



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

**MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DE LARVAS
DE NEMATÓIDES ENCONTRADAS EM *Achatina fulica*
BOWDICH, 1822 (MOLLUSCA, GASTROPODA) E SUA RELAÇÃO
COM A ATIVIDADE ANTRÓPICA NO MUNICÍPIO DE MESQUITA,
RIO DE JANEIRO, BRASIL.**

DANIELE DE OLIVEIRA FRANCO ACUÑA

Sob a Orientação do Professor Doutor
Jairo Pinheiro da Silva

e Co-orientação da Professora Doutora
Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2008

639.4
F825m
T

Franco Acuña, Daniele de Oliveira, 1979-
Morfologia e ultraestrutura de larvas
de Nematóides encontradas Achatina
emfulica Bowdich, 1822 (Mollusca,
Gastropoda) e sua relação com a atividade
antrópica no município de Mesquita, Rio
de Janeiro, Brasil/ Daniele de
Oliveira Franco Acuña - 2008.
51f. : il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Veterinária.
Bibliografia: f. 48-51.

1. Molusco - Parasito - Mesquita (RJ) -
Teses. 2. Caramujo gigante africano
Parasito - Teses. 3. Nematoda - Larva -
Teses. I. Silva, Jairo Pinheiro, 1969-
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Veterinária. III.
Titulo.

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

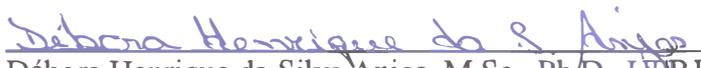
DANIELE DE OLIVEIRA FRANCO ACUÑA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/02/08.



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



Débora Henrique da Silva Anjos. M.Sc., Ph.D., UFRJ.



Líia Carvalho Brasil Sato. M.Sc., D.Sc., UFRRJ.

Ao meu marido, Freddy, por mais uma demonstração de carinho por mim, o seu apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por semear em mim o prazer em estudar e por fornecer condições físicas e emocionais para que essa semente germinasse, crescesse e hoje pudesse apresentar tão grandioso fruto.

A minha querida família, meus pais, Antônio e Maria da Penha, pelo apoio e compreensão, especialmente nos períodos de ausência, mas que sempre torceram para que este dia chegasse.

Ao meu companheiro de todas as horas, Freddy, pela paciência, por compartilhar dos momentos de estudo, de coleta no campo, de processamento no laboratório, por suportar a bagunça no carro e em casa (em meio a tantos caramujos, livros e lâminas), por solucionar minhas “crises pessoais” com a “Senhora Informática”... Enfim, por ser mais, muito mais que um marido.

Aos amados professores, Jairo Pinheiro da Silva e Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, por toda dedicação, carinho, paciência e compreensão, por compartilhar e construir conhecimento comigo e por hoje serem mais que meus orientadores, serem meus amigos.

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

Ao Prof. Armando Sales, UFRRJ, IMV, RJ pela realização das análises histológicas, histoquímicas e fotomicrografias, e também à técnica Ilza L. C. Meireles e à Prof.^a Clarice M. dos Santos.

À Prof.^a Dr.^a Reinalda Marisa Lanfredi, UFRJ, IBCCF, RJ pela realização das análises através de microscopia eletrônica de varredura.

À FAPERJ e ao CPGCV/UFRRJ pelo suporte financeiro.

À 9^a Coordenadoria Regional de Educação, especialmente à equipe da Divisão de Educação, pelo apoio e por compreender a importância da busca do conhecimento na minha formação.

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

Somente uma palavra pode expressar o que sinto:

Obrigada!

RESUMO

FRANCO-ACUÑA, Daniele de Oliveira. **Morfologia e ultraestrutura de larvas de nematóides encontradas em *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) e sua relação com a atividade antrópica no município de Mesquita, Rio de Janeiro, Brasil.** 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

O molusco *Achatina fulica* (Caramujo gigante africano) é registrado em quase todo território nacional, havendo a possibilidade de atuar como hospedeiro de parasitos do homem. Este estudo objetivou descrever a morfologia dos estágios larvais de nematóides encontrados em *A. fulica*, através de microscopia de luz e eletrônica de varredura, e relacionar a prevalência de infecção aos locais de coleta dos moluscos e à atividade antrópica. Sessenta moluscos foram coletados de abril de 2006 a abril de 2007, no município de Mesquita, RJ, transferidos para o laboratório, mantidos em terrários, medidos e dissecados para verificação da infecção, distribuição dos cistos pelos tecidos do molusco, coleta dos cistos e obtenção das larvas. Procedeu-se a fixação e o processamento para microscopia de luz e eletrônica de varredura. A ocorrência de *A. fulica* na área menos conservada foi maior que na área mais conservada. Porém não houve uma relação significativa entre a intensidade de infecção aos locais de coleta e à atividade antrópica. Quatorze moluscos (23%) estavam infectados e o maior número de cistos verificado por molusco foi de 130 e o menor de 01, em moluscos que apresentavam 106 e 55mm de comprimento de concha, respectivamente. Foi observada uma forte correlação entre o tamanho do molusco e o número de cistos encontrados e maior concentração destes na cavidade paleal, 87%. Desse total, 49% estavam na área mais vascularizada e 38% na menos vascularizada da cavidade. Os cistos apresentavam formato esférico, coloração rosada e mediam de 0,97 a 1,57mm de diâmetro e na maioria das vezes com uma única larva que se encontrava envolvida por um material amorfo. Foram recuperadas 222 larvas encistadas. Destas, 30 foram utilizadas no estudo morfológico. O comprimento das larvas variou de 2,57 a 5,8mm, sendo classificados em: pequeno – até 3,5mm; médio – de 3,53 a 4,5mm e grande - acima de 4,52mm. O comprimento médio das larvas nos três grupos foi de 2,85; 3,87 e 5,23mm, respectivamente, e a média total de 4,2mm. As larvas apresentavam cutícula branca, brilhante e estriada no sentido transversal e linha lateral até a extremidade posterior do corpo. Na extremidade anterior, observa-se a boca provida de três lábios, com anfídios e papilas, seguida por um esôfago musculoso com comprimento médio de 0,61mm, terminando em um bulbo esofágico. O anel nervoso foi observado no terço médio do esôfago e o intestino termina em uma abertura localizada próximo à extremidade posterior. A cauda, com comprimento variando de 0,15 a 0,42mm, se forma a partir desta abertura e apresenta dois tipos de terminações: abrupta ou que afina gradativamente. A diferença na terminação da cauda pode sugerir dimorfismo sexual, apesar de não terem sido observados primórdios de órgãos reprodutores. Com os resultados obtidos não foi possível a identificação ao nível específico, havendo dessa forma a necessidade de continuação deste estudo. A densidade populacional expressiva de *A. fulica* observada na área menos conservada confirma a influência da ação antrópica sobre a dispersão deste molusco.

Palavras-chave: Caramujo gigante africano. Larva de nematóide. Parasitismo.

ABSTRACT

FRANCO-ACUÑA, Daniele de Oliveira. **Morphology and ultrastructure of nematode larvae found in *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) and its relation with the antropic activity in the Mesquita City, Rio De Janeiro, Brazil.** 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The snail, *Achatina fulica* (Giant African snail), is registered in almost all Brazilian territory, and may act as an intermediate host of parasites of the man. This study aimed to describe the morphology of the nematode larvae found in *A. fulica*, through light (LM) and scanning electron microscopy (SEM), and to relate the prevalence of infection to the collection places of the snails and to the antropic activity. Sixty snails were collected from April/2006 to April/2007, in the Mesquita City, RJ, transferred to laboratory, kept in terraria, measured and dissected to verify the infection, distribution of the cysts in tissues of the snails. The cysts were collected and the larvae were separated. The material thus obtained was used to LM and SEM. The occurrence of *A. fulica* in the less conserved area was greater than that in the more conserved area. However, there was not a significant relation between the intensity of infection and the collection places and the antropic activity. Fourteen snails (23%) were infected and the biggest number of cysts/snail verified was 130 and the minor was 1, in snails that with 106 and 55mm of shell length, respectively. A strong correlation was observed between the size of the snail and the number of cysts and there was a greater concentration of these in the pallial cavity, 87%. Of this total, 49% were in the area more vascularized and 38% in the less vascularized area of this cavity. The cysts presented spherical shape, light pink colored and measured 0.97-1.57mm in diameter and with an unique larva involved by an amorphous material. Two hundred twenty two encysted larvae were recovered, 30 larvae were used to the morphological studies. The length of the larvae varied of 2.57-5.8mm, being classified in: small - until 3.5mm; medium - of 3.53-4.5mm and great - above of 4.52mm. The average length of the larvae in the three groups was of 2.85; 3.87 and 5.23mm, respectively, and the total average of 4.2mm. The larvae presented white cuticle, shining, transversally striated and the lateral line extending to the posterior extremity of the body. In the anterior end, it is observed mouth provided with three lips, with amphids and papillae, followed by a muscular oesophagus with average length of 0.61mm, ending in an esophagus bulb. The nervous ring it was observed in the medium third of the oesophagus and the intestine ends in an opening located next to the posterior end. The tail had a length varying of 0.15-0.42mm, is located after this opening may present two types of endings: abrupt or that it sharpens gradually. The difference in the ending of the tail may suggest sexual dimorphism, although not to have been observed reproductive structures. The identification to the specific level was not possible, this pointed to the necessity of continuation of this study. The expressive population density of *A. fulica* observed in the conserved area less it confirms the influence of the antropic action on the dispersion of this snail.

Key-words: Giant African snail. Nematode larvae. Parasitism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Espécime adulto de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 4
- Figura 2:** Morfologia geral de Mollusca - Gastropoda, tendo com referência a espécie *Helix aspersa*. Vista lateral direita. 4
- Figura 3:** Caracterização dos locais de coleta dos moluscos: Área mais conservada. a. Parque Municipal de Mesquita, Município de Mesquita no Estado do Rio de Janeiro. Área menos conservada: b. Trecho do Rio Dona Eugênia, Município de Mesquita, Rio de Janeiro. 9
- Figura 4:** Dissecção de *Achatina fulica*. a. Medida do tamanho da concha de *Achatina fulica* em laboratório feita com paquímetro Ivônica. b. Procedimento para extração da parte mole do corpo de *Achatina fulica*. 11
- Figura 5:** Caracterização dos locais de coleta dos moluscos. a. Espécime de *Achatina fulica* aderido a muro com cal de uma residência, Município de Mesquita, Rio de Janeiro. Área menos conservada: b. Espécime de *Achatina fulica* sobre madeira envelhecida e umedecida em área residencial, município de Mesquita, Rio de Janeiro. c. Espécimes de *Achatina fulica* em meio a restos de material de construção civil em área residencial, município de Mesquita, Rio de Janeiro. d. Espécime de *Achatina fulica* dentro de encanamentos de saída de esgoto, município de Mesquita, Rio de Janeiro. 17
- Figura 6:** Frequência de espécimes de *Achatina fulica* infectados e não infectados nas duas áreas de coleta, mais conservada e menos conservada, do município de Mesquita, RJ. 19
- Figura 7:** Relação entre o tamanho de *Achatina fulica* (em mm) e o número de cistos de nematóides. 19
- Figura 8:** Distribuição dos cistos pela massa visceral de *Achatina fulica*. a. Área mais vascularizada da cavidade paleal de *Achatina fulica*. b. Área menos vascularizada da cavidade paleal de *Achatina fulica*. 20
- Figura 9:** Cistos de nematóides encontrados em diferentes sítios de localização na cavidade paleal de *Achatina fulica*. a. Intestino. b. Rim. c. Cavidade Pericárdica. d. Glândula digestiva. 21
- Figura 10:** Frequência dos cistos com larvas de nematóides nos diferentes sítios de localização na massa visceral de *Achatina fulica* Bowdich, 1822. 22
- Figura 11:** Distribuição dos cistos de nematóides pela massa visceral de *Achatina fulica*. a. Cistos de nematóides localizados dentro da veia pulmonar na cavidade paleal de *Achatina fulica*. b. Cisto localizado dentro do intestino próximo à cavidade paleal de *Achatina fulica* e na veia pulmonar. 23

