamas apresentam formato achatado e de vários tipos, mantendo o mesmo aspecto. Foi possível a visualização de escamas simples, bífidas, trífidas, com quatro, cinco e sete divisões da lâmina. As escamas simples não apresentam divisão da lâmina, as bífidas apresentam lâmina dividida em dois elementos com extremidades livres, nas trífidas são três elementos livres dividindo a lâmina, e assim sucessivamente, nas lâminas com quatro, cinco e sete divisões.

Figura 34. Escamas presentes no tegumento do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observadas através da microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). A. Região anterior do corpo do helminto, com detalhe para as escamas (sc) presentes na lateral do corpo do parasito. Barra de escala = 70 μ m. B e C. Região média do corpo do helminto, com detalhe para as escamas (sc). Barra de escala = 20 μ m. D. Região posterior do parasito evidenciando as escamas presentes na lateral do corpo. Barra de escala = 70 μ m.



Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar, na região ventral, que logo após a ventosa oral, as escamas não apresentam um padrão de formação, ou seja, há uma mistura de tipos de escamas, não havendo escamas de um só tipo, por fileira. Foi possível observar, no entanto, que há um predomínio de escamas bífidas, próximo à extremidade anterior do corpo, seguido de maior frequência de aparição das escamas simples, com pouquíssimas escamas trífidas como pode ser observado na (Figura 35A).

À medida que as escamas se afastam da extremidade anterior do corpo, há um aumento do número de escamas trífidas, com diminuição do número de escamas simples. Ao redor da região do acetábulo, surgem escamas com 4 e 5 divisões, mantendo escamas bífidas e trífidas, no entanto em baixíssima quantidade, ou seja, com o predomínio de escamas com 4 e 5 divisões (Figura 35B). Na extremidade posterior do corpo há grande diminuição do número de escamas, que apresentam aspecto rudimentar. Essa foi a única região onde se visualizou escamas com 7 divisões. (Figura 35C – 35D).

Os diferentes espécimes de *P. bragai* observados na microscopia eletrônica de varredura, não apresentaram um padrão na formação das escamas. Na maioria, dos espécimes analisados foi possível observar escamas simples, bífidas, trífidas, com 4 e 5 divisões e com maior concentração no terço médio do corpo. O formato da extremidade livre da lâmina também apresentou divergência, quando visualizado diferentes exemplares. Na maioria, a extremidade livre da lâmina apresentava formato curvo com leve afilamento na extremidade.

As diferenças observadas nos diferentes espécimes analisados de *P. bragai* podem estar relacionadas ao tempo de formação do parasito adulto, ou seja, parasitos adultos que se formaram recentemente e mais tardiamente. Rey (2008) afirma que o revestimento de *S. mansoni* encontra-se em um processo contínuo de renovação, já que enquanto a camada superficial se descama, uma nova camada está em formação. Característica que poderia estar ocorrendo com os adultos de *P. bragai*. Sendo assim, estudos futuros poderão demonstrar se há um padrão na formação das escamas do parasito adulto, ao analisar diferentes etapas e períodos do parasito adulto, em uma infecção experimental.

Com a técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi possível visualizar escamas, aparentemente, simples e bífida (Figura 36 A – 36C). Os demais tipos não foram observados, o que pode estar relacionado ao posicionamento do corte no bloco.

Figura 35. Escamas presentes no tegumento do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de varredura. A. Região anterior do corpo do helminto, a partir da ventosa oral (os), com detalhe para as escamas simples (ssc) que estão agrupadas por uma linha fina preta e contínua, escamas bífidas (bsc) que estão rodeadas por uma linha pontilhada branca, escamas trífidas (tsc), no tegumento (t). Barra de escala = 50 μm . B. Região do terço médio do corpo do parasito, ao redor da região do acetábulo (a), evidenciando as escamas bífidas (bsc) agrupadas por uma linha pontilhada branca, escamas trífidas (tsc) que estão rodeadas por uma linha fina branca e contínua, escamas com 4 divisões (seta branca), escamas com 5 divisões (seta preta). Barra de escala = 50 μm . C. Região posterior do corpo do helminto, com detalhe para o poro excretor (ep) e as escamas presentes na região. Barra de escala = 100 μm . D. Destaque para a presença de escama simples (ssc), bífidas (eb), com 4 divisões (seta branca) e com 7 divisões (círculo preto) da região posterior do corpo do helminto. Barra de escala = 30 μm .

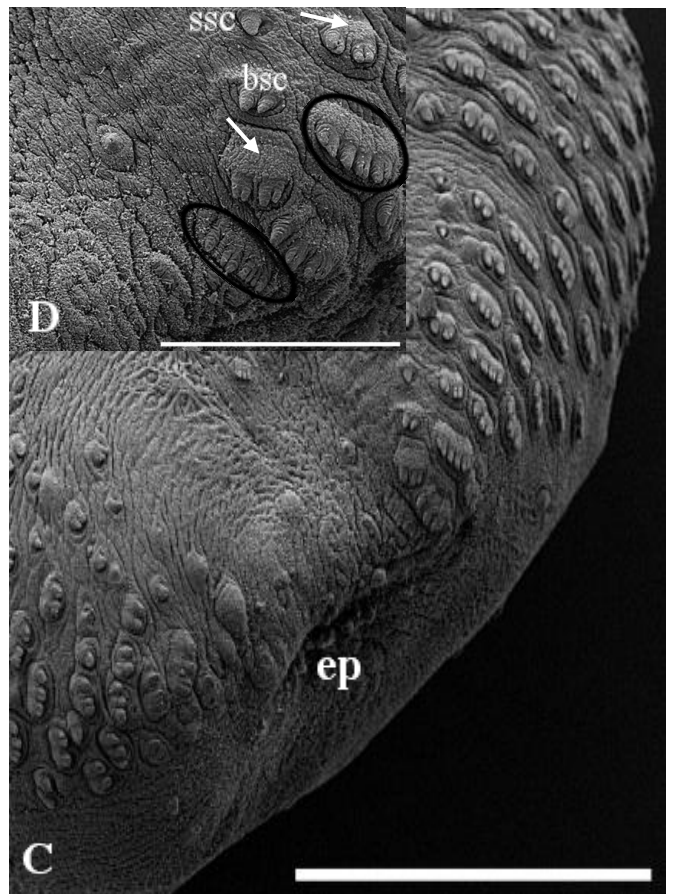
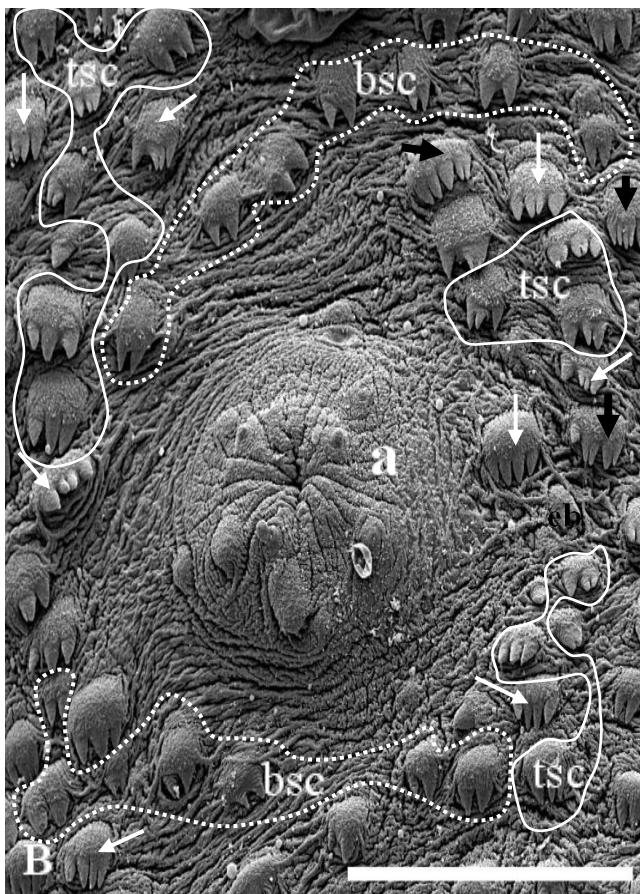
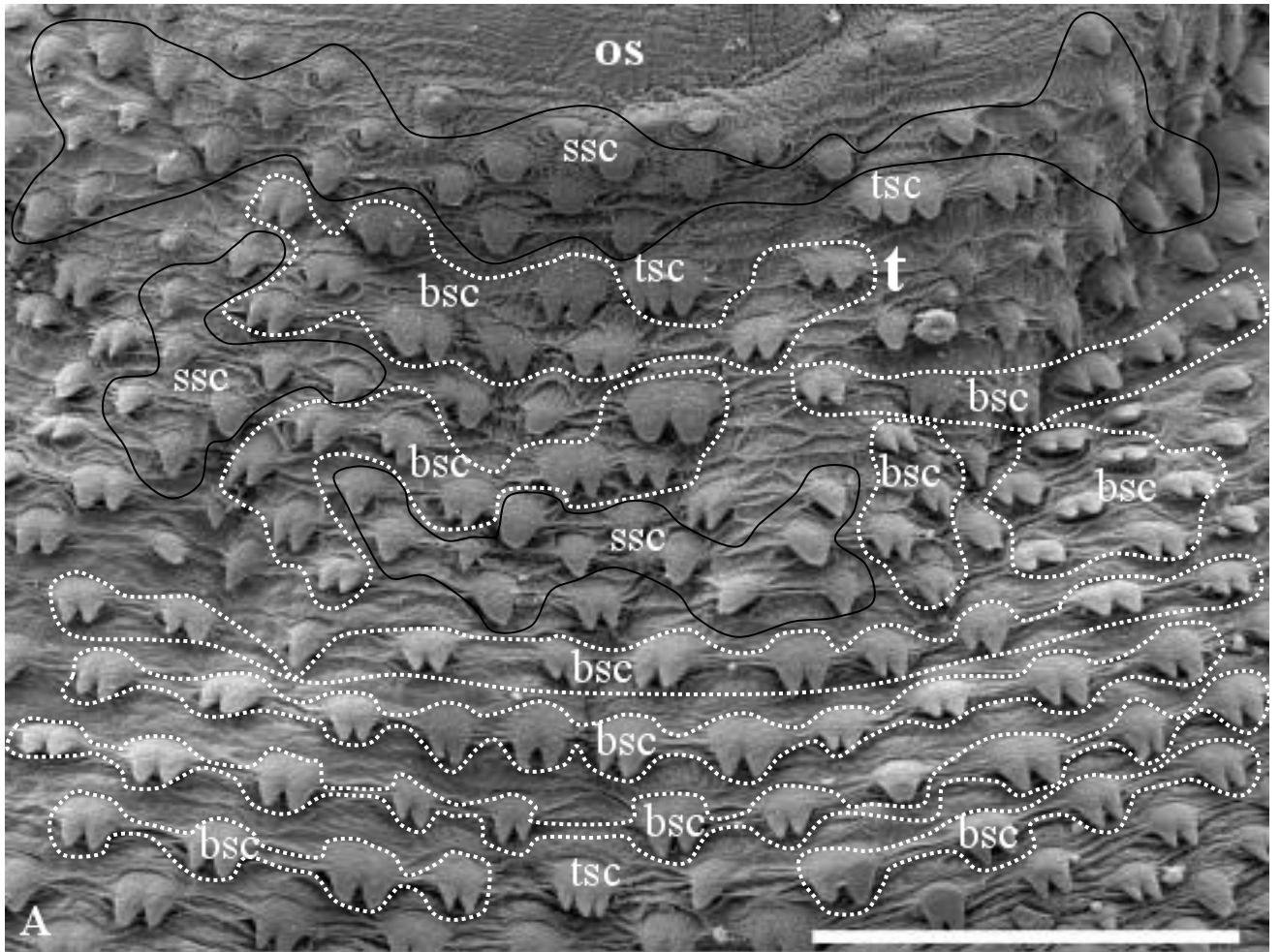
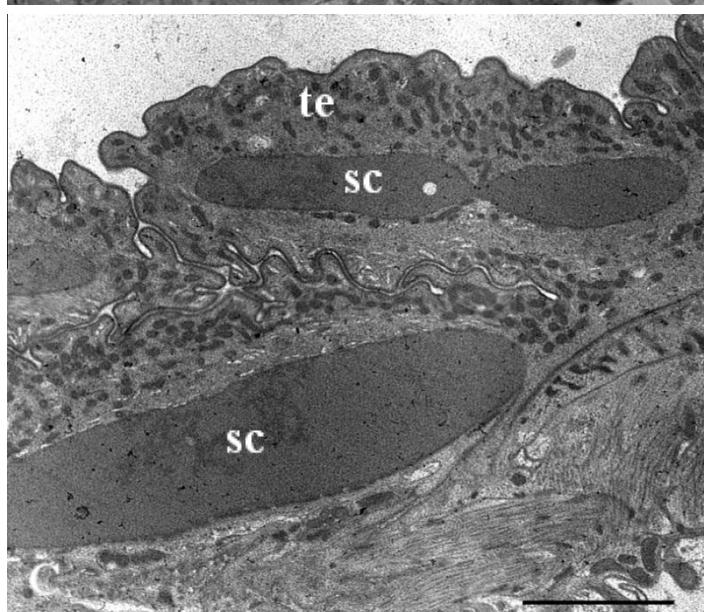
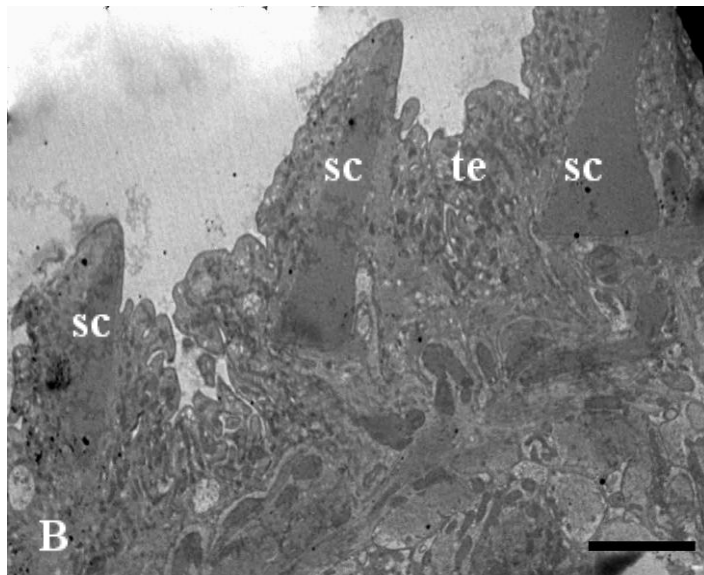
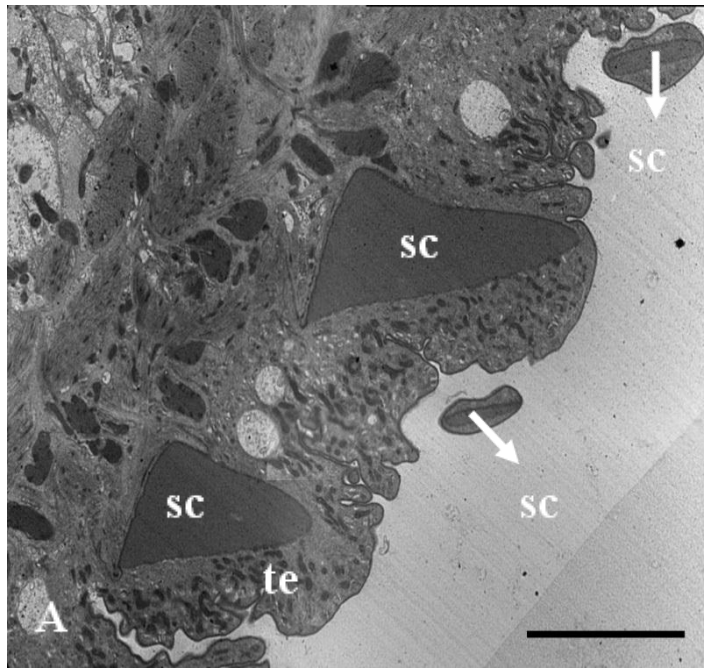


Figura 36. Escamas presentes no tegumento do estágio adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de transmissão. A, B e C. Diferentes visualizações de escamas (sc) presentes no tegumento (te). Barra de escala = 2 μm , 5 μm e 1 μm , respectivamente.



A família Eucotyliidae apresenta seu revestimento, no qual o autor denominou de cuticular, escamoso ou espinhoso. A existência de escamas é mais comum do que a presença de espinhos. O autor ressalva a importância do estudo minucioso das escamas, pois as mesmas, na lateral do corpo do parasito, simulam espinhos (FREITAS, 1951). O presente estudo ratifica Freitas (1951) quanto à simulação de espinhos na lateral do corpo do parasito, ao analisar as escamas de *P. bragai* utilizando a microscopia de luz, no entanto ao utilizar outras técnicas de microscopia, principalmente a microscopia eletrônica de varredura, confirmou-se a presença de escamas.

Freitas (1951) fez uma importante diferenciação quanto a escamas e espinhos. Escamas apresentariam uma base larga, de implantação e uma parte livre, com aspecto pectinado e os espinhos seriam cônicos e de ápice agudo. A família Eucotyliidae apresenta variações quanto à forma e dimensões das escamas, dependendo da espécie. Algumas espécies apresentam modificações à medida que se afastam da extremidade anterior do corpo, conservando, entretanto o mesmo aspecto. O presente estudo ratifica as modificações das escamas, observadas por Freitas (1951), quando se afastam da extremidade anterior do corpo de *P. bragai*. Chi et al. (1988) também, verificaram em *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912), que os espinhos, apresentam de (7 – 9) dígitos e que a quantidade de dígitos, por espinho, variam consideravelmente em diferentes porções do corpo.

Freitas (1951) considerou a presença de escamas e espinhos no revestimento do parasito, como um caráter distintivo na sistemática da família Eucotyliidae. Odening (1963) relatou a necessidade de uma análise minuciosa das escamas e dos espinhos das espécies da família Eucotyliidae, já que a maioria dos trabalhos não distingue escamas de espinhos. Freitas (1951), por exemplo, afirmou que uma das diferenças verificadas entre *T. bragai* e *T. robusta* é o aspecto das escamas.