- Figura 12:** Cavidade paleal de *Achatina fulica* evidenciando a constituição granulomantosa do tecido. a. Cavidade paleal observada em lupa. b. Corte histológico da cavidade paleal observada ao estereomicroscópio evidenciando os inúmeros cistos. 23
- Figura 13:** Análise morfológica dos cistos encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. a. Cisto contendo larva de nematóide. b. Morfologia cisto destacando suas características macroscópicas. c. Ultraestrutura da superfície externa do cisto (MEV). Barra de escala=500micrômetros. d. Ultraestrutura do cisto em corte, evidenciando a presença da larva de nematóide e o material amorfo em seu interior (MEV). Barra de escala=100micrômetros. e. Ultraestrutura do cisto evidenciando a espessa parede (MEV). Barra de escala=10micrômetros. 25
- Figura 14:** Análise morfológica dos cistos encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica* que apresentaram constituição e coloração diferenciada. a. Cistos evidenciando o grande tamanho e a coloração mais escura. b. Cisto liberando larva de grande tamanho e apresentando material amorfo com coloração mais escura. 26
- Figura 15:** Análise morfológica das larvas de nematóides encontrados em *Achatina fulica*. a. Morfologia externa da larva retirada do interior de um cisto. b. Detalhe das estriações transversais no corpo da larva (MEV). Barra de escala=10 micrômetros. c. Detalhe da linha lateral em larva retirada do cisto (MEV). Barra de escala=10 micrômetros. d. Extremidade anterior da larva – a. lábio trirradiado; b. papila; c. anfidio (MEV). Barra de escala=10 micrômetros. e. Extremidade anterior da larva – a. boca; b. anel nervoso; c. esôfago; d. intestino (ML). Barra de escala=70micrômetros. f. Extremidade anterior da larva evidenciando o esfíncter pré-esofageano (ML). Barra de escala=40micrômetros. 28
- Figura 16:** Análise morfológica das larvas de nematóides encontrados em *Achatina fulica*. a. Morfologia da cauda com terminação longa ou que afina gradativamente (ML). b. Morfologia da cauda com terminação curta ou abrupta (ML). c. Ultraestrutura da região posterior de larva com terminação longa ou que afina gradativamente (MEV). Barra de escala=100micrômetros. d. Ultraestrutura da região posterior de larva com terminação curta ou abrupta (MEV). Barra de escala=50micrômetros. e. Região da abertura posterior do aparelho digestivo (MEV). Barra de escala=10 micrômetros. 29
- Figura 17:** Cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. a. Cisto grande evidenciando: a. parede do cisto; b. larva; c. material amorfo. Coloração: HE. Objetiva: 10x. Barra de escala=500micrômetros. b. Cisto pequeno evidenciando a cavidade paleal (CP) onde está inserido. Coloração: HE. Objetiva: 20x. Barra de escala=150micrômetros. 32

- Figura 18:** Cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Constituição da parede do cisto: *a.* camada interna; *b.* camada mediana; *c.* camada externa. Coloração: Tricrômio de Gomori. Objetiva: 20x. Barra de escala=200micrômetros. **b.** Cisto grande evidenciando a reação da cutícula da larva. Coloração: Tricrômio de Gomori. Objetiva: 20x. Barra de escala=500micrômetros. 33
- Figura 19:** Cistos pequenos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Cistos evidenciando a coloração vermelho intenso das larvas. Coloração: Tricrômio de Gomori. Objetiva: 10x/Zoom 2x. Barra de escala=200micrômetros. **b.** Cisto evidenciando a reação de sua parede. Coloração: Tricrômio de Gomori. Objetiva: 20x/Zoom 2x. Barra de escala=150micrômetros. 34
- Figura 20:** Cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Cisto pequeno evidenciando a reação da larva. Coloração: PAS. Objetiva: 10x/Zoom 3x. Barra de escala=150micrômetros. **b.** Cisto grande evidenciando a reação do material amorfo e da larva. Coloração: PAS. Objetiva: 4x/Zoom 2x. Barra de escala=1000micrômetros. 35
- Figura 21:** Distribuição de *Achatina fulica* no estado do Rio de Janeiro, em janeiro de 2005, com municípios infestados escurecidos e os infestados desde novembro de 2002 com indicação de seus nomes. Destaque para o município de Mesquita, RJ. 38
- Figura 22:** Cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Resultado do trabalho de Franco (2005). Fonte: FRANCO, 2005. **b.** Resultado do trabalho de Thiengo (2007). Fonte: THIENGO et al., 2007a. **c.** Resultado da pesquisa atual. 41
- Figura 23:** Morfologia de larvas de nematóides que infectam naturalmente *Achatina fulica* no Brasil. **a.** *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: ASH, 1970. **b.** Larvas semelhantes à *Strongyluris* sp. Fonte: THIENGO, 1995a. **c.** *Aelurostrongylus abstrusus*. Fonte: LOPEZ et al., 2004. **d.** Larva de nematóide encontrada neste estudo: *a.* Região anterior; *b.* Região posterior. 43
- Figura 24:** Morfologia de *Strongyluris oscari* Travassos, 1903. *a.* Extremidade posterior da fêmea. *b.* Extremidade anterior da fêmea. *c.* Extremidade anterior do macho. *d.* Ovejeter. *e.* Extremidade posterior do macho. 46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Etapas de processamento histológico até a inclusão em parafina, seguindo-se de corte com micrótomo, a coloração e a montagem em bálsamo do Canadá. 13
- Tabela 2:** Número de espécimes de *Achatina fulica* coletados/observados por área de coleta. N = nº de coletas realizadas. $X \pm SD$ = média \pm desvio-padrão. 15
- Tabela 3:** Medidas (em mm) dos três grupos (pequeno, médio e grande) de larvas de nematóides encontradas em *Achatina fulica*. CT – Comprimento total; BA – Distância da abertura bucal até o anel nervoso; e – Comprimento do esôfago; c – Distância da abertura posterior do sistema digestivo até o final da cauda. 27
- Tabela 4:** Composição química do cisto (pequeno e grande), da larva e do material amorfo de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. 31
- Tabela 5:** Comparação das espécies de nematóide registradas no Brasil que infectam naturalmente *Achatina fulica*. Medidas das médias (em mm) das larvas de terceiro estágio (L₃) de *Angiostrongylus cantonensis* e semelhantes à *Strongyluris* sp., dos três estágios (L₁, L₂, L₃) de *Aelurostrongylus abstrusus* e dos três grupos (pequeno, médio e grande) do nematóide encontrado no estudo. Sendo, CT – Comprimento total; BA – Distância da abertura bucal até o anel nervoso; e – Comprimento do esôfago; c – Distância da abertura posterior do sistema digestivo até o final da cauda. 42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Classificação Taxonômica de <i>Achatina fulica</i> Bowdich, 1822	3
2.1.1 Morfologia geral	3
2.1.2 Ecologia	3
2.1.3 Parasitismo em <i>Achatina fulica</i> Bowdich, 1822	5
2.1.4 Histórico da introdução de <i>Achatina fulica</i> no Brasil	5
2.2 Controle	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Coleta de <i>Achatina fulica</i>	8
3.1.1 Caracterização dos locais de coleta dos moluscos	8
3.2 Manutenção de <i>Achatina fulica</i> no Laboratório	8
3.3 Dissecção de <i>Achatina fulica</i>	8
3.4 Processamento dos Parasitos e dos Tecidos de <i>Achatina fulica</i>	12
3.4.1 Processamento para microscopia de luz (ML)	12
3.4.2 Processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV)	12
3.5 Classificação das Larvas de nematóides encontradas em <i>Achatina fulica</i>	14
3.6 Fotografias e Fotomicrografias	14
3.7 Análise Estatística	14
4 RESULTADOS	15
4.1 Distribuição dos Moluscos nas Duas Áreas de Coleta de <i>Achatina fulica</i>	15
4.1.1 Área mais conservada	16
4.1.2 Área menos conservada	16
4.2 Parasitismo em <i>Achatina fulica</i>	18
4.2.1 Infecção	18
4.2.1.1 Relação da intensidade de infecção aos locais de coleta dos moluscos e à atividade antrópica	18
4.2.2 Distribuição dos cistos de nematóides pela massa visceral de <i>Achatina fulica</i>	18
4.2.3 Análise morfológica dos cistos e larvas de nematóides encontrados	24
4.2.3.1 Análise morfológica dos cistos	24
4.2.3.2 Análise morfológica das larvas de nematóides	27
4.2.4 Composição química do cisto, da larva e do material amorfo dos nematóides encontrados em <i>Achatina fulica</i>	30
5 DISCUSSÃO	36
5.1 Locais de Coleta dos Moluscos e a Atividade Antrópica	36
5.1.1 Atividade antrópica e espécies exóticas invasoras	36
5.2 Controle	39
5.3 Parasitismo em <i>Achatina fulica</i>	39
5.3.1 Infecção	39
5.3.2 Distribuição dos cistos	40
5.3.3 Análise morfológica dos cistos e larvas de nematóides	42

6 CONCLUSÕES

47

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

48

1 INTRODUÇÃO

A espécie de molusco terrestre tropical *Achatina fulica* Bowdich, 1822, conhecida como caramujo-gigante africano, nativa do leste-nordeste da África, foi introduzida no Brasil na década de 80 para fins comerciais, por criadores de ‘escargot’ e hoje, principalmente pela atividade antrópica, encontra-se disseminada em 23 dos 26 estados brasileiros, inclusive em reservas naturais. A alta capacidade reprodutiva de *A. fulica*, a ausência de predadores naturais, o fato de alguns criadores inconseqüentemente libertarem esses espécimes na natureza ao desistirem da criação, estão entre as principais causas dessa rápida dispersão.

Essa espécie, parcialmente arborícola, pode se alimentar sobre árvores e escalar edificações. É extremamente prolífica, e geralmente tem sido encontrada em grandes quantidades, fato que somado ao seu grande porte que pode alcançar cerca de 20 cm, tem causado pânico às populações onde ocorre. Também é herbívora generalista, e além de destruir hortas, jardins e principalmente diversos tipos de lavouras, gerando graves prejuízos aos agricultores, constitui séria ameaça a nossa biodiversidade, porquanto a malacofauna nativa certamente será afetada, a julgar pelos fatos ocorridos em outros países onde esta espécie foi introduzida há mais tempo. Por ser bastante resistente à seca e ao frio hibernal, apresenta alta suportabilidade ambiental, podendo ser encontrada em meios naturais e antrópicos.

O molusco ainda pode hospedar o nematóide de importância para saúde pública, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica humana, com casos consideráveis em alguns países asiáticos e nas Ilhas do Pacífico, também sendo registrado em Cuba, Porto Rico e, mais recentemente, no Brasil. Esse verme pulmonar do rato está disseminado, e a infecção parece estar aumentando em ratos e em marsupiais da família Peramelidae nas regiões tropicais e subtropicais, provavelmente devido aos ratos infectados que viajam escondidos em navios.

Achatina fulica é um hospedeiro potencial de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971) que causa angiostrongilíase abdominal, uma zoonose que ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina. Essa parasitose é considerada um problema de saúde pública na Costa Rica, onde ocorrem 600 casos por ano. No Brasil, existem registros de centenas de casos, com maior número registrado no estado do Rio Grande do Sul, com média anual de 4 a 6 casos nas Regiões Sul e Sudeste respectivamente, havendo casos também no Distrito Federal e muitas espécies de moluscos terrestres podem atuar como vetores para o parasito.

Apesar de não ter sido, ainda, registrada a infecção natural de *A. fulica* por *A. costaricensis* no Brasil, isto já foi registrado em outros países. Sendo assim, a possibilidade de *A. fulica* atuar como hospedeiro intermediário deste parasito no Brasil, não deve ser descartada, devido a dois importantes fatores na epidemiologia da transmissão dessa parasitose: a baixa especificidade do parasito quanto ao hospedeiro intermediário e a alta capacidade reprodutiva de *A. fulica*, que é responsável por alta densidade populacional durante todo o ano e ao fato de compartilhar muitos ambientes com os roedores.

Larvas de Metastrongyloidea, *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898), parasito de pulmão de cães e gatos domésticos, podem ser encontradas em *A. fulica*, que atua, assim como outros moluscos, como seu hospedeiro intermediário. E também, larvas de outro nematóide, similares às do gênero *Strongyluris*, foram observadas no interior da cavidade paleal do molusco.

Desde a explosão populacional de *A. fulica* no território nacional, muitos estudos realizados têm buscado determinar os riscos de saúde pública para população humana, além

das implicações veterinárias, tornando-se importante ressaltar a necessidade de vigilância sanitária dos moluscos e de roedores, com medidas de controle local.

O estudo de nematóides que utilizem *A. fulica* como hospedeiro intermediário é fundamental para a determinação de formas de controle desses parasitos, caso sejam responsáveis por riscos à saúde pública ou difundir zoonoses.