A presença de escamas ou espinhos sem a clara distinção entre essas duas ornamentações do tegumento de *P. bragai* foi verificada na literatura, por Santos (1934) que as classificou como finas escamas quitinosas, Tubanguí e Masiluñgan (1941) e Byrd e Denton (1950) destacaram a presença de numerosos espinhos. Já Stunkard (1945) fez uma descrição mais detalhada das escamas de *T. bragai* (*P. bragai*), afirmando que as escamas apresentam uma base mais espessa e larga que a lâmina que se afila para uma ponta fina, com a denominação “escama, tipo crista”. Os desenhos do trabalho de Stunkard (1945) permitiram verificar que as escamas além de apresentarem lâmina simples, ou seja, sem a divisão, apresentavam lâminas com até 8 divisões, onde o autor afirmou serem lâminas das escamas com elementos fundidos que se distinguem na borda livre.

No presente estudo encontradas dificuldades para estabelecer a nomenclatura das ornamentações presentes no tegumento de *P. bragai*. Na microscopia eletrônica de varredura, verifica-se uma estrutura semelhante a uma escama, na qual, algumas apresentam múltiplas divisões na ponta. Já na microscopia eletrônica de transmissão, observa-se, na maioria, uma estrutura única que parece ser a base dessa escama, quando em corte transversal, assim como verificado por Chi et al. (1988) em *M. yokogawai* que apresenta espinhos de múltiplas pontas com aparência de uma grande escama, na microscopia de superfície, e na ultraestrutura, observaram que as pontas dos espinhos frequentemente eram cortados, impossibilitando a visualização das pontas, e que sua base estava localizada na membrana basal e dependendo do corte, a raiz desse espinho poderia estar nos feixes musculares.

A ornamentação de *P. bragai*, tão pouco se pode assemelhar com os tubérculos presentes em *S. mansoni*, já que na ultraestrutura, esses tubérculos são definidos como protusões do parênquima medular através da musculatura longitudinal para o interior do espaço subjacente do tegumento. E as fibras musculares circulares são deslocadas para os lados do tubérculo, que apresenta o corpo formado por processos celulares (SMITH et al., 1969).

Verifica-se assim, que ultraestruturalmente, com os trabalhos consultados na literatura, não há uma clara distinção entre escamas e espinhos, e devido à existência na literatura da nomenclatura “escama” para o tegumento de *P. bragai*, o atual estudo mantém esta designação, por verificar que não há elementos novos na ultraestrutura, para uma nova classificação da ornamentação.

O estudo mais recente sobre as escamas de *P. bragai* revelou que a sua disposição ocorre em fileiras transversais, tanto na face ventral quanto na face dorsal do corpo. As escamas estavam sempre voltadas para a extremidade posterior, com maior concentração no terço anterior da face ventral do corpo (BRANDOLINI e AMATO, 2007). Quanto ao formato, as escamas eram achatadas, e de dois tipos, a escama bífida que apresenta lâmina livre dividida em dois elementos e a escama simples que não apresenta divisão na lâmina. A escama simples apresentava 1,07 μm (0,92 a 1,57) de comprimento e a escama bífida 1,3 μm (1,05 a 1,79) de comprimento por 1,2 μm (1,08 a 1,37) de largura. A divisão na escama bífida, observada por Brandolini e Amato (2007) é a mesma verificada por Stunkard (1945), no entanto, Brandolini e Amato (2007) observaram apenas duas divisões, diferentemente de Stunkard (1945) com até oito divisões e o presente estudo com até sete divisões.

Stunkard (1945) ao utilizar o termo “elementos fundidos” sugeriu que a partir de uma lâmina simples, outros elementos vão se fundindo a ela para formar escamas com até oito elementos. Já Brandolini e Amato (2007) apresentaram o termo “divisão da lâmina”, ou seja, que a partir de uma lâmina de simples, a mesma foi se dividindo para gerar dois elementos que caracterizaria a escama bífida descrita por estas autoras. Característica ratificada no trabalho de Chi et al. (1988) que verificaram em *M. yokogawai*, a presença de espinhos, que pareciam escamas, com (7 – 9) pontas, apresentavam formato de leque sem haste, apresentando-se de maneira uniforme, com redução de tamanho ao redor da ventosa oral. Esses autores afirmaram que os espinhos são divididos igualmente por um sulco profundo originando as pontas ou dígitos, que variam consideravelmente em diferentes porções do corpo, assim como observado no presente estudo.

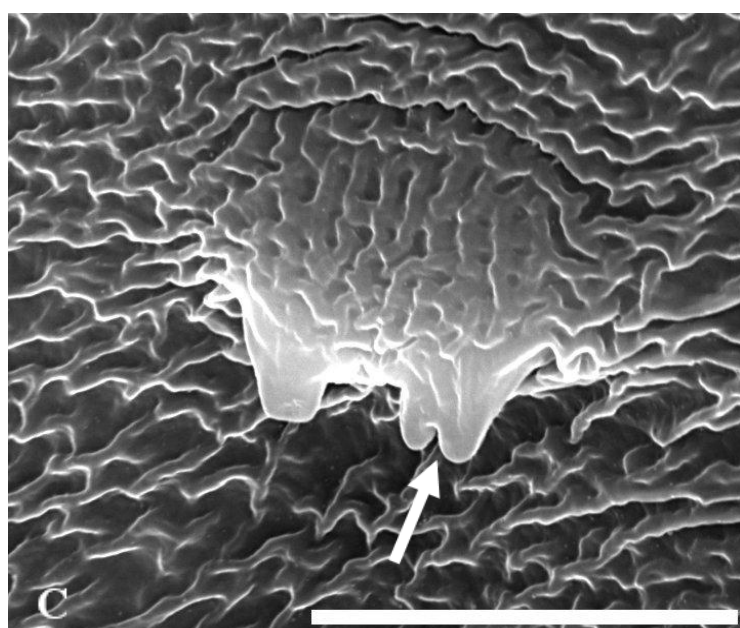
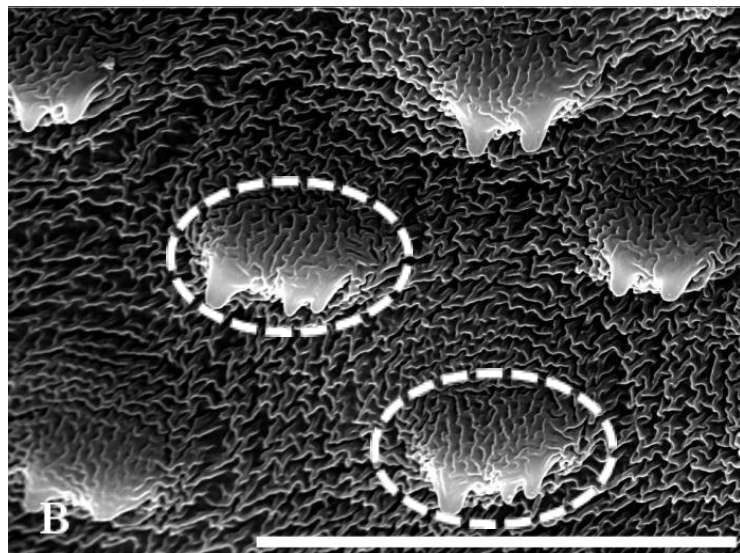
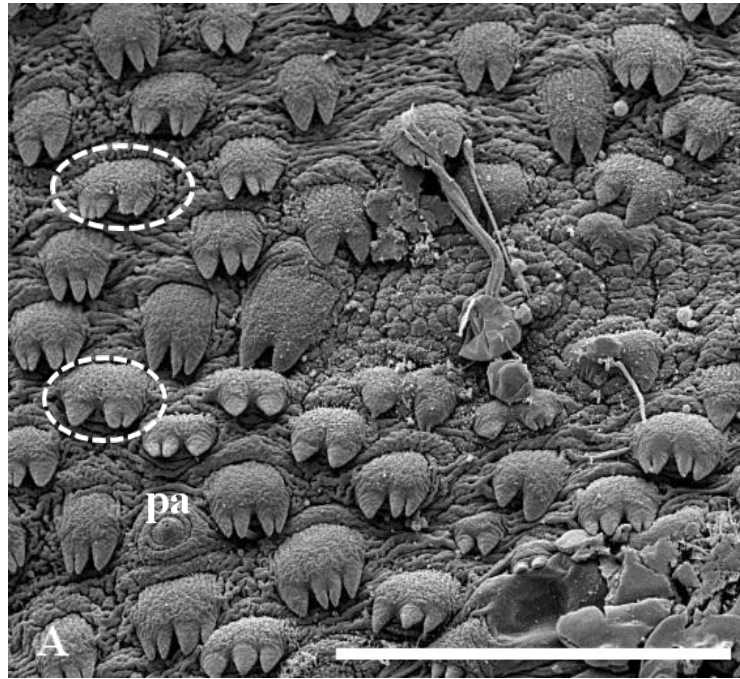
A formação das escamas de *P. bragai*, assim como são visualizadas nas regiões do corpo do helminto, anterior, acetabular e posterior, fazem com que no presente estudo se suponha que há primeiramente o surgimento de escamas simples e que a partir dessa lâmina, ocorra várias divisões para o aparecimento de escamas de até sete elementos na sua extremidade livre. Sendo assim, no presente estudo se concorda com Brandolini e Amato (2007) quanto ao termo “divisão da lâmina”.

O presente estudo propõe a teoria de que as escamas de *P. bragai* passam por um processo de divisão, pois imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura sugerem um ponto de início da divisão das escamas, ou seja, uma região que apresenta majoritariamente escamas trífidas, apresenta uma escama com lâmina com dois elementos bem definidos e um terceiro elemento, que parece estar se formando. (Figura 37A – 37C).

Entre as escamas foram observadas papilas que apresentavam diâmetro maior de $4,54 \pm 1,78 \mu\text{m}$ (2,63 – 6,48) e diâmetro menor de $3,86 \pm 1,47 \mu\text{m}$ (2,63 – 5,55) (Figura 28A).

A presença de papilas ou tubérculos no tegumento de digenéticos foi verificada na face dorsal, do macho de *S. mansoni*, posterior ao acetábulo, que são observados com menor frequência nas margens laterais e posterior da superfície dorsal. Entre os tubérculos a superfície do parasito apresenta-se de forma estriada, e entre as estrias foi observada a presença de poucos espinhos e papilas sensoriais (HOCKLEY, 1973). Semelhanças são encontradas em *S. haematobium* onde a superfície dorsal do macho, posterior à ventosa ventral, apresenta numerosos tubérculos, estes, por sua vez, tornam-se menores e em menor número na lateral e na região posterior do parasito (LEITCH et al., 1984).

Figura 37. Escamas presentes no tegumento do helminto adulto de *Paratanaisia bragai* observados através da microscopia eletrônica de varredura. A. Escamas que aparentam a divisão da lâmina (círculos tracejados em branco) e a presença de uma papila (pa) entre as escamas. Barra de escala = 40 μm . B. Escamas que aparentam a divisão da lâmina (círculos tracejados em branco). Barra de escala = 30 μm . C. Detalhe de uma escama bífida que aparenta uma divisão de sua lâmina para a formação de uma escama trifida. Barra de escala = 10 μm .



A (Tabela 9) apresenta as medidas das escamas de *P. bragai* realizadas por diferentes autores. O trabalho de Stunkard (1945) apresenta somente a medida das maiores escamas, tanto para comprimento, quanto para largura. Já Freitas (1951) apresenta desenhos de escamas com divisões de suas lâminas que variam de 3-5. O presente estudo fez um cálculo geral, não separando por divisão da lâmina. Já o trabalho de Brandolini e Amato (2007) apresenta as medições por divisão da lâmina das escamas.

Tabela 9. Medidas comparativas, em μm , das escamas presentes no tegumento de *Paratanaisisa bragai*.

	Stunkard (1945)	Freitas (1951)	Brandolini e Amato (2007)
Comprimento	10,0	11,68 \pm 2,84 (6,40 – 16,00)	Escama simples 1,07 (0,92 – 1,57)
			Escama bífida 1,3 (1,05 – 1,79)
Largura	8,0	11,87 \pm 1,42 (9,30 – 14,28)	Escama simples -
			Escama bífida 1,2 (1,08 – 1,37)

As medidas obtidas no presente estudo encontram-se na (Tabela 10), que apresenta o comprimento total das escamas, ou seja, medidas obtidas desde a base da escama fixada ao tegumento até a ponta da extremidade livre; largura total que corresponde à distância horizontal de uma extremidade a outra; comprimento da parte livre que representa a medida, da ponta livre da escama na direção vertical; e a largura da parte livre que corresponde à medida obtida da ponta livre na direção horizontal.

As escamas simples apresentam-se maiores em comprimento total e comprimento da parte livre na região anterior do corpo com 5,98 \pm 1,36 μm (2,60 – 9,89) e 3,09 \pm 0,74 μm (1,56 – 4,69), respectivamente, havendo uma diminuição em direção à extremidade posterior do corpo, com 5,48 \pm 2,04 μm (3,16 – 6,96) na região média e, 4,01 \pm 1,51 μm (2,94 – 5,07) na posterior, para comprimento total e 2,95 \pm 1,20 μm (1,58 – 3,79) região mediana e 2,92 \pm 0,04 μm (2,89 – 2,94) na região posterior, para comprimento da parte livre. As escamas simples da região mediana, apresentam-se mais largas, 4,11 \pm 0,84 μm (3,16 – 4,75) que as escamas das demais regiões, anterior com 3,97 \pm 0,94 μm (2,60 – 6,25) e posterior 3,21 \pm 1,62 μm (2,06 – 4,35). O mesmo padrão se mantém para largura livre, região mediana com 3,37 \pm 0,80 μm (2,53 – 4,11), anterior com 2,33 \pm 0,66 μm (1,04 – 5,21) e posterior 2,48 \pm 0,59 μm (2,06 – 2,89), conforme (Tabela 10).

As escamas bífidas apresentam maior comprimento total e na parte livre, na região mediana do corpo, com 6,94 \pm 1,10 μm (5,38 – 9,49) e 3,39 \pm 1,06 μm (2,21 – 6,01), respectivamente, mas são mais largas na região posterior 6,64 \pm 0,17 μm (6,52 – 6,76), na largura da parte livre são mais largas na região anterior 2,33 \pm 0,63 μm (1,55 – 5,15) (Tabela 10).

As escamas trífidas apresentam maior comprimento total na região mediana com 7,57 \pm 1,43 μm (4,43 – 9,81), no entanto, em largura total são as mais estreitas 8,09 \pm 1,62 μm (5,69 – 11,39). Observa-se que em comprimento total de todas as escamas mencionadas, as maiores medidas encontram-se na região do acetábulo, com exceção para as escamas com quatro divisões que são maiores em comprimento na região anterior do corpo, porém mais largas na região mediana. Característica que poderia auxiliar a fixação do parasito ao hospedeiro definitivo.

Foi possível verificar que não há um padrão na formação das escamas, somente afirmar que a maioria dos tipos de escamas: simples, bífidas e trífidas, apresentam-se maiores na região mediana do corpo, único local no qual foi encontrada escamas com cinco divisões, com a maior largura verificada, quando comparada com os outros tipos. A escama com sete divisões é mais larga que comprida, no entanto apresenta aspecto rudimentar, que possivelmente apresenta funcionalidade reduzida.

Wongsawad et al. (1997) observaram que os espinhos de *Stellantchasmus* sp. que se assemelham às escamas, são maiores no meio do corpo, assim como verificado pelo presente estudo, e Abdul-Salam et al. (2000) em *Stictodora fuscatum* (Onji e Nishio, 1916), que sugerem que os espinhos com multipontas, localizados na metade anterior do corpo, poderiam ajudar na fixação do trematódeo nas cristas do intestino delgado, substituindo assim, a ausência de um acetábulo adequado, assim como ocorre com *P. bragai* que apresenta acetábulo reduzido.

Tabela 10. Medidas das escamas presentes no tegumento de *Paratanaisia bragai*, observadas através da microscopia eletrônica de varredura.

()Números entre parênteses representam os valores mínimo e máximo observados. $X \pm SD$ =média \pm desvio-padrão.