Neste trabalho foi empregado o sufixo *-íase* utilizado para designar doenças causadas por agentes específicos, tendo como base a nomenclatura registrada no volume II da International Nomenclature of Diseases pela Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) que, juntamente com a Organização Mundial de Saúde (OMS), desenvolveram um projeto destinado a estabelecer uma nomenclatura das diversas doenças, para uso internacional, redigida em inglês, devendo os nomes ser adaptados a outros idiomas. É que, em relação às doenças parasitárias, causadas tanto por protozoários como por metazoários, há nítida preferência pelo sufixo *-íasis*. O Dicionário de Termos Técnicos de Medicina e Saúde, de Luis Rey (2003), o mais moderno dicionário de termos médicos em nosso idioma, adotou a nomenclatura internacional, registrando como sinônimos as variantes mais usadas de alguns termos, com remissão para a denominação oficial da citada nomenclatura.

O presente estudo teve por objetivos: (1) descrever a morfologia dos estágios larvais de nematóides encontrados em *A. fulica* através da microscopia de luz e eletrônica de varredura e (2) relacionar a prevalência de infecção aos locais de coleta dos moluscos e à atividade antrópica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação Taxonômica de *Achatina fulica* Bowdich, 1822

Achatina fulica é uma espécie de molusco gastrópode terrestre tropical, nativa do leste-nordeste da África, que ocupa a seguinte posição taxonômica segundo Oliveira et al., 1981 e Simone *in* Paiva, 2004 :

Filo Classe	Mollusca Curvier, 1795
Subclasse	Gastropoda Curvier, 1797
Ordem	Pulmonata Curvier, 1817
Subordem	Stylommatophora Schmidt, 1855
Superfamília	Sigmurethra Millard, 1997
Família	Achatinoidea Swainson, 1840
Gênero	Achatinidae Swainson, 1840
Espécie	<i>Achatina</i> Lamarck, 1799
	<i>Achatina fulica</i> Bowdich, 1822

2.1.1 Morfologia geral

Achatina fulica é um molusco de grande porte que possui o corpo protegido por uma concha, este é dividido em três partes: cabeça, pé e massa visceral. Na cabeça há uma boca, quatro tentáculos e um orifício genital. Os tentáculos maiores apresentam olhos (tentáculos oculares); os dois tentáculos menores têm função tátil (tentáculos tácteis). O orifício genital está localizado atrás da cabeça, do lado direito do animal. Como este molusco é hermafrodita, há uma vagina, um pênis e um dardo calcáreo no interior do orifício. O pé, utilizado para locomoção, é a massa muscular que se espalha à frente e atrás da concha. A massa visceral, protegida no interior da concha, é representada pela glândula digestiva, intestino, rim, coração e ovotestis. A concha serve de abrigo natural para o molusco contra predadores e fatores abióticos, sendo constituída principalmente por carbonato de cálcio, daí a importância do cálcio na alimentação do animal. Ela é cônica marrom ou mosqueada de tons mais claros. Adultos dessa espécie podem atingir de 15 a 20 cm de comprimento de concha e mais de 200 gramas de peso total (FUNCIA, 2004 - Figuras 1 e 2).

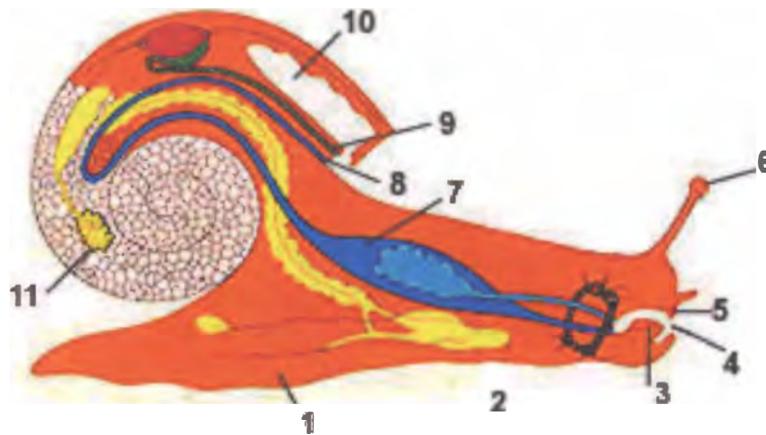
2.1.2 Ecologia

Parcialmente arborícola (pode se alimentar sobre árvores e escalar edificações e muros); extremamente prolífica, produz muitos ovos por ano: 50 a 400 ovos por postura e cerca de 500 ovos (em média) por ano segundo Salgado *in* Paiva (2004); ativa no inverno (em regiões de inverno úmido e pouco frio); herbívora generalista (polífaga, ou seja, se alimentam de folhas, flores e frutos de muitas espécies vegetais); resistente à seca; resistente ao frio hibernal; canibal (devora ovos e caramujos jovens da mesma espécie), hábito provavelmente relacionado a ambientes pobres em cálcio (necessário para a concha: animais parcialmente calcífilos); sobrevivente em muitos meios naturais e antrópicos (florestas e capoeiras, bordas de florestas, caatingas, brejos e outras áreas de vegetação nativa, áreas de cultura – especialmente hortas e pomares, plantações abandonadas, terrenos baldios urbanos, quintais e jardins), segundo Paiva (2004).



Figura 1: Espécime adulto de *Achatina fulica* Bowdich, 1822.

Fonte: PAIVA, 2004.



- | | | | |
|---------------------|---------------------|--|---|
| 1. Pé | 7. Estômago |  Coração |  Glândulas Salivares |
| 2. Orifício genital | 8. Ânus |  Rim |  Aparelho Genital |
| 3. Rádula | 9. Canal excretor |  Aparelho Digestivo |  Glândula Digestiva |
| 4. Boca | 10. Cavidade paleal | | |
| 5. Mandíbula | 11. Ovotestis | | |
| 6. Tentáculos | | | |

Figura 2: Morfologia geral de Mollusca - Gastropoda, tendo com referência a espécie *Helix aspersa*. Vista lateral direita.

Fonte: FUNCIA – Morfologia Escargots, 2004.

2.1.3 Parasitismo em *Achatina fulica* Bowdich, 1822

Moluscos são organismos de grande importância médica humana e veterinária, pois servem como hospedeiros intermediários para vários parasitos, predominantemente do grupo dos trematódeos, como o *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) e outros, mas também há nematóides de grande interesse médico em nosso país que têm a participação de moluscos em seus ciclos biológicos, como *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971) e *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935).

Segundo Graczyk e Fried (2001), o parasitismo, como uma interação entre dois organismos, hospedeiro e parasito, é exclusivamente dependente do grau de integração fisiológica entre estes organismos e a sincronia fisiológica de seus ciclos biológicos. Assim, segundo a definição de parasitismo de Olsen (1977), o parasitismo é aquela relação na qual o parasito é fisiologicamente dependente do hospedeiro.

Além disto, um grande número de parasitos, que não afetam a saúde humana ou de animais de criação, hospeda-se em moluscos e participam da complexidade de ciclos e interações que resultam na contínua evolução das espécies.

Os primeiros autores que revisaram a ocorrência de nematóides em moluscos foram Chitwood e Chitwood (1937).

Mengert (1953) em sua revisão assinalou a ocorrência de várias espécies de Rhabditida em moluscos terrestres e de uma espécie de Ascaridida, *Cosmocercoides variabilis* (Harwood, 1930) em *Limax agrestis* (Linné), *Deroceras reticulatum* (Muller, 1774) e *Opeas goodally* (Miller).

Poinar (1977) forneceu chaves de identificação para grupos e gêneros de nematóides parasitos de invertebrados. Segundo este autor, os nematóides parasitos de moluscos pertencem a duas ordens, Ascaridida, com apenas uma família, Cosmocercidae e Rhabditida, com Alaninematidae, Alloionematidae, Angiostomatidae e Daubayliidae.

2.1.4 Histórico da introdução de *Achatina fulica* no Brasil

A introdução de *A. fulica* no continente americano iniciou-se pelo Havaí, nos idos de 1939, tendo alcançado a Califórnia ao fim da Segunda Guerra Mundial; foi registrada na Flórida no início da década de 70. Nos inúmeros países em que se estabeleceu *A. fulica* promoveu a devastação de plantações de banana, mamão, amendoim, café, cítricos entre outras, bem como a destruição de grãos armazenados, jardins e de hortas domésticas. Nos EUA e Austrália foi considerada praga agrícola, exigindo grandes esforços para seu controle e erradicação nas áreas invadidas. Em outros países, como Índia, Madagascar e do sudeste asiático, a espécie permanece presente (VASCONCELLOS e PILE, 2001).

No Brasil, a introdução desse molusco ocorreu na década de 80, tendo sido motivada pela procura de uma espécie que pudesse substituir o ‘escargot’ verdadeiro. Os produtores brasileiros, sem nenhum estudo prévio do impacto ambiental que representaria a introdução de uma espécie exótica, não se preocuparam com os possíveis danos à agricultura, às florestas e à saúde pública, que os caramujos evadidos de suas criações pudessem causar. Muitos criadores desestimulados pelo insucesso da iniciativa acabaram soltando esses indivíduos em vida livre, ao desistirem da criação (PAIVA, 2004).

2.1.5 *Achatina fulica* e a saúde pública

O encontro de *A. fulica* com elevadas densidades populacionais em vida livre no Brasil é preocupante pela possibilidade desse molusco vir a participar como hospedeiro de parasitos com importância para a saúde pública. Entre estes pode ser destacado o nematóide *A.*

cantonensis (= *Parastrongylus cantonensis*) causador da angiostrongilose meningoencefálica humana (ou angiostrongilose meningoencefálica ou meningite eosinofílica), segundo Teles e Fontes (1998). Esse nematóide tem seus estágios larvais se desenvolvendo em lesmas e outros moluscos terrestres e quando comidos por roedores, suas larvas migram para as meninges e desenvolvem-se no encéfalo, os vermes adultos jovens então migram até a artéria pulmonar onde atingem a maturidade (MARKELL et al., 2003). A manutenção dessa zoonose tem potencial importância na medicina veterinária por apresentar também roedores urbanos e silvestres como hospedeiros definitivos.

Outra espécie importante é *Angiostrongylus costaricensis*, agente etiológico da angiostrongilose abdominal (ou angiostrongilose abdominal), doença grave com centenas de casos já reportados no Brasil e que pode resultar em óbito por perfuração intestinal, peritonite e hemorragia abdominal. A angiostrongilose abdominal tem o maior número de registros no estado do Rio Grande do Sul e Distrito Federal (PAIVA, 2004), com média anual de 4 a 6 casos nas Regiões Sul e Sudeste (REY, 2002). O ciclo biológico deste nematóide envolve a participação de diversas espécies de moluscos terrestres e de roedores silvestres, segundo Markell et al. (2003), e de várias outras espécies de roedores (selvagens e ligadas ao homem), como também coatis e sagüis (REY, 2002). A postura de ovos pelos nematóides ocorre em arteríolas da parede intestinal do hospedeiro roedor, logo após eclode o primeiro estágio larval (L₁), que migra para parede intestinal e aparece nas fezes. As larvas de primeiro estágio quando ingeridas por lesmas ou outros moluscos, crescem e sofrem duas mudas, passando para os estágios L₂ e L₃, que é infectante para roedores ou para humanos (MARKELL et al., 2003), a infecção humana é acidental, quando este ingere principalmente verduras e, provavelmente, água que esteja contaminada com o terceiro estágio (L₃) do parasito.

Carvalho et al. (2003), infectaram experimentalmente alguns exemplares de *A. fulica* com larvas de *A. costaricensis*, demonstrando a susceptibilidade do molusco ao parasito. Concluindo que *A. fulica* pode ser um risco para a urbanização da angiostrongilose abdominal devido a sua alta proliferação, dispersão contínua e extraordinária adaptação nas cidades brasileiras. Teles et al. (1997) também relatam situação similar, considerando *A. cantonensis*, onde participam como hospedeiro intermediário do ciclo do parasito, além de *A. fulica*, outros moluscos como *Bradybaena similaris* Férussac, 1821 e *Subulina octona* Bruguière, 1789. Porém, a susceptibilidade de *A. fulica* ao parasito, bem como a produção de larvas do nematóide, é superior a dos demais moluscos.

Segundo Paiva (2004), a pesquisadora Silvana Carvalho Thiengo (Departamento de Malacologia da Fundação Oswaldo Cruz) constatou a infecção de espécimes de ‘escargot’ *Helix pomatia* (Linnaeus, 1758) por *A. costaricensis* (em julho de 2001).

Neahauss et al. (2007), em seu trabalho sobre infecção experimental de *A. fulica* com espécies de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* para avaliar a potencialidade de risco da transmissão desses parasitos pelo molusco, revelaram que os espécimes de *A. fulica* que ocorrem no Sul do Brasil não são bons hospedeiros para ambas espécies de *Angiostrongylus*, não representando um risco significativo para transmissão destes parasitos.