Medidas das escamas de <i>Paratanaisia bragai</i> (em μm)					
Tipo de escama	Região do corpo	Comprimento total	Largura total	Comprimento parte livre	Largura parte livre
		$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$
Simples	Anterior	5,98 \pm 1,36 (2,60 – 9,89)	3,97 \pm 0,94 (2,60 – 6,25)	3,09 \pm 0,74 (1,56 – 4,69)	2,33 \pm 0,66 (1,04 – 5,21)
	Mediana	5,48 \pm 2,04 (3,16 – 6,96)	4,11 \pm 0,84 (3,16 – 4,75)	2,95 \pm 1,20 (1,58 – 3,79)	3,37 \pm 0,80 (2,53 – 4,11)
	Posterior	4,01 \pm 1,51 (2,94 – 5,07)	3,21 \pm 1,62 (2,06 – 4,35)	2,92 \pm 0,04 (2,89 – 2,94)	2,48 \pm 0,59 (2,06 – 2,89)
Bífida	Anterior	6,24 \pm 1,47 (2,58 – 9,79)	6,09 \pm 1,45 (3,61 – 10,31)	2,57 \pm 0,60 (1,03 – 3,61)	2,33 \pm 0,63 (1,55 – 5,15)
	Mediana	6,94 \pm 1,10 (5,38 – 9,49)	6,21 \pm 1,50 (3,16 – 9,49)	3,39 \pm 1,06 (2,21 – 6,01)	2,32 \pm 0,49 (1,89 – 3,48)
	Posterior	4,97 \pm 0,88 (4,35 – 5,59)	6,64 \pm 0,17 (6,52 – 6,76)	2,41 \pm 0,34 (2,17 – 2,65)	2,26 \pm 0,13 (2,17 – 2,35)
Trífida	Anterior	7,24 \pm 0,93 (5,93 – 10,16)	8,48 \pm 1,37 (5,93 – 11,02)	2,85 \pm 0,58 (1,69 – 4,24)	2,08 \pm 0,61 (0,85 – 3,39)
	Mediana	7,57 \pm 1,43 (4,43 – 9,81)	8,09 \pm 1,62 (5,69 – 11,39)	3,29 \pm 0,48 (2,53 – 4,11)	2,63 \pm 1,17 (1,26 – 6,01)
	Posterior	4,71 \pm 0,51 (4,35 – 5,07)	8,70 \pm 2,04 (7,25 – 10,14)	3,62 \pm 1,03 (2,89 – 4,35)	2,53 \pm 0,51 (2,17 – 2,89)
4 divisões	Anterior	6,36 \pm 0,49 (5,93 – 6,78)	9,11 \pm 1,27 (8,47 – 11,02)	2,33 \pm 0,42 (1,69 – 2,54)	1,27 \pm 0,48 (0,85 – 1,69)
	Mediana	6,17 \pm 1,18 (4,43 – 7,91)	9,16 \pm 1,33 (7,49 – 11,06)	2,79 \pm 0,47 (1,89 – 3,16)	2,05 \pm 0,84 (0,95 – 3,48)
	Posterior	7,21 \pm 2,71 (9,12 – 5,29)	8,53 \pm 1,67 (9,71 – 7,35)	2,50 \pm 1,04 (3,23 – 1,76)	1,33 \pm 0,21 (1,47 – 1,18)
5 divisões	Anterior	-	-	-	-
	Mediana	4,83 \pm 2,57 (3,01 – 6,64)	10,76 \pm 1,79 (9,49 – 12,02)	3,01 \pm 0,22 (2,85 – 3,16)	2,06 \pm 0,67 (1,58 – 2,53)
	Posterior	-	-	-	-
7 divisões	Anterior	-	-	-	-
	Mediana	-	-	-	-
	Posterior	6,32 \pm 0,62 (5,88 – 6,76)	10,59 \pm 0,83 (10,00 – 11,18)	3,09 \pm 0,21 (2,94 – 3,23)	1,77 \pm 0,42 (1,77 – 2,06)

Os espinhos presentes no tegumento do parasito adulto de *S. mansoni* são basicamente os mesmos presentes nas cercárias e nas formas jovens, excetuando-se pelo comprimento, que nos adultos são maiores. As pontas afiadas dos espinhos projetam-se além do tegumento, e são extremamente eletro-densos (THREADGOLD, 1963; HOCKLEY, 1973). Esses autores, não observaram diferenças da estrutura dos espinhos entre os estágios evolutivos.

A estrutura dos espinhos dos adultos de *S. mansoni* aparenta ser uma rede cristalina, a mesma estrutura encontrada nas cercárias (HOCKLEY, 1973).

O presente estudo, no entanto, não verificou a semelhança das escamas presentes nas cercárias com as do parasito adulto. A visualização das cercárias na microscopia eletrônica de varredura possibilitou a observação de estruturas, localizada próximo à região do acetábulo, que possivelmente poderiam dar origem as escamas, no entanto estruturas estas, observadas somente em um espécime de cercária. . Essa divergência pode estar relacionada à análise de diferentes espécies.

De acordo com Hockley (1973) espinhos e escamas, quando presentes em outros digenéticos, possivelmente apresentaram a estrutura de rede cristalina. Assim como demonstraram Morris e Threadgold (1968) estudando *S. mansoni*, Sobhon et al. (2000) com *F. gigantica* e Leitch et al. (1984) com *S. haematobium*. Os espinhos dos adultos de *S. mansoni* foram descritos como flexíveis. Observou-se que o macho quando em contato com a fêmea, apresentava os espinhos dobrados, quando normalmente encontrava-se em linha reta (MORRIS e THREADGOLD, 1968). Já Hockley (1970) in Hockley (1973) verificou que os parasitos de *S. mansoni* presentes nos vasos sanguíneos apresentavam os espinhos em linha reta e profundamente enraizados nas células endoteliais. Caso os espinhos se dobrassem, não causariam danos às células endoteliais. No entanto, Hockley (1970) in Hockley (1973) encontrou um pequeno corpo denso entre os espinhos e a membrana basal, de *S. mansoni*, o que poderia representar uma ligação com a membrana, o que poderia permitir a movimentação do espinho no tegumento.

No presente estudo não foram visualizadas escamas dobradas sobre o tegumento de *P. bragai* sendo assim, não se pode afirmar se há ou não flexibilidade nas escamas de *P. bragai*.

5 CONCLUSÕES

- *Paratanaisia bragai* provoca metaplasia do epitélio cúbico simples da parede do túbulo coletor do hospedeiro, alterando-o para pseudoestratificado, o que poderia auxiliar, juntamente com a dilatação do tubo coletor, a eliminação dos ovos.
- A microscopia de luz permitiu aferir os dados morfométricos, morfológicos, taxonômicos e diagnósticos importantes de *P. bragai* como o formato dos ovos, do miracídio, das cercárias, das metacercárias e a extensão das glândulas vitelogênicas nos adultos.
- A microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta importante na análise morfológica detalhada de *P. bragai* e permitiu caracterizar pela primeira vez estruturas, como a casca dos ovos e o nó presente na região abopercular, que possivelmente representa o ponto de inserção do ovo no oótipo; caracterizar as cercárias; e a grande diversidade de tipos de escamas no tegumento do parasito adulto que contribuem na análise taxonômica deste helminto.
- Este estudo apresenta o primeiro registro por microscopia eletrônica de transmissão do miracídio de *P. bragai*, evidenciando a presença dos cílios e região da papila apical, importante para a penetração da larva no molusco.
- As cercárias apresentam uma estrutura semelhante à cauda rudimentar, característica importante para a classificação do tipo cercariano.
- As metacercárias apresentam três camadas de espessuras diferentes, o que é importante para esclarecer a resistência das metacercárias tanto à fatores intrínsecos quanto a fatores extrínsecos.
- A estrutura em eversão através do poro genital, no parasito adulto de *P. bragai*, representa o cirro em forma de roseta.
- O presente estudo é o pioneiro na classificação das células do ovário e vitelário de *P. bragai*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-SALAM, A.; NAIR, S. B.; ASHKANANI, H. Surface ultrastructure of *Stictodora fuscatum* (Trematoda: Heterophyidae) from Kuwait Bay. **Parasitología al día**, v. 24, n. 1-2, p. 55-59. 2000.
- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**: Parasitoses. 3 ed., Washington: Pan American Health Organization. 2003, 424 p. vol. III (Scientific and Technical Publication No. 580).
- ALICATA, J. E. Parasites and parasitic diseases of domestic animals in the Hawaiian Islands. **Pacific Science**, v. 1, n. 2, p. 69-84. 1947.
- ALICATA, J. E. Parasitic infections of man and animals in Hawaii. **Agricultural Experiment Station University of Hawaii Technology Bulletin**, v. 61, p. 1-138. 1964.
- ALMEIDA, M. M. de.; BESSA, E. C. de. A. Estudo do crescimento e da reprodução de *Leptinaria unilamellata* (D'orbigny) (Mollusca, Subulinidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 4, p. 1107-1113. 2001
- ALMEIDA, M. N. de.; MOTA, G. G. Ecologia, reprodução e crescimento da concha de *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny) (Pulmonata, Subulinidae) em condições naturais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 23-28. 2011.
- AMATO, J. F. R.; BOEGER, W. A.; AMATO, S. B. 1991. **Protocolos para laboratório – Coleta e processamento de parasitos do pescado**. Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil, 81p.
- ARAÚJO, J. L. **Alguns moluscos terrestres como hospedeiro intermediário de parasitos de animais domésticos no Brasil: estudos sobre a anatomia, sistemática e participação em helmintoses**. 1982. 104p. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro.
- ARNIZAULT, L. B.; HAYES, L.; OLSEN, G. H.; TORRES, J. S.; RUIZ, C.; PÉREZ-RIVERA, R. An epizootic of *Tanaisia bragai* in a captive population of Puerto Rico plain pigeon (*Columba inornata wetmorei*). **Annals New York Academy of Science**, v. 653, p. 202-205, 1992.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and Practice of Histological Techniques**. New York, Churchill Livingstone, 766p.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos em Malacologia Médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. 314p.
- BARRETTO, J. F.; MIES FILHO, A. M. Primeiras observações sobre a presença de “*Tamerlanea bragai*” (Prof. Violantino Santos, 1934) nos rins de *Meleagris gallopavo domestica*. **Serviço de Informação Agrícola, Ministério da agricultura, Departamento Nacional de Produção Animal, Instituto de Biologia Animal**, Rio de Janeiro, 3p, 1942.