Recentemente, durante o XX Encontro Brasileiro de Malacologia (EBRAM), a pesquisadora Roberta Lima Caldeira apresentou um trabalho que registra, pela primeira vez, moluscos terrestres naturalmente infectados por *A. cantonensis* no Brasil e dentre o grupo de moluscos pesquisados, oriundos do estado do Espírito Santo, estava inserido *A. fulica*, que apresentou uma prevalência de infecção de 67% (CALDEIRA et al., 2007). No mesmo evento, também foram assinalados trabalhos que registram infecção natural de *A. fulica* por *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898), um nematóide comum que se localiza nos pulmões de gatos. Os vermes adultos vivem no parênquima pulmonar e pequenos bronquíolos dos gatos, os ovos formam pequenos nódulos nos alvéolos e as L₁ são eliminadas nas fezes. Estas penetram na região podálica do molusco e evoluem até L₃ que são infectantes, e durante

esta fase o molusco pode ser ingerido por hospedeiros paratênicos, como aves e roedores. O gato infecta-se por ingestão desses hospedeiros, e as L₃, liberadas no trato digestivo, seguem para os pulmões pela circulação linfática ou sanguínea (URQUHART, 1998; SOULSBY, 1987). Nos trabalhos de Teodoro et al. (2007), sobre diagnóstico molecular de larvas de helmintos presentes em *A. fulica* foram recuperadas larvas de moluscos oriundos de Belém/PA, Uberaba/MG e Jaraguá/GO, que apresentaram perfil compatível com o de *A. abstrusus*.

O primeiro registro do desenvolvimento de estágio infectivo de *A. abstrusus* de várias localidades do Brasil, como também a ocorrência de larvas de nematóide similares à *Strongyluris* sp. no interior da cavidade paleal de *A. fulica*, foi realizado por Thiengo et al. (2007a). Tal estudo vem comprovar a importância veterinária deste molusco na transmissão de *A. abstrusus* para gatos domésticos e destacar a presença de larvas similares à *Strongyluris* que foram registradas pela primeira vez por Thiengo (1995a, b) em infecções naturais em *Megalobulimus* sp..

2.2 Controle

A invasão de *A. fulica* no Brasil se constitui num problema principalmente em áreas urbanas, mas também crescente em áreas naturais importantes. Embora o molusco não seja ainda considerado, no Brasil, como uma praga potencialmente séria, é uma preocupação para pequenos agricultores, assim como para saúde pública. Devido a sua ampla distribuição por todo o Brasil torna-se impossível erradicar o molusco. Porém, o controle local continua possível, embora requeira grandes custos financeiros e de mão-de-obra (THIENGO et al., 2007b). A presença de *A. fulica* nos domicílios é um grave problema, o qual vem sendo combatido sistematicamente por agentes da Defesa Civil (PONTES, 2006)

Para que haja um controle quanto à disseminação desse molusco, não é recomendado o uso de moluscidas devido a sua toxidez ambiental, sendo o método mais indicado a catação manual e posterior destruição dos espécimes, preferencialmente por incineração. Entretanto, é conhecido que, pela falta de informação e assustadas com a quantidade de caracóis nos domicílios e peridomicílios, algumas pessoas vêm utilizando todos os tipos de venenos encontrados no comércio para tentar se livrar desses animais, essa prática pode representar, em escala ainda não estudada, grande risco para as pessoas que manipulam essas substâncias, crianças, animais e a contaminação do ambiente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de *Achatina fulica*

A coleta dos espécimes de *A. fulica* foi realizada no município de Mesquita, RJ (Latitude Sul 22°46'59"; Longitude Oeste 43°25'56"; Altitude 23m; Área total 41,6km²) de abril de 2006 a abril de 2007. Os moluscos foram acondicionados em recipientes plásticos e transferidos para o Laboratório de Biologia e Ecologia de Helminetos, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, onde foram mantidos até serem dissecados.

A coleta dos moluscos foi feita por catação manual com o auxílio de luvas de borracha (prevenção à possível infecção), sendo os moluscos colocados em potes plásticos para o transporte até o laboratório. As coletas foram realizadas no início da manhã, aproximadamente 7 horas, ou entardecer, aproximadamente 17 horas, por estes serem os momentos de maior atividade do animal devido às temperaturas mais amenas.

Durante o período de coletas, foram realizadas também observações dos locais onde os moluscos estiveram presentes, especialmente sobre as condições do ambiente quanto às influências da atividade antrópica. Essas informações foram registradas em uma ficha específica, juntamente com informações prestadas pelos moradores do local.

3.1.1 Caracterização dos locais de coleta dos moluscos

A área escolhida para as coletas dos moluscos foi o município de Mesquita, no estado do Rio de Janeiro em função dos inúmeros registros da presença do molusco *A. fulica*, especialmente nos anos de 2004 e 2005 (FRANCO, 2005; THIENGO, 2007b).

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram escolhidas duas áreas deste município: uma área mais conservada, que compreendia o Parque Municipal de Mesquita (Figura 3a), principalmente os locais que margeiam o Rio Dona Eugênia; a outra área menos conservada, no bairro de Santa Terezinha na parte que margeia a extensão mais urbana do Rio Dona Eugênia (Figura 3b). Com esses dois ambientes distintos, procurou-se estabelecer relações sobre a intensidade de infecção aos locais de coleta dos moluscos e a influência da atividade antrópica

3.2 Manutenção de *Achatina fulica* no Laboratório

Os moluscos foram mantidos em potes/terrários que apresentavam em média 30x60x30cm com tampas confeccionadas com armação em madeira e tela, adaptadas para possibilitar a ventilação e evitar a penetração de insetos (como forídeos, por exemplo, que realizam suas posturas nas partes moles dos moluscos, matando-os).

Nesses terrários, o fundo estava coberto por uma camada de terra esterilizada em forno aquecido a 100°C por 2 horas, com profundidade de aproximadamente 10cm (para que os moluscos pudessem se enterrar e para realizarem suas posturas) e foi mantida uma umidade necessária para sua sobrevivência. Os moluscos foram alimentados com alface (*Lactuca sativa*), entre outros vegetais, como cenoura (*Daucus carota*), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) e pepino (*Cucumis sativus*), os quais eram previamente imersos em uma solução de água com ácido acético 0,05%. Os moluscos foram mantidos nesses terrários e observados periodicamente até a realização das dissecações.

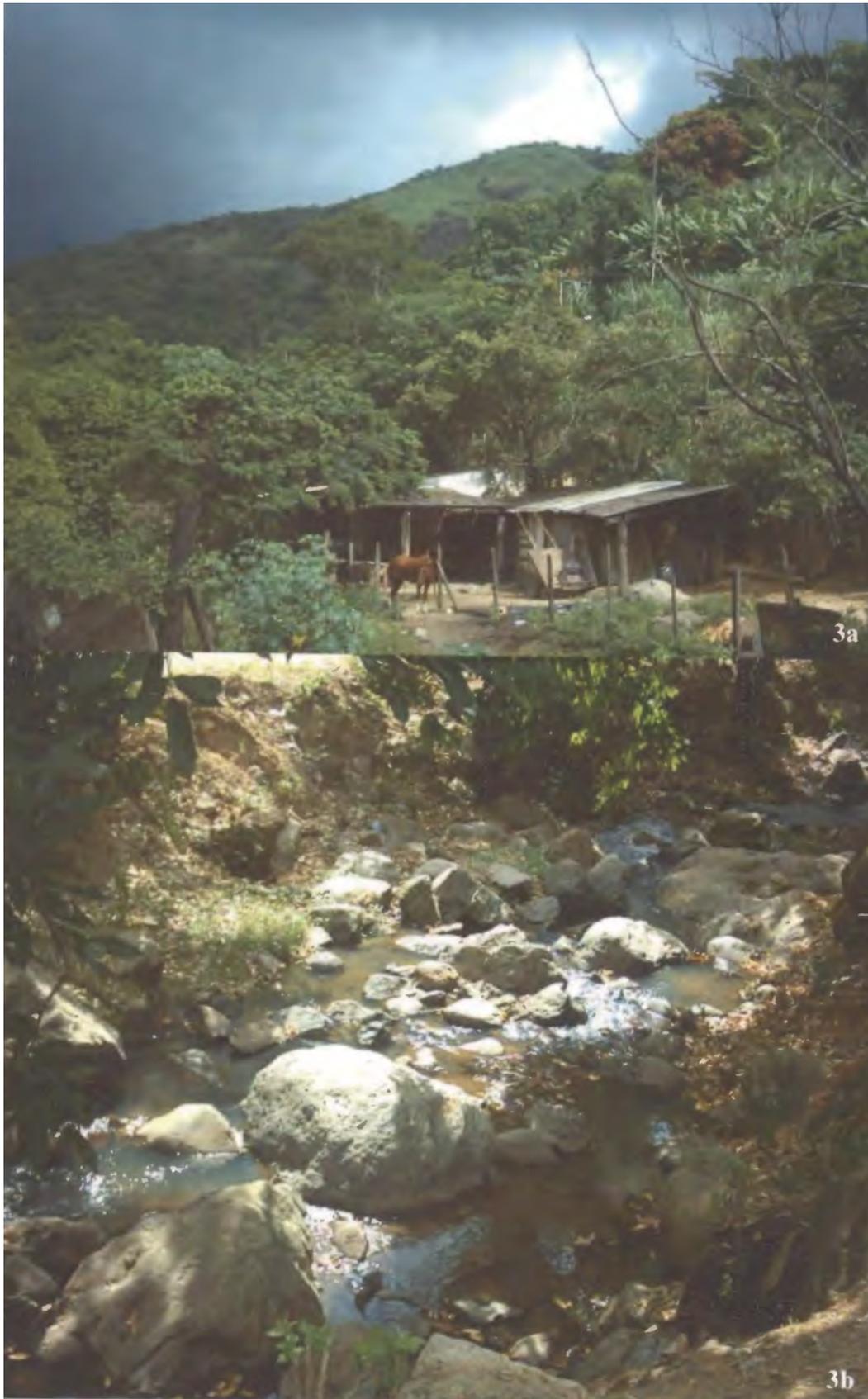


Figura 3: Caracterização dos locais de coleta dos moluscos: Área mais conservada: a. Parque Municipal de Mesquita, Município de Mesquita no Estado do Rio de Janeiro. Área menos conservada: b. Trecho do Rio Dona Eugênia, Município de Mesquita, Rio de Janeiro.

3.3 Dissecação de *Achatina fulica*

Cada molusco era analisado individualmente, iniciando (utilização de luvas) por uma lavagem do animal em água corrente, medida do tamanho da concha com um paquímetro (Figura 4a), quebra da concha com auxílio de tábua (de uso doméstico) e martelo (de plástico ou madeira), para facilitar a remoção da parte mole do animal (Figura 4b).

Com utilização de pinça, tesoura, placa de Petri e estiletas, a evisceração do animal foi realizada a partir da cavidade paleal, quando se realizou um corte com tesoura desde a área logo acima do bordo do manto, contornando a parte terminal do tubo digestivo, até o final do rim. Para que fosse possível rebater essa parte do manto, foi preciso realizar dois cortes transversais, um no início e um no fim do corte anterior.

A cavidade paleal foi observada para a verificação da existência ou não de cistos e após esta etapa, foi feita a análise dos órgãos internos que foram individualizados em placas de Petri contendo solução fisiológica a 0,65%. Durante as dissecações, era realizada a pesquisa de cistos ou outros estágios de parasitos que poderiam utilizar *A. fulica* como hospedeiro, sendo observados em lupa e/ou microscópio.



Figura 4: Dissecação de *Achatina fulica*. **a.** Medida do tamanho da concha de *Achatina fulica* em laboratório feita com paquímetro Ivônica. **b.** Procedimento para extração da parte mole do corpo de *Achatina fulica*.

3.4 Processamento dos Parasitos e dos Tecidos de *Achatina fulica*

Os cistos quando encontrados eram rompidos para a liberação das larvas. A fixação era feita com AFA (álcool, formalina, ácido acético) (AMATO et al., 1991) aquecido a uma temperatura de aproximadamente 60°C, após 24h os parasitos eram transferidos para Etanol 70°GL (conservante), onde permaneceram até o processamento.

3.4.1 Processamento para microscopia de luz (ML)

Algumas larvas foram clarificadas com Lactofenol de Amann (HUMASON, 1972) e Creosoto de Faia e, posteriormente, foram montadas as lâminas em Bálsamo do Canadá natural. Fragmentos da cavidade paleal, glândula digestiva, cavidade pericárdica, rim e intestino foram fixados com Dubosq-Brasil modificado para posterior processamento histológico.

Durante as dissecações de *A. fulica*, as partes moles foram retiradas do interior das conchas, sob observação ao estereomicroscópio conforme descrição no item 3.3. A massa visceral do molusco foi fragmentada, distendida sobre uma placa de Petri própria para a dissecação de moluscos e, presa por alfinetes finos, o líquido fixador foi derramado sobre o material, até cobri-lo totalmente.

A escolha do fixador foi feita de acordo com os tratamentos subseqüentes (métodos de coloração incluindo histologia e histoquímica) utilizados. Em virtude disso, na fixação foi utilizado líquido fixador Dubosq-Brasil modificado (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983 - Etanol 80° GL – 600 ml; Ácido acético glacial – 150 ml e Formalina comercial – 250 ml).

Considerando-se a estrutura delicada dos tecidos dos moluscos, a desidratação em série crescente de etanol e em xilol e as demais etapas que antecederam à inclusão em parafina, foram realizadas progressivamente. As etapas do processamento histológico dos moluscos, com as respectivas substâncias utilizadas e o tempo de duração de cada etapa podem ser observadas na Tabela 1.

Para o estudo histológico da morfologia dos cistos de nematóides encontrados em *A. fulica*, foi utilizada a técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE). Para o estudo histoquímico dos cistos (grandes e pequenos), das larvas e do material amorfo contido no interior dos cistos dos moluscos infectados foram utilizadas as seguintes técnicas de coloração: para detecção de glicoconjugados (mucopolissacarídeos) foram utilizados o Alcian Blue em pH 2,5 (BANCROFT e STEVENS, 1996), para glicoconjugados ácidos e Alcian Blue/Ácido Periódico de Schiff (PAS) (BANCROFT e STEVENS, 1996), para glicoconjugados neutros. Para a determinação da composição química do mesmo material foram utilizados como métodos seletivos, para separar colágeno de músculo: orceína de Taenzer-Unna para fibras elásticas e tricrômico de Gomori para colágeno.

3.4.2 Processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os cistos e as larvas fixados em AFA foram hidratados em série decrescente de etanol (70, 50, 30 e 10%) por 15 minutos em cada concentração. O material foi lavado em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, três vezes, por 15 minutos cada lavagem. A seguir, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%, por 40 minutos e lavado em tampão cacodilato três vezes. O material foi então desidratado em série crescente de etanol (10, 30, 50, 70, 90, 3 x 100%), por 15 minutos em cada diluição e após desidratação o material foi seco em câmara de ponto crítico (CPD Balzers) usando CO₂.

O material seco foi montado em suportes metálicos, revestidos com fita dupla face de carbono e metalizado com ouro (Balzers).

As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 5310, usando 20kV e as imagens foram digitalizadas através do software SEMAfore (PINHEIRO et al., 2005).

Tabela 1: Etapas de processamento histológico da cavidade paleal de *Achatina fulica* até a inclusão em parafina, seguindo-se de corte com micrótomo, a coloração e a montagem em bálsamo do Canadá.

Etapas	Finalidades	Duração
1. Fixação: Dubosq-Brasil modificado.	Preservar a morfologia e a composição química dos tecidos, encontrados nos moluscos vivos.	Cerca de 12 horas, podendo chegar a 48 horas.
2. Desidratação: Série alcoólica crescente, indo do etanol 70° GL até o etanol absoluto.	Remover a água dos tecidos.	Cerca de 30 a 40 minutos, dependendo do tamanho do material.
3. Diafanização: Xilol, começando por uma mistura de etanol absoluto/xilol 1:1, segundo dois banhos em xilol puro.	Embeber o material em xilol, substância miscível com a parafina.	Cerca de 30 a 40 minutos, dependendo do tamanho do material.
4. Inclusão: Parafina realizada em estufa a 58° C.	A parafina penetra nos espaços intercelulares e no interior das células, impregnando todo o tecido.	Cerca de 30 a 40 minutos, dependendo do tamanho do material.
5. Confeção do bloco: O material será colocado em um molde contendo parafina e deixado fora da estufa, em temperatura ambiente, para que esta solidifique.	Obtenção do bloco de parafina, contendo o material incluído.	O tempo necessário para a solidificação.
6. Microtomia: Realizados em micrótomo Spencer "820" da American Optical Co.	Obtenção de cortes seriados com 5 a 7 µm de espessura.	Sem duração pré-determinada.

3.5 Classificação das Larvas de Nematóides Encontradas em *Achatina fulica*

Para o estudo da morfologia dos parasitos encontrados foram utilizados livros e chaves taxionômicas do CAB e literatura específica, como por exemplo, Yamaguti (1961), Anderson (1982).

Todas as informações colhidas eram registradas nas fichas de dissecação e o material residual era armazenado em local apropriado e encaminhado para incineração.

3.6 Fotografias e Fotomicrografias

As fotografias do procedimento de dissecação no laboratório e das análises em lupa eram feitas com câmera digital Kodak EasyShare C743; as fotomicrografias dos cortes histológicos e das larvas foram feitas com filme ISO 400 da Kodak, em microscópio de luz Dialux 20 EB Leitz Wetzlar Germany, com câmera fotográfica acoplada Olympus ou em microscópio de luz Olympus BX41 e microscópio de luz Hund Wetzlar H600, com câmera digital Nikon Coolpix 4.300 acoplada. Algumas fotomicrografias das larvas e a microscopia eletrônica de varredura foram feitas com câmera digital Olympus DP12 acoplada ao microscópio de luz Olympus BX51.

3.7 Análise Estatística

Foi utilizada para análise estatística, da relação da prevalência de infecção aos locais de coleta dos moluscos e à atividade antrópica, o Teste de Qui-quadrado de Pearson.

Para estabelecimento da relação entre o número de cistos encontrados e o tamanho do molusco, foi utilizado o programa GraphPad Prism, Prism Inc, v.5.00.288.

4 RESULTADOS

4.1 Distribuição dos Moluscos nas Duas Áreas de Coleta de *Achatina fulica*

Com relação a sua distribuição, foi possível observar que a ocorrência da espécie na área menos conservada foi maior que na área mais conservada, o que foi constatado durante as observações feitas nos dias de coleta, quando se contava o número de espécimes de *A. fulica* presentes em cada local (Tabela 2).

Tabela 2: Número de espécimes de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 coletados/observados por área de coleta. N = nº de coletas realizadas. X ± SD = média ± desvio-padrão.

Área de coleta	N	Nº total de moluscos X ± SD
Mais conservada	04	20,5 ± 02,99
Menos conservada	04	22,5 ± 11,65

Apesar de ter sido coletado um total de 131 moluscos, foi considerado para o referido estudo um número amostral de 30 moluscos para cada área de análise (mais e menos conservada), totalizando um n amostral de 60 moluscos, por ser um valor possível de se trabalhar, com bom intervalo de confiança (16,5-21,5) e precisão de 2,5% ($\Delta=0,025$). Permitindo, assim, confiabilidade nos resultados obtidos na pesquisa.

Para a seleção dos 60 moluscos utilizados no estudo, foram considerados aqueles com amplitude de variação do tamanho da concha de 50 a 110 mm.

As coletas realizadas durante ou próximas a períodos de chuva foram mais bem sucedidas, pois o número de indivíduos que puderam ser encontrados foi superior àquele verificado nos dias mais secos, o que já era esperado uma vez que temperaturas amenas são mais favoráveis para o molusco que se expõe mais ao ambiente.

Em ambas as áreas de coleta verificou-se, especialmente nos dias chuvosos, conchas de moluscos que haviam morrido vertidas para cima e cheias de água, o que poderia representar um criadouro em potencial, possibilitando a proliferação de mosquitos, como *Aedes sp.*

4.1.1 Área mais conservada

Nesse local, a atividade humana era menor, assim como os resíduos gerados pela presença do homem, porém existem algumas moradias (pequenos sítios), criações de animais e uma piscina natural que, aos fins de semana, é freqüentada por moradores do local. Como já mencionado, o número de espécimes de *A. fulica* encontrado na área mais conservada foi menor e os moluscos estavam distribuídos principalmente nas áreas que margeiam o Rio Dona Eugênia (Figura 4b), nos muros dos sítios (em sua maioria, pintados com cal - Figura 5a) e sobre a vegetação presente.

4.1.2 Área menos conservada

Nesse local, a atividade e a presença humana foram bastante significativas, assim como o número de resíduos gerados. Os espécimes de *A. fulica* se encontraram distribuídos nos mais distintos locais, como: sob madeiras velhas e úmidas (Figura 5b), restos de construção civil (Figura 5c), junto a plantas de jardins, dentro de canos de saída de esgotos (Figura 5d), em meio ao lixo (especialmente urbano) e convivendo lado a lado com adultos, crianças e animais domésticos. Nas áreas de criação de animais, como galinhas e porcos, as rações e restos alimentares oferecidos para a alimentação desses animais, também serviam de atrativo para os moluscos.

No Rio Dona Eugênia, os indivíduos estavam distribuídos próximos às margens, nos meios-fios das ruas, sobre a vegetação, aderidos à madeira de quiosques (bares) e pontes, e nos locais onde havia condições favoráveis, como amontoados de papelão, lixo, etc.



Figura 5: Caracterização dos locais de coleta dos moluscos. **a.** Espécime de *Achatina fulica* aderido a muro com cal de uma residência, Município de Mesquita, Rio de Janeiro. **b.** Espécime de *Achatina fulica* sobre madeira envelhecida e umedecida em área residencial, município de Mesquita, Rio de Janeiro. **c.** Espécimes de *Achatina fulica* em meio a restos de material de construção civil em área residencial, município de Mesquita, Rio de Janeiro. **d.** Espécime de *Achatina fulica* dentro de encanamentos de saída de esgoto, município de Mesquita, Rio de Janeiro.

4.2 Parasitismo em *Achatina fulica*

4.2.1 In ecção

Dos 60 moluscos dissecados pode-se observar a infecção por larvas de nematóides encistadas, na proporção de 1 espécime infectado para cada 4,3 não infectados, correspondendo a 23% do total de animais dissecados (Figura 6).

Não foi observado nenhum outro estágio de nematóide que não estivesse encistado e do mesmo modo não foram observados outros grupos de metazoários parasitos.

O maior número de cistos verificado por molusco foi de 130 e o menor de 01, em moluscos que apresentavam 106 e 55mm de comprimento de concha, respectivamente. A análise estatística evidenciou uma forte correlação positiva entre o tamanho do molusco e o número de cistos encontrados (Figura 7).

4.2.1.1 Relação da prevalência de in ecção aos locais de coleta dos moluscos e à atividade antrópica

É importante ressaltar que os espécimes infectados de ambas as áreas consideradas nesse estudo encontravam-se próximo ao Rio Dona Eugênia.

Espécimes de *A. fulica* infectados puderam ser observados com maior frequência na área menos conservada, apresentando 8 (oito) casos, e na área mais conservada 6 (seis) casos. Entretanto, a análise estatística revelou que não há diferença significativa ($P = 0,7845$) entre a prevalência de infecção para as duas áreas de coleta estudadas. Ou seja, a atividade antrópica não influenciou no número de moluscos infectados nas duas áreas de coleta.

4.2.2 Distribuição dos cistos de nematóides pela massa visceral de *Achatina fulica*

Os cistos puderam ser observados em diversos sítios na massa visceral dos moluscos, sendo a maior concentração verificada na cavidade paleal, 87%. Desse total, 49% dos cistos estavam na área mais vascularizada (Figura 8a) e 38% na menos vascularizada da cavidade (Figura 8b). Considerou-se como mais ou menos vascularizada, de acordo com a concentração de veias pulmonares observadas na região do tecido da cavidade paleal. Outros sítios de infecção foram registrados de forma menos frequente: 5,4% no intestino (Figura 9a); 2,7% no rim (Figura 9b); 2,7% na cavidade pericárdica (Figura 9c) e 1,8% na glândula digestiva (Figura 9d). A distribuição percentual comparativa dos cistos de nematóide por região anatômica do molusco pode ser observada na Figura 10. Os cistos encontravam-se, na maioria das vezes, superficialmente aderidos aos órgãos do molusco, porém também foi possível observá-los inseridos nos tecidos, especialmente nas veias pulmonares e no intestino (Figura 11a e b).