- BASCH, P. F.; BASCH, N. *Schistosoma mansoni*: scanning electron microscopy of schistosomula, adults and eggs grown *in vitro*. **Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 333-338. 1982.
- BESSA, E. C. de. A.; ARAÚJO, J. L. de. B. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Breguière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 647-654. 1995a.
- BESSA, E. C. de. A.; ARAÚJO, J. L. de. Ocorrência de autofecundação em *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 719-723. 1995b.
- BESSA, E. C. de. A.; LIMA, W. dos. S.; CURY, M. C.; ARAÚJO, J. L. de. B. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensnky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 29-41. 2000.
- BJÖRKMAN, N.; THORSELL, W. On the ultrastructure of the ovary of the liver fluke (*Fasciola hepatica* L.) **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 63, p. 538-549. 1964.
- BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8 ed. São Paulo: Manole, 2006. 422p.
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B.; PEREIRA, A. de. A. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais. **Parasitologia al dia**, v. 21, n. 3-4, p. 109-113. 1997.
- BRANDOLINI, S. V. P. B. **Biologia de *Tanaisia (Paratanaisia) bragai* (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae)**. 2000. 100f. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1097-1100. 2006.
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Morfologia externa de espécimes adultos de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Digenea: Eucotylidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 129-132, 2007.
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; GOMES, A. P. da. S. Influência de diferentes dietas sobre o crescimento, sobrevivência e reprodução de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zociências**, v. 4, n. 2, p. 169-177. 2002.
- BRENER, B.; TORTELLY, R.; MENEZES, R. C.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M. Prevalence and pathology of the nematode *Heterakis gallinarum*, the trematode *Paratanaisia bragai*, and the protozoan *Histomonas meleagridis* in the turkey, *Meleagris gallopavo*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 677-681, 2006.

BYRD, E. E.; DENTON, J. F. The helminth parasites of birds. I. A review of the trematode genus *Tanaisia* Skrjabin, 1924. **The American Midland Naturalist**, v. 43, n. 1, p. 32-57. 1950.

CALDEIRA, R. L.; MENDONÇA, C. L. G. F.; GOVEIA, C. O.; LENZI, H. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W. S.; MOTA, E. M.; PECORA, I. L.; MEDEIROS, A. M. Z. de.; CARVALHO, O. dos. S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889. 2007.

CARNEIRO, J. R.; LUSTOSA, E. S.; PEREIRA, E.; CARVALHO, E. D.; NÁPOLI, M. A. Incidência de ecto e endoparasitos de pombos (*Columbia livia domestica*) em Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 4, n. 1, p. 39-41. 1975.

CHARNI, M.; AMMAR, A. B.; JAAFOURA, M. H.; ZGHAL, F.; TEKAYA, S. Ultrastructure of germaria and vitellaria in *Dugesia sicula* Lepori, 1948 (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). **Belgian Journal of Zoology**, v. 140 (Suppl.), p. 111-118. 2010.

CHI, J. G.; KIM, C. W.; KIM, J. R.; HONG, S. T.; LEE, S. H. Intestinal Pathology in Human Metagonimiasis with Ultrastructural Observations of Parasites. **Journal of Korean Medical Science**, v. 3, n. 4, p. 171-177. 1988.

CHOI, M. KIM, S. H.; CHUNG, J.; JANG, H.; EOM, J.; CHUNG, B.; SOHN, W.; CHAI, J.; HONG, S. Morphological observations of *Echinochasmus japonicus* cercariae and the in vitro maintenance of its life cycle from cercariae to adults. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 236 – 241. 2006.

CIFRIAN, B.; MARTINEZ-ALOS, S.; GREMIGNI, V. Ultrastructural and cytochemical studies on the germarium of *Dicrocoelium dendriticum* (Plathelminthes, Digenea). **Zoomorphology**, v. 113, p. 165-171. 1993.

COHEN, C.; REINHARDT, B.; CASTELLANI, L.; NORTON, P.; STIREWALT, M. Schistosome Surface Spines Are "Crystals" of Actin. **The Journal of Cell Biology**, v.95, n. 3, p. 987-988. 1982.

COUSIN, C.; DORSEY, C.; KENNEDY, V.; OFORI, K. Ultrastructure of the ventral sucker of *Schistosoma mansoni* cercaria. **Journal of morphology**, v. 223, p. 215-223. 1995.

D'ÁVILA, S. de. O. P. **Helmintofauna de *Columba livia* (Aves, Columbidae), no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil: Aspectos da ecologia, morfologia e sistemática.** 2007. 146f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Área de concentração: Parasitologia Veterinária) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

D'ÁVILA, S.; BESSA, E. C. de. A. Influência do substrato sobre a reprodução de *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 1, p. 197-204. 2005a.

D'ÁVILA, S.; BESSA, E. C. de. A. Influência de diferentes substratos e umidade sobre o crescimento e o número de ovos produzidos por *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca,

Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 2, p. 349-353. 2005b.

D'ÁVILA, S.; DIAS, R. J. P.; BESSA, E. C. de. A.; DAEMON, E. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 6, n. 1, p. 115-127. 2004.

D'ÁVILA, S.; MANSO, P. P. de. A.; BESSA, E. C. de. A. RODRIGUES, M. L. A.; DIAS, R. J. P. Gross anatomy of the musculature and a new description of the reproductive system of *Tanaisia bragai* and *Tanaisia inopina* (Trematoda: Eucotylidae) analysed by confocal laser scanning microscopy. **Acta Zoologica (Stockholm)**, v. 91, p. 139-149. 2010.

DE CARLI, G. A. **Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas. Métodos e Técnicas**. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1994. 315p.

DE SOUZA, W. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicada às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007. 357p.

DIAS, R. J. P.; BESSA, E. C. de. A. D'ÁVILA, S. Influence on Substrate Humidity on Desiccation Resistance Capacity in *Subulina octona* (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 137-139. 2007.

DISCOVER LIFE. Map of *Leptinaria unilamellata*. Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Leptinaria+unilamellata>>. Acesso em: 31 Jul. 2014.

DISCOVER LIFE. Map of *Subulina octona*. Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Subulina+octona>>. Acesso em: 31 Jul. 2014.

DIXON, K. E. The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. **Parasitology**, v. 55, n. 2, p. 215-226. 1965.

DIXON, K. E. The structure and composition of the cyst wall of the metacercaria of *Cloacitrema narrabeenensis* (Howell e Bearup, 1967) (Digenea: Philophthalmidae). **International Journal for Parasitology**, v. 5, n. 1, p. 113-118. 1975.

DIXON, K. E. The biological significance of the tegument in digenetic trematodes. **The Rice University Studies**, v. 62, n.4, p. 69-80. 1976.

DIXON, K. E.; MERCER, E. H. The fine structure of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 105, p. 385-389. 1964.

DIXON, K. E.; MERCER, E. H. The formation of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 77, n. 3, p. 345-360. 1967.

DOLLFUS, R. –Ph. Sur um distome du genre *Tamerlania* K. I. Skrjabin 1924 avec un catalogue des trématodes des reins d'oiseaux. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 21, n. ½. P. 25-73. 1946,

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

DUARTE, M. J. de. F. **O ciclo evolutivo de *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923, no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Trematoda, Brachylaemidae)**. 1977. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

DUTRA, A. V. C. Aspectos da ecologia e da reprodução de *Leptinaria unilamellata* (Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 4, p. 581-591. 1988.

EHLERS, U. Phylogenetic relationship within the Platyhelminthes. In: MORRIS, S. C.; GEORGE, J. D.; GIBSON, R.; PLATT, H. M. (eds.). **The Origins and relationships of lower invertebrates**. Oxford University Press, Oxford, USA. 1985. p. 143-158.

EKLU-NATEY, D. T.; WÜEST, J.; SWIDERSKI, Z.; STRIEBEL, H. P.; HUGGEL, H. Comparative scanning electron microscope (SEM) study of miracidia of four human schistosome species. **International Journal for Parasitology**, v. 15, n. 1, p. 33-42. 1985.

FEDYNICH, A. M.; PENCE, D. B.; BERGAN, J. F. Helminth community structure and pattern in sympatric populations of black-bellied and fulvous whistling-ducks. **Canadian Journal of Zoology**, v. 74, n. 2219-2225, 1996.

FORD, J. W.; BLANKESPOOR, H. D. Scanning electron microscopy of the eggs of three human schistosomes. **International Journal for Parasitology**, v. 9, n. 2, p. 141-145. 1979.

FRANCISCO, C. J.; HERMIDA, M. A.; SANTOS, M. J. *Proisorhynchus crucibulum* (digenea: bucephalidae) miracidium morphology and its passive transmission pattern. **Parasite**, v. 19, n. 3, p. 277-280. 2012.

FRANCO, S. R. N. de. S. Nota sobre trematódeos eucotilídeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 63, p. 59-65. 1965.

FRANCO-ACUÑA, D. **Morfologia dos Ovos e Estágios Larvais de *Eurytrema coelomaticum* (Giard e Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) e Análise Bioquímica da Interface Parasito-Primeiro Hospedeiro Intermediário, *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Gastropoda, Xanthonychidae)**. 2011. 132f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Área de concentração: Parasitologia Veterinária) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

FREITAS, J. F. T. de. Revisão da família Eucotylidae Skrajabin, 1924 (Trematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 49, p. 33-123. 1951.

FREITAS, J. F. T. de. Nota sobre *Tanaisia inopina* Freitas, 1951 (Trematoda, Eucotylidae). **Atas da Sociedade de Biologia, Rio de Janeiro**, v. 3, n. 6, p. 2-4. 1959.

FREITAS, M. G.; HIPÓLITO, O. Notas de helmintologia de *Gallus gallus domesticus* em Minas Gerais. In: Congresso de Veterinária II, Belo horizonte, 1943. **Anais**, p. 111-121.