Dois moluscos coletados na área menos conservada, ao serem dissecados, apresentaram a cavidade paleal com características morfológicas distintas de todas as outras observadas, com um aspecto granulomatoso em praticamente toda a sua extensão, porém na observação feita à lupa durante a dissecação não foi possível determinar a sua natureza. O processamento histológico com a posterior análise dos cortes revelou se tratar de dezenas de cistos muito pequenos. A determinação da infecção dos moluscos e a quantificação dos cistos eram realizadas durante as dissecações através da observação macroscópica dos cistos, dessa forma, este número não pode ser considerado nas análises citadas anteriormente (Figura 12a e b).

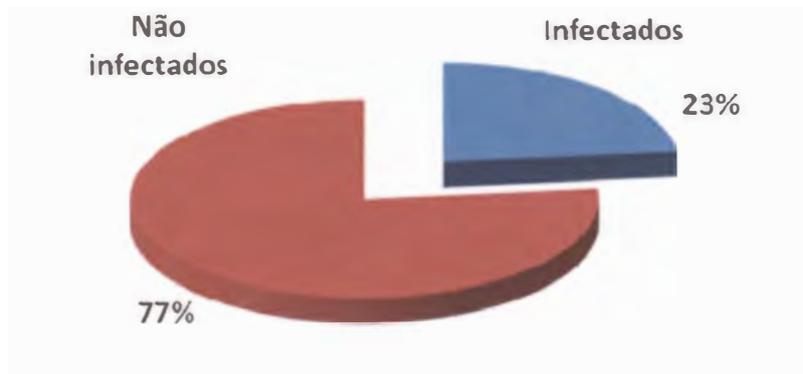


Figura 6: Frequência de espécimes de *Achatina fulica* infectados e não infectados nas duas áreas de coleta, mais conservada e menos conservada, do município de Mesquita, RJ.

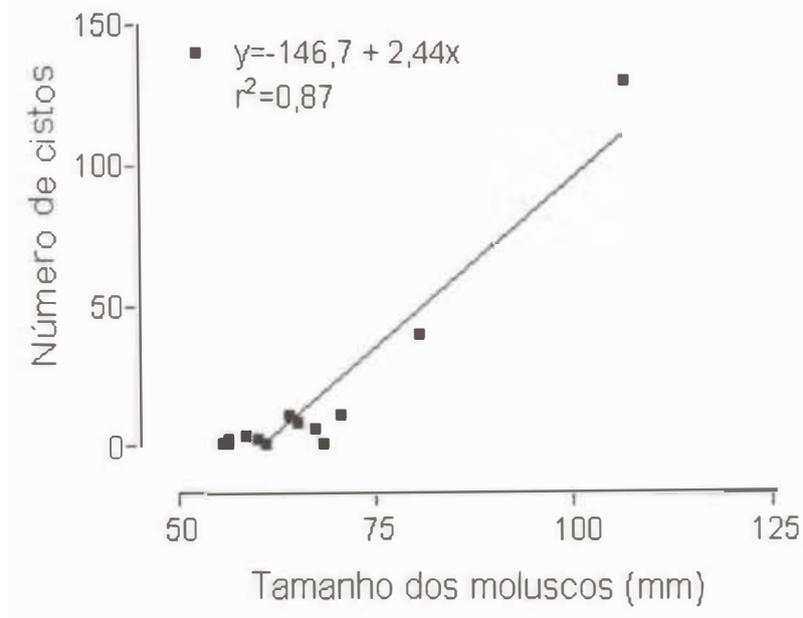


Figura 7: Relação entre o tamanho de *Achatina fulica* (em mm) e o número de cistos de nematóides.

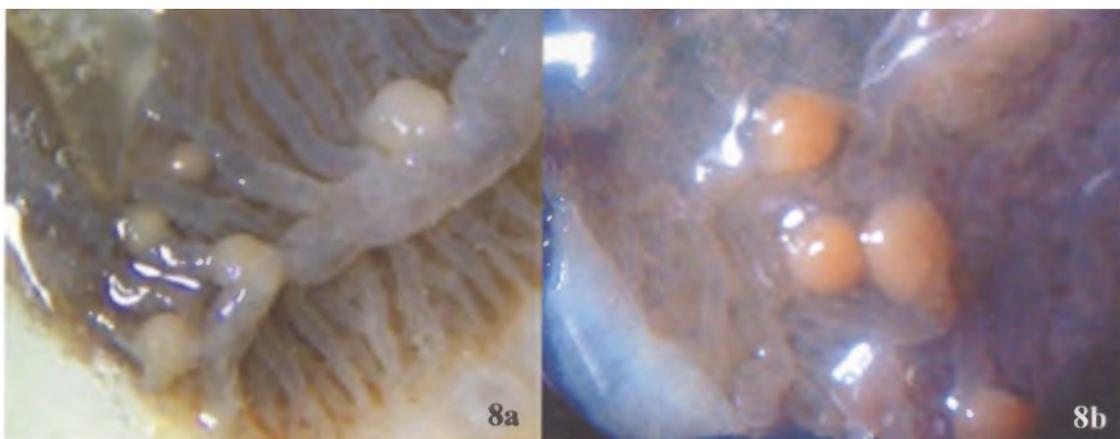


Figura 8: Distribuição dos cistos pela massa visceral de *Achatina fulica*. **a.** Área mais vascularizada da cavidade paleal de *Achatina fulica*. **b.** Área menos vascularizada da cavidade paleal de *Achatina fulica*.

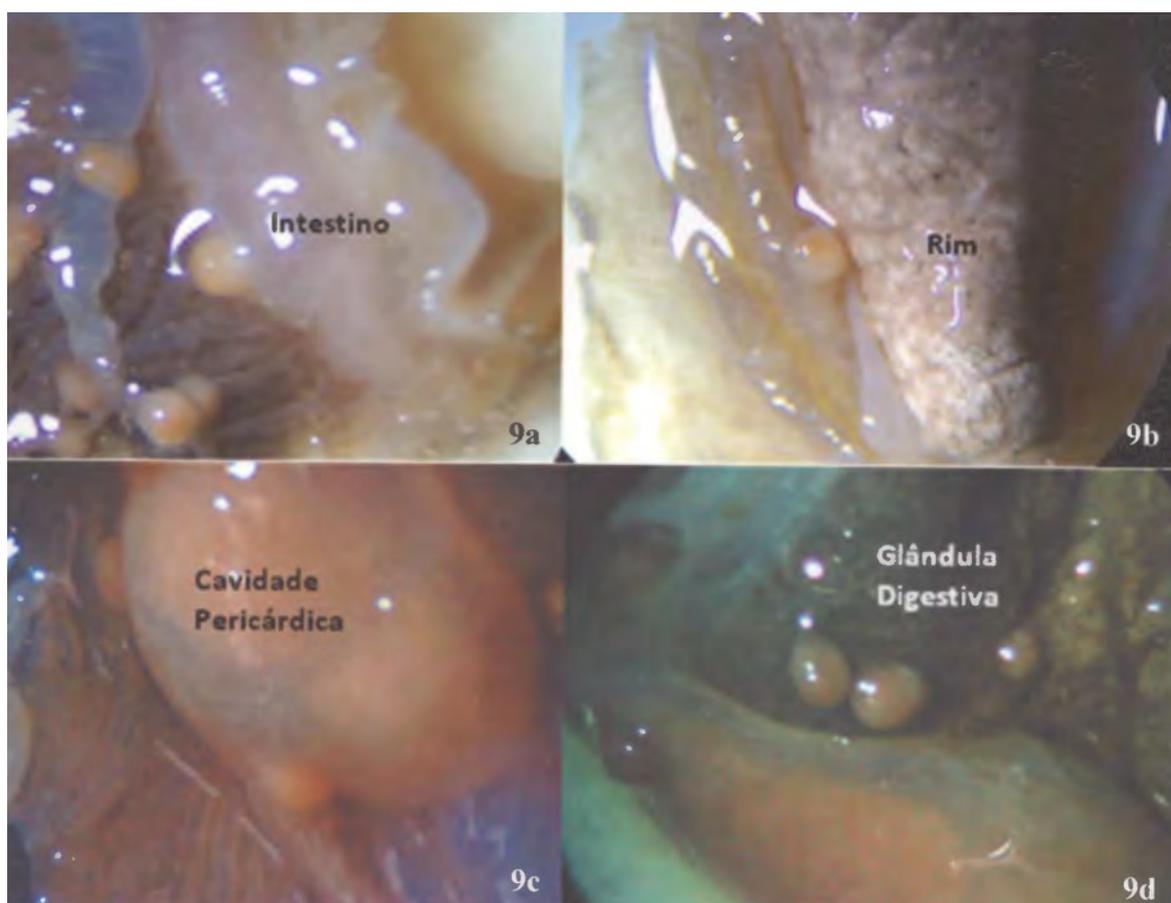


Figura 9: Cistos de nematóides encontrados em diferentes sítios de localização na cavidade paleal de *Achatina fulica*. a. Intestino. b. Rim. c. Cavidade Pericárdica. d. Glândula digestiva.

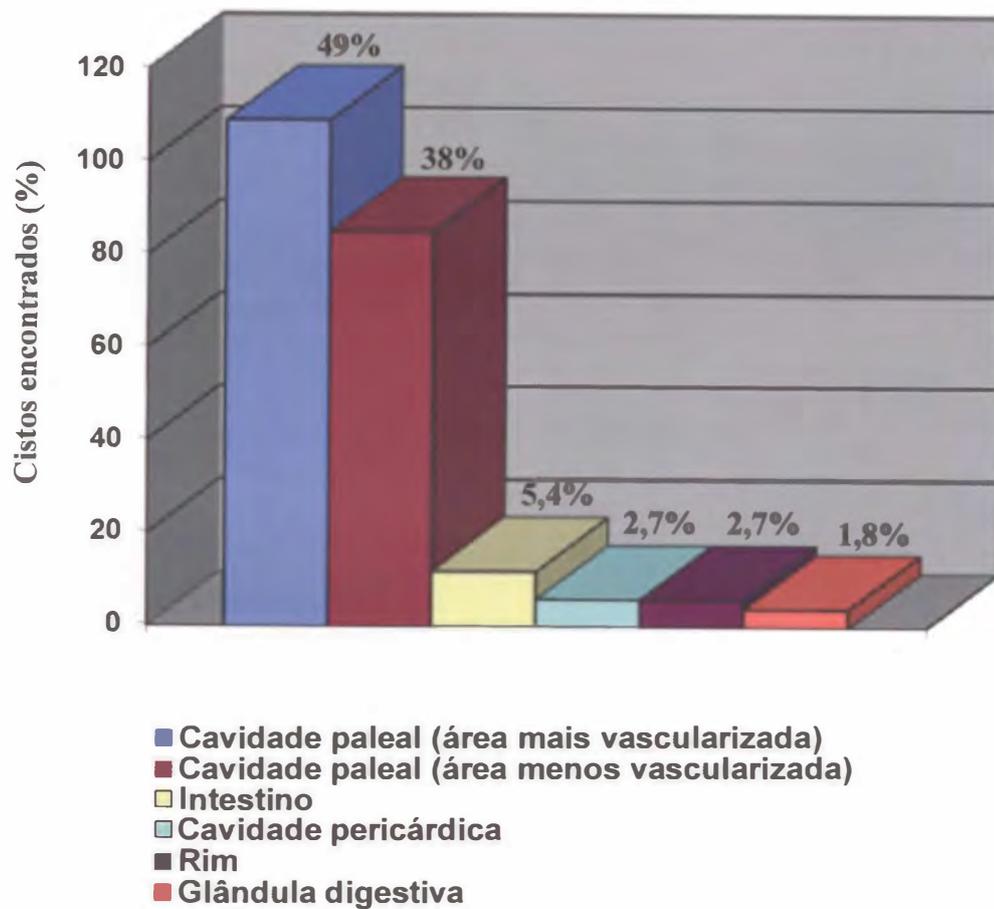


Figura 10: Frequência dos cistos com larvas de nematóides nos diferentes sítios de localização na massa visceral de *Achatina fulica* Bowdich, 1822.

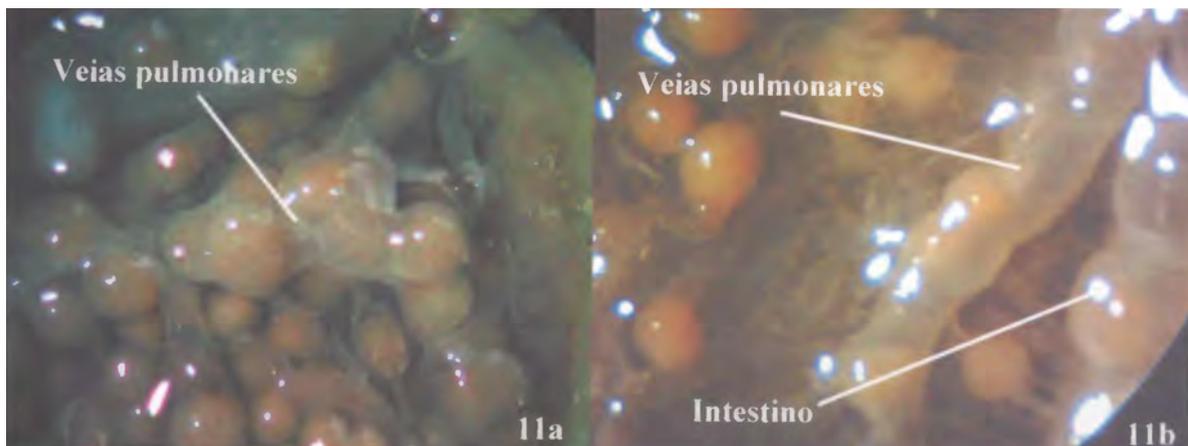


Figura 11: Distribuição dos cistos de nematóides pela massa visceral de *Achatina fulica*. **a.** Cistos de nematóides localizados dentro da veia pulmonar na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **b.** Cisto localizado dentro do intestino próximo à cavidade paleal de *Achatina fulica* e na veia pulmonar.

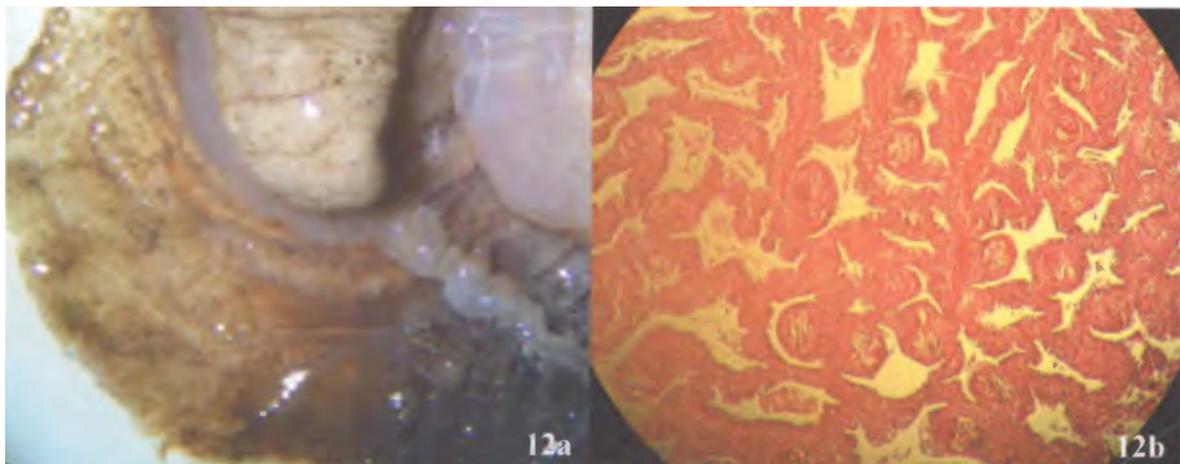


Figura 12: Cavidade paleal de *Achatina fulica* evidenciando a constituição granulomantosa do tecido. **a.** Cavidade paleal observada em lupa. **b.** Corte histológico da cavidade paleal observada ao estereomicroscópio evidenciando os inúmeros cistos.

4.2.3 Análise morfológica dos cistos e larvas de nematóides encontrados

4.2.3.1 Análise morfológica de cistos

Os cistos apresentavam formato esférico, coloração rosada e mediam de 0,97 a 1,57mm de diâmetro e na maioria das vezes com uma única larva que se encontrava enrolada e envolvida por um material amorfo, que poderia representar resíduos do metabolismo larval (Figura 13a, b, c e d).

Os cistos se rompiam facilmente sobre a pressão de um estilete, com a liberação da larva que na maioria das vezes se apresentava bastante ativa.

A coloração dos cistos e do material amorfo contido no seu interior, assim com o tamanho dos cistos variaram. No molusco que apresentou uma super infecção (130 cistos), a maioria dos cistos era grande e apresentava uma coloração mais escura que a de todos os outros cistos já observados, assim como o material contido em seu interior que se apresentava amarelo escuro e bem mais consistente (denso) do que nos demais cistos (Figura 14a e b).

Não foi verificada uma relação entre a variação observada no tamanho dos cistos com os diferentes sítios de infecção, nem com as áreas de coleta.

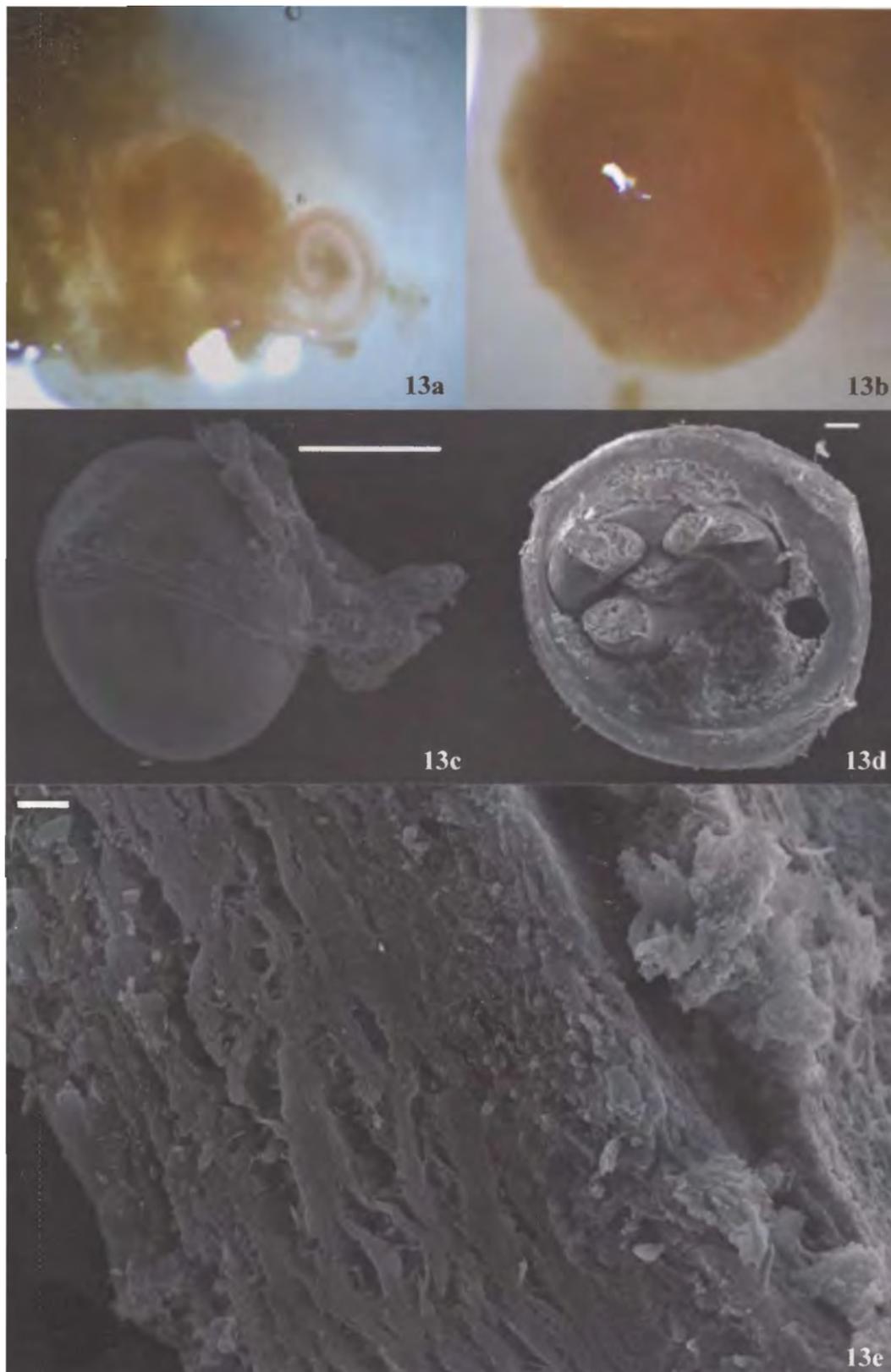


Figura 13: *Análise morfológica dos cistos encontrados na cavidade paleal de Achatina fulica.*
a. Cisto contendo larva de nematóide. **b.** Morfologia cisto destacando suas características macroscópicas. **c.** Ultraestrutura da superfície externa do cisto (MEV). Barra de escala=500micrômetros. **d.** Ultraestrura do cisto em corte, evidenciando a presença da larva de nematóide e o material amorfo em seu interior (MEV). Barra de escala=100micrômetros. **e.** Ultraestrutura do cisto evidenciando a espessa parede (MEV). Barra de escala=10micrômetros.

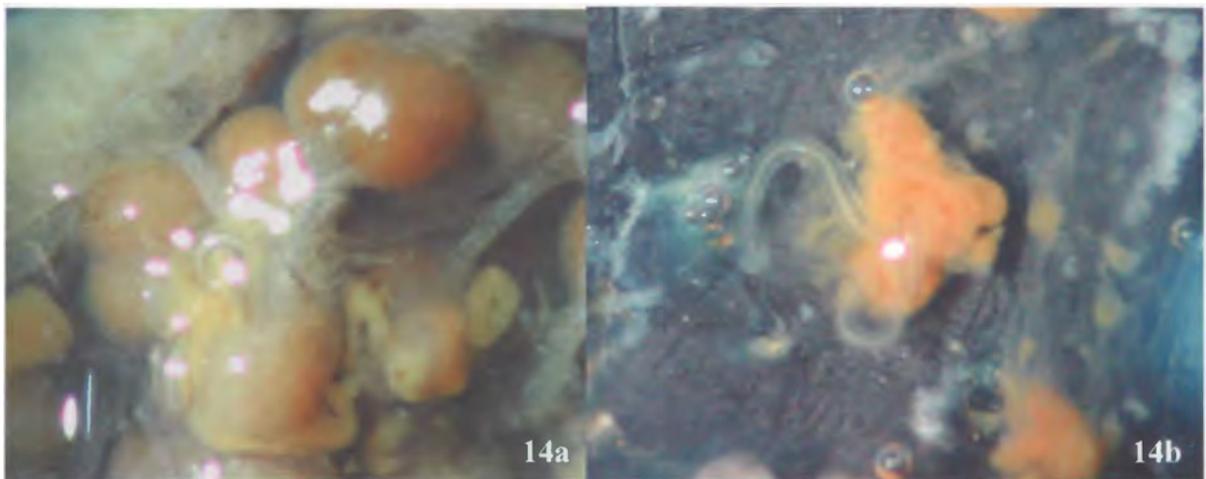


Figura 14: Análise morfológica dos cistos encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica* que apresentaram constituição e coloração diferenciada. **a.** Cistos evidenciando o grande tamanho e a coloração mais escura. **b.** Cisto liberando larva de grande tamanho e apresentando material amorfo com coloração mais escura.

4.2.3.2 Análise morfológica das larvas de nematóides encontrados

Dentre os 14 moluscos (23%) que estavam infectados, foram encontradas 222 larvas encistadas. Destas larvas, 30 foram utilizadas no estudo morfológico.

O comprimento total das larvas variou de 2,57 a 5,8mm e as mesmas foram classificadas em três grupos: pequeno – até 3,5mm; médio – de 3,53 a 4,5mm e grande - acima de 4,52mm. O comprimento médio das larvas nos três grupos foi de 2,85; 3,87 e 5,23mm, respectivamente e a média total de 4,2mm (Tabela 3).

As larvas apresentavam cutícula branca, brilhante (Figura 15a) e estriada no sentido transversal (Figura 15b) e linha lateral (Figura 15c) até a extremidade posterior do corpo.

Na extremidade anterior, observa-se a boca provida de três lábios, com presença de estruturas sensoriais: papilas e anfídios (Figura 15d) e seguida por um esôfago musculoso que apresentou comprimento médio de 0,61mm e que termina em um bulbo esofágico. O anel nervoso foi observado no terço médio do esôfago (Figura 15e), onde também pode ser observado o esfíncter pré-esofágico. O intestino termina em uma abertura localizada próximo da extremidade posterior (Figuras 16a).