- FRIED, B. Metacercarial Excystment of Trematodes. **Advances in Parasitology**, v. 33, p; 91-144. 1994.
- FUJINO, T.; NAKANO, T.; WASHIOKA, H.; TONOSAKI, A.; ICHIKAWA, H. FRIED, B. Comparative ultrastructure of eggs in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni*, and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 86, p. 427-430, 2000.
- GIBSON, D. I. Class Trematoda Rudolphi, 1808. In: GIBSON, D. J.; BRAY, R. A.; JONES, A. (Eds). **Keys to the trematoda**. Wallingford: CAB International, v. 1, 2002. p. 1-3.
- GIBSON, D. I. Family Rencolidae Dollfus, 1939. In: BRAY, R. A.; GIBSON, D. J.; JONES, A. (Eds). **Keys to the trematoda**. Wallingford: CAB International, v. 3, 2008. p. 591-594.
- GOMES, D. C.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R.; PINTO, R. M. Pathology and first occurrence of the kidney trematode *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea: Eucotylidae) in *Phasianus colchicus* L., 1758, from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 285-288, 2005.
- GREANI, S.; QUILICHINI, Y.; FOATA, J.; SWIDERSKI, Z.; MARCHAND, B. Ultrastructural study of vitellogenesis and oogenesis of *Metadena depressa* (Stossich, 1883) Linton, 1910 (Digenea, Cryptogonimidae), intestinal parasite of *Dentex dentex* (Pisces, Teleostei). **Comptes Rendus Biologies**, v. 335, p. 657-667. 2012.
- GREMIGNI, V.; FALLENI, A. Characters of the female gonad and the phylogeny of Platyhelminthes. **Hydrobiologia**, v. 383, p. 235-242. 1998.
- GULKA, G. J.; FRIED, B. Histochemical and ultrastructural studies on the metacercarial cyst of *Echinostoma revolutum* (Trematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 9, n. 1, p. 57-59. 1979.
- HALTON, D. W. Observations on the nutrition of digenetic trematodes. **Parasitology**, v. 57, n. 4, p. 639-660. 1967.
- HALTON, D. W. Nutritional adaptations to parasitism within the Platyhelminthes. **International journal of Parasitology**, v. 27, n. 6, p. 693-704. 1997.
- HAN-MIN, C.; YUN-FANG, W.; SO, L. A study of ultrastructure of egg shell of *Schistosoma japonicum*. I. Transmission Electron Microscopic Observations of *S. japonicum*, Egg. **Annales de Parasitologie**, v. 57, n. 4. p. 345-352. 1982.
- HERTEL, L. Excretion and Osmoregulation in the Flatworms. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 112, n. 1, p. 10-17. 1993.
- HOCKLEY, D. J. Ultrastructure of the Tegument of *Schistosoma*. **Advances in Parasitology**, v. 11, p. 233-305. 1973.
- HUFFMAN, J. E. Structure and composition of the metacercarial cyst wall of *Sphaeridiotrema globulus* (Trematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 16, n. 6, p. 647-653. 1986.

- HUFFMAN, J. E. Trematode. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. Blackwell Publishing, 2008. p. 225-245.
- IRWIN, S. W. R.; THREADGOLD, L. T. Electron-microscope studies on *Fasciola hepatica*. VIII. The development of the the vitelline cells. **Experimental Parasitology**, v. 28, p. 399-411. 1970.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1995. 443p
- KANEV, I.; RADEV, V.; FRIED, B. Family Eucotylidae Cohn, 1904. In: GIBSON, D. J.; BRAY, R. A.; JONES, A. (Eds). **Keys to the trematoda**. Wallingford: CAB International, v. 1, 2002. p. 147-152.
- KELLER, G. G.; ARAÚJO, J. L. de. B. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) como novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 89-92, 1992.
- KING, P. H.; VAN AS, J. G. Cercariae shed by *Bulinus tropicus* (Krauss, 1848) in the Free State, South Africa. **African Zoology**, v. 36, n. 1, p. 95-105. 2001.
- KUMAR, B. M.; TAIBUR, R.; SUSHANTA, G.; SAIDUL, I. On the incidence and pathology of *Paratanaisia bragai* dos Santos, 1934 (Freitas, 1959) infection in domestic pigeon (*Columba livia*). **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 159-161, 2009.
- KREJCI, K. G.; FRIED, B. Light and scanning electron microscopic observations of the eggs, daughter rediae, cercariae, and encysted metacercariae of *Echinostoma trivolvis* and *E. caproni*. **Parasitology Research**, v. 80, p. 42-47, 1994.
- LEE, D. L. The structure of the helminth cuticle. **Advances in Parasitology**, v. 10, p. 347-379. 1972.
- LEITCH, B.; PROBERT, A. J.; RUNHAM, N. W. The ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma haematobium*. **Parasitology**, v. 89, p. 71-78. 1984.
- LOVERDE, P. T. Scanning electron microscope observations on the miracidium of *Schistosoma*. **International Journal for Parasitology**, v. 5, n. 1, P. 95-97. 1975.
- LUNA, L. G. **Manual oh Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. McGraw-Hill Book Inc., New York, NY, USA. 1968. 258p.
- LUPPI, M. M.; MELO, A. L. de.; MOTTA, R. O. C.; MALTA, M. C. C.; GARDINER, C. H.; SANTOS, R. L. Granulomatous nephritis in psittacines associated with parasitism by the trematode *Paratanaisia* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 363-366, 2007.
- MALDONADO, J. F. A note on the life cycle of *Tamerlania bragai* Santos, 1934 (Trematoda: Eucotylidae). **Journal of Parasitology**, v. 29, p. 424. 1943.
- MALDONADO, J. F. The life cycle of *Tamerlania bragai*, Santos, 1934 (Eucotylidae), a kidney fluke of domestic pigeons. **Journal of Parasitology**, v. 31, p. 306-314. 1945a.

- MALDONADO, J. F. Ciclo vital e biologia del *Platynosomum fastosum* Kossak, 1910 (Trematoda: Dicrocoelidae). **The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 21, n. 1, p. 40-60. 1945b.
- MALDONADO, J. F.; HOFFMAN, W. A. *Tamerlania bragai*, a parasite of pigeons in Puerto Rico. **Journal of Parasitology**, v. 24. P. 91. 1941.
- MARCUS, E.; MARCUS, E. Über einige Subulinidae (Pulmonata von São Paulo). **Beiträge zur Neotropischen Fauna**, v. 5, n. 3, p. 186-208. 1968.
- MENEZES, R. C.; MATTOS JR. D. G.; TORTELLY, R.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M.; GOMES, D. C. Trematodes of free range reared guinea fowls (*Numida meleagris* Linnaeus, 1758) in state os Rio de Janeiro, Brazil: morfology and pathology. **Avian Pathology**, v. 30, p. 209-214, 2001.
- MOEMA, E. B. E.; KING, P. H.; BAKER, C. Cercariae developing in *Lymnaea natalensis* Krauss, 1848 collected in the vicinity of Pretoria, Gauteng Province, South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 3, p. 215-223. 2008.
- MORRIS, G. P.; THREADGOLD, L. T. Ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 15-27. 1968.
- NAEM, S.; BUDKE, C. M.; CRAIG, T. M. Morphological characterization of adult *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): first SEM report. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 971-978. 2012.
- NEILL, P. J. G.; SMITH, J. H.; DOUGHTY, B. L.; KEMP, M. The ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* egg. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, n. 1, p. 52-65. 1988.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. 494p.
- ODENING, K. Zwei neue nierentrematoden der unterordnung Eucotylata (Digenea, Sporocystoinei) aus singvögeln Brasiliens und Vietnams. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 23, p. 491-503. 1963.
- OLSON, P. H.; CRIBB, T. H.; TKACH, V. V.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Playyhelminthes: Trematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 33, 7, p. 733-755. 2003.
- PAN SC. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. **Jounal of Invertebrate Pathology**, v.36, n. 3, p. 307-372. 1980.
- PAPPAS, P. W. The relative roles of the intestines and external surfaces in the nutrition of monogeneans, digeneans and nematodes. **Parasitology**, v. 96, suppl. 1, S.105-S.121. 1988.
- PEREIRA, A. S. A.; CAVALCANTI, N. L.; NASCIMENTO, G. A. F.; NASCIMENTO-SILVA, J. L. G.; PADILHA, R. J. R.; VIEGAS, L. F. W.; ALVES, L. V.; LIMA-FILHO, J. L.; CHAVES, M. E. C. Morphological and morphometric study of cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni* (SLM strain) isolated from infected mice. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1087-1096. 2013.