A cauda se forma a partir da abertura posterior do sistema digestivo e apresenta dois tipos de terminação: uma curta ou abrupta (Figura 16b e c) e outra longa ou que afina gradativamente (Figura 16d e e). Do total de larvas examinadas, houve predominância do tipo de cauda curta, presente em 19 larvas. A distância entre esta abertura e o final da cauda variou de 0,15 a 0,42mm de comprimento.

Apesar da variação no comprimento, as larvas apresentavam estruturas comuns. Porém, não foi possível determinar o estágio de desenvolvimento das larvas, provavelmente sejam L₃, devido aos seus caracteres morfológicos.

Tabela 3: Medidas (em mm) dos três grupos (pequeno, médio e grande) de larvas de nematóides encontradas em *Achatina fulica*. CT – Comprimento Total; BA – Distância da abertura bucal até o anel nervoso; E – Comprimento do esôfago; C – Distância da abertura posterior do sistema digestivo até o final da cauda.

	CT	BA	E	C
Pequeno	2,84±0,29	*	0,54±0,05	0,24±0,05
Médio	3,87±0,33	0,18*	0,6±0,38	0,23±0,04
Grande	5,23±0,37	0,3±0,01*	0,67±0,04	0,32±0,08

* Não foi possível observar o posicionamento do anel nervoso na larva classificada como pequena. Na larva média observou-se somente em uma das larvas e na grande, em duas.

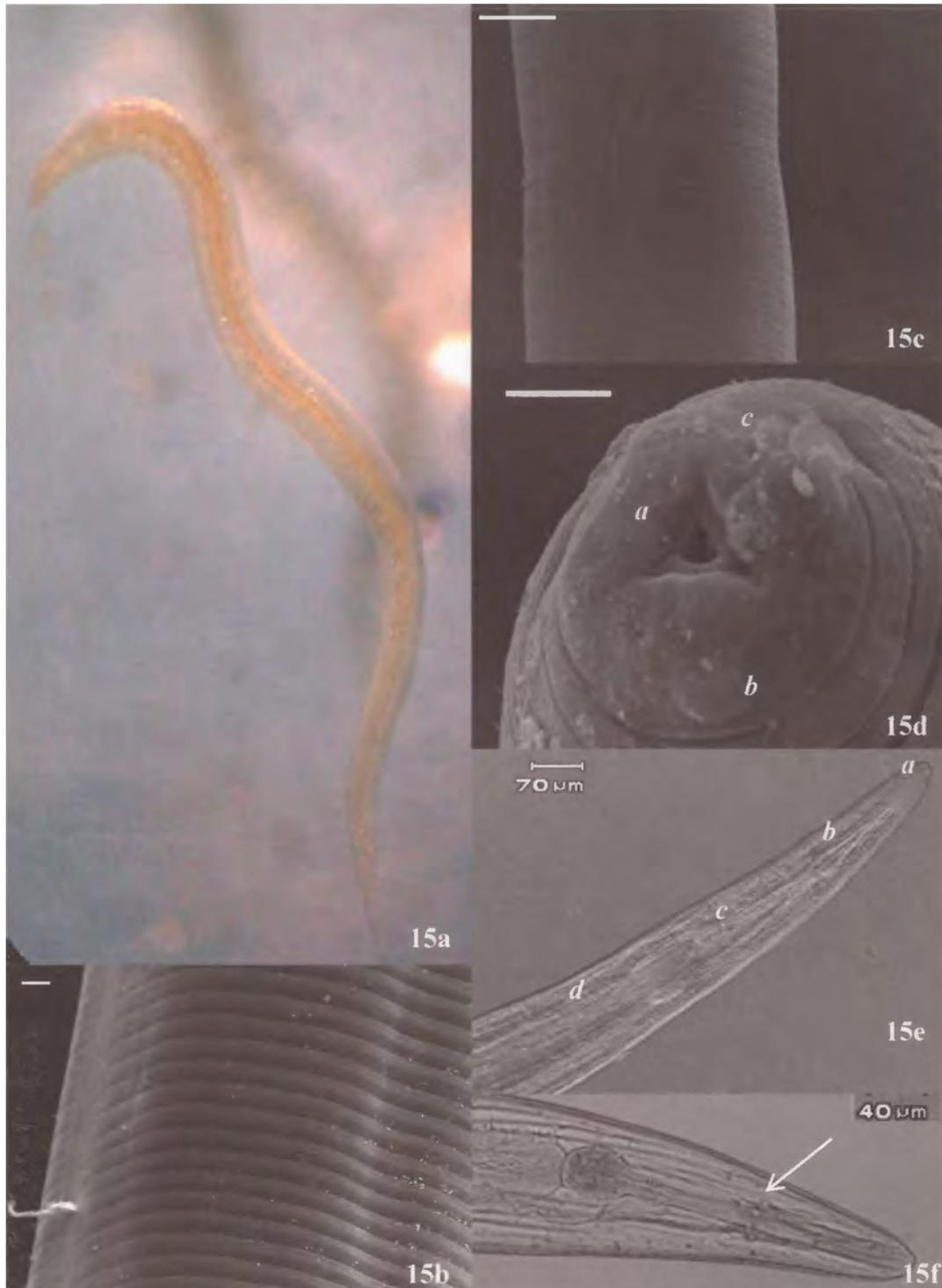


Figura 15: Análise morfológica das larvas de nematóides encontrados em *Achatina fulica*. **a.** Morfologia externa da larva retirada do interior de um cisto. **b.** Detalhe das estriações transversais no corpo da larva (MEV). Barra de escala=10 micrômetros. **c.** Detalhe da linha lateral em larva retirada do cisto (MEV). Barra de escala=10 micrômetros. **d.** Extremidade anterior da larva – *a.* lábio trirradiado; *b.* papila; *c.* anfidio (MEV). Barra de escala=10 micrômetros. **e.** Extremidade anterior da larva – *a.* boca; *b.* anel nervoso; *c.* esôfago; *d.* intestino (ML). Barra de escala=70micrômetros. **f.** Extremidade anterior da larva evidenciando o esfíncter pré-esofageano (ML). Barra de escala=40micrômetros.

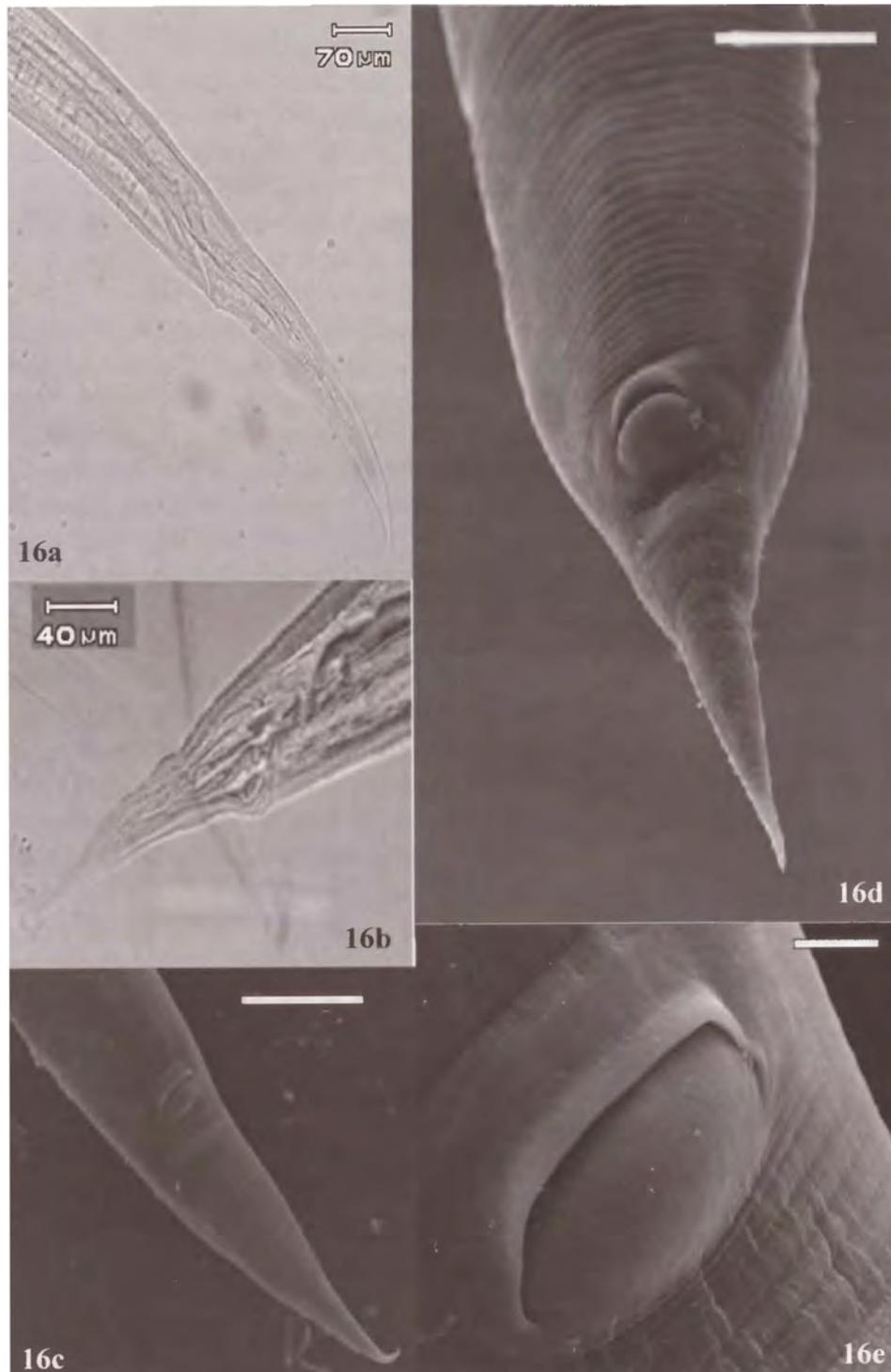


Figura 16: Análise morfológica das larvas de nematóides encontrados em *Achatina fulica*. **a.** Morfologia da cauda com terminação longa ou que afina gradativamente (ML). **b.** Morfologia da cauda com terminação curta ou abrupta (ML). **c.** Ultraestrutura da região posterior de larva com terminação longa ou que afina gradativamente (MEV). Barra de escala= 100micrômetros. **d.** Ultraestrutura da região posterior de larva com terminação curta ou abrupta (MEV). Barra de escala=50micrômetros. **e.** Região da abertura posterior do aparelho digestivo (MEV). Barra de escala=10 micrômetros.

4.2.4 Composição química do cisto, da larva e do material amorfo dos nematóides encontrados em *Achatina fulica*

A composição de glicoconjugados e tecido elástico do cisto, da larva e do material amorfo dos nematóides encontrados no estudo demonstrada através dos métodos histoquímicos e seletivos de cortes histológicos da cavidade paleal de espécimes de *A. fulica* infectados, encontra-se na Tabela 4. Os cistos de formato esférico apresentavam uma larva enrolada, de tamanho proporcional ao do cisto, envolta por um material amorfo (Figura 17a e b). Os cistos grandes apresentaram uma parede mais espessa e constituída por 3 camadas: uma externa, uma mediana e uma interna (Figura 18a). Porém não foi possível observar a divisão do cisto em camadas nos de menor tamanho. O cisto pode ser observado aderido tanto na superfície do tecido da cavidade paleal do molusco, como inserido neste mesmo tecido.

Uma reação fraca ao alcian blue pH 2,5% foi observada no material amorfo dos cistos grandes sugerindo a presença de glicoconjugados ácidos. Nas reações para detecção de glicoconjugados neutros, o cisto apresentou uma reação PAS-positiva fraca, a larva reagiu fortemente ao PAS nos cistos dos dois tamanhos, grande e pequeno, o material amorfo apresentou uma reação mais forte de acordo com o tamanho do cisto (Figura 20a e b).

A reação do material amorfo ao PAS foi generalizada e presente em todos os cistos observados. Já com o alcian blue, só houve reação no material amorfo de alguns cistos, a qual foi considerada fraca.

Com os testes seletivos empregados para a evidenciação de tecido elástico, observou-se que não houve reação com a orceína de Taenzer-Unna para nenhuma das estruturas estudadas e uma reação fortemente positiva ao tricrômio de Gomori para a cutícula da larva, sugerindo presença de colágeno e/ou elastina (Figura 18b), e uma coloração vermelho intenso logo abaixo da cutícula, correspondendo à camada muscular (Figura 19a), fato que dificultou uma melhor visualização da reação para cutícula da larva. Houve uma reação positiva forte para o cisto (Figura 19b), porém o material amorfo não reagiu.

Tabela 4: Composição química do cisto (pequeno e grande), da larva e do material amorfo de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*.

Tamanho