- PINHEIRO, J.; FRANCO-ACUÑA, D. O.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; BRANDOLINI, S. V. P. B.; DAMATTA, R. A.; DE SOUZA, W. New insight into the morphology of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae) cercariae by light, scanning, and transmission electron microscopies. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1437-1445. 2012.
- PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; LANFREDI, R. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 265-275. 2004.
- PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Ultrastructure of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 97, n. 5, p. 367-372. 2005.
- PINTO, C.; ALMEIDA, J. L. de. Sinopse dos helmintos dos animais domésticos do Brasil. **O campo**, v. 6, n. 8, p. 54-63. 1935.
- PINTO, H. A.; MELO, A. L. de. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: Panorama e perspectivas após um século de estudos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 4, p. 369-386. 2013a.
- PINTO, H. A.; MELO, A. L. de. A checklist of cercariae (Trematoda: Digenea) in molluscs from Brazil. **Zootaxa**, v. 3666, n. 4, p.449-475. 2013b.
- PINTO, R. M.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R. Systematic and pathology study of *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) infestation in ruddy ground dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1811). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.4, p. 472-479, 2004.
- PODDUBNAYA, L. G.; BRUÑANSKÁ, M.; ŚWIDERSKI, Z.; GIBSON, D. I. Ultrastructural of the vitellarium in the digeneans *Phyllodistomum angulatum* (Plagiorchiida, Gorgoderidae) and *Azygia lucii* (Strigeida, Azygiidae). **Acta Parasitologica**, v. 57, n. 3, p. 235-246. 2012.
- PORTUGAL, M. A.; OLIVEIRA, G. F.; FENERICH, F. L.; CAPPELARO, C. E. M. P. M.; CHIARELLI, V. Ocorrência de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Trematoda Eucotylidae), em pomba doméstica (*Columbia livia domestica*). **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 39, n. 3, p. 189-194, 1972.
- RACE, G. J.; MARTIN, J. H.; MOORE, D. V.; LARSH, J. E. JR. Scanning and transmission electronmicroscopy of *Schistosoma mansoni* eggs, cercariae, and adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, n. 6, p. 914-924. 1971.
- REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2008. 883p.
- ROBERTS, L. S., JANOVY, Jr, J. **Foundations of Parasitology**, 8th Ed. McGraw-Hill, Dubuque, IA. 701p. 2009.
- ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia, Texto e Atlas**. 2ª ed. Panamericana, São Paulo, 1993.779pp.

- RUPPERT, E. E; FOX, R. S; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem Funcional-evolutiva**. 7e. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.
- SAKAMOTO, K.; ISHII, V. Fine structure of schistosome eggs as seen through the scanning electron microscope. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25, n. 5, p. 841-844.1978.
- SAMPOUR, M. The study of vitelline gland of *Haploporus lateralis* (Digenea: Trematoda). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 113-117. 2008.
- SANTOS, K. R.; MARTINS, R. R.; PEREZ, R. R.; TAKAHIRA, R. K.; DILVA, R. J. da. Determinação da concentração de ácido úrico em pombos, *Columba livia* (Aves, Columbidae), naturalmente infectados por *Paratanaisia bragai* (Trematoda, Eucotylidae). In: VII Congresso e XII Encontro da ABRAVAS, São Pedro. **Anais**, São Paulo, 2003. p. 69.
- SANTOS, S. B. dos.; MONTEIRO, D. P. Composição de gastrópodes terrestres em duas áreas do Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentado (CEADS), Vila Dois Rios, Ilha Grande. Rio de Janeiro, Brasil – um estudo-piloto. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, supl. 1, p. 181-190. 2001.
- SANTOS, V. dos. Monostomose renal de aves doméstica. **Revista do Departamento Nacional da Produção Animal**, v. 1, n.1, p. 203-215, 1934.
- SENF, A. W.; PHILPOTT, E.; PELOFSKY, H. Electron microscope observations of the integument, flame cells, and gut of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 217-229. 1961.
- SEBELOVÁ, S.; STEWART, M, T.; MOUSLEY, A.; FRIED, B.; MARKS, N. J.; HALTON, D. W. The musculature and associated innervation of adult and intramolluscan stages of *Echinostoma caproni* (Trematoda) visualized by confocal microscopy. **Parasitology Research**, v. 93, p. 196-206. 2004.
- SILVA, C. C. da.; MATTOS JÚNIOR, D. G. de.; RAMIRES, P. M. Helminths parasitas de *Columba livia* (Gm) no Município de São Gonçalo, Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 5, p. 391-394, 1990.
- SILVA, M. E.M.; MATTOS JÚNIOR, D de.; TORTELLY, R.; MENEZES, R. C. Lesões causadas por alguns helmintos em galinhas-d'angola (*Numida meleagris*, L.) procedentes do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 12, n. 1-3, p. 118-123, 2005.
- SMITH, J. D. A Technique for the Histochemical Demonstration of Polyphenol Oxidase and its application to Egg-shell Formation in Helminths and Byssus Formation in *Mytilus*. **Quarterly Journal Of Microscopical Science**, v. 95, part 2, p. 139-152. 1954.
- SMITH, J. D. Studies on Tapeworm Phisiology. IX. A Histochemical Study of Egg-Shell Formation in *Schistocephalus solidus* (Pseudophyllidea). **Experimental Parasitology**, v. 5, n. 6, p. 519-540, 1956.
- SMITH, J. D.; CLEGG, J. A. Egg-shell Formation in Trematodes and Cestodes. **Experimental Parasitology**, v. 8, n. 3, p. 286-323. 1959.

- SMITH, J. H.; REYNOLDS, E. S.; VON LICHTENBERG, F. The integument of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 1, p. 28-49. 1969.
- SOBHON, P.; DANGPRASERT, T.; CHUANCHAIYAKUL, S.; MEEPOOL, A.; KHAWSUK, W.; WANICHANON, C. VIYANANT, V.; UPATHAM, E. S. *Fasciola gigantica*: Ultrastructure of the adult tegument. **Science Asia**, v. 26, p. 137-148. 2000.
- SRIMUZIPO, P.; KOMALAMISRA, C.; CHOOCHOTE, W.; JITPAKDI, A.; VANICHTHANAKOM, P.; KEHA, P.; RIYONG, D.; SUDOKONTASAN, K.; KOMALAMISRA, N.; SOKONTASAN, K.; TIPPAWANGKOSOL, P. Comparative morphometry, morphology of egg and adult surface topography under light and scanning electron microscopies, and metaphase karyotype among three size-races of *Fasciola gigantica* in Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 31, n. 2, p. 366-373. 2000.
- STUNKARD, H. W. The morphology of *Tamerlania bragai* dos Santos, 1934. **Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5, . p. 301-305. 1945.
- ŚWIDERSKI, Z.; BAKHOUM, A. J. S.; MONTOLIU, I.; FELIU, C.; GIBSON, D. I.; MIQUEL, J. Ultrastructural study of vitellogenesis in *Maritrema felii* (Digenea, Microphallidae). **Parasitology Research**, v, 109, p. 1707-1714. 2011.
- TAELEB, A. A.; LASHEIN, G. H. Ultrastructural observations of the vitelline follicles and vitellogenesis of *Acanthostomum (atrophocaecum) aswaninesis* Wannas, 1977 (Digenea, Acanthostomatidae), an intestinal parasite of *Bagrus bayad*. **Acta Parasitologica Globalis**, v. 4, n. 1, p. 06-13. 2013.
- TAVELA, A. de. O.; CARVALHO, G. D.; PEIXOTO, J. V.; CARNEIRO, F. T.; RODRIGUES, N. E, F.; OLIVEIRA, A, R, de.; PAULA, F. D. de.; GUERRERO, H. A. H.; PAULA, T. R. de. Parasitismo por *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae) em bico-de-lacre (*Estrila astrild*) (Linnaeus, 1758). In: V Simpósio Brasileiro sobre animais silvestres e selvagens – SBASS, Viçosa. **Anais**, Minas Gerais, 2010. p. 87.
- THREADGOLD, L. T. The tegument and associated structures of *Fasciola hepatica*. **The Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 104, p. 505-512. 1963.
- TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. F. T. de.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 67, n. 1, p. 1-886. 1969.
- TUBANGUI, M. A.; MASILUÑGAN, V. A. Trematode parasites of Philippine Vertebrates, IX Flukes from the domestic fowl and other birds. **Philippine Journal of Science**, v. 75, n. 2, p. 131-141. 1941.
- UNWIN, S.; CHANTREY, J.; CHATTERTON, J.; ALDHOUN, J. A.; LITTLEWOOD. D. T. J. Renal trematode infection due to *Paratanaisia bragai* in zoo housed Columbiformes and a red bird-of-paradise (*Paradisaea rubra*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 32-41. 2013.

WILSON, R. A. The structure and permeability of the shell and vitelline membrane of the egg of *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, v. 57, n. 1, p. 47-58. 1967.

WILSON, R. A. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica*. **The Journal of Parasitology**, v. 55, n. 1, p. 124-133. 1969.

WILSON, R. A. Fine structure of the nervous system and specialized nerve endings in the miracidium of *Fasciola hepatica*. **Parasitology**, v. 60, n. 3, p. 399-410. 1970.

WONGSAWAD, C.; ROJANAPAIBUL, A.; VANITTANAKOM, P. Light and scanning electron microscopy of *Stellantchasmus* sp (Trematoda: Heterophyidae). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Health**, v. 28, Suppl. 1, p. 213-216. 1997.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum. The Digenetic Trematodes of Vertebrates**. Vol. I. Part. I. Interscience Publishers, Inc., New York, NY, USA. 1958. 979p.

YAMAGUTI, S. **Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates**. V. I. Part I and II. Keigaku Company, Tokyo, Japan, 1971. 1074p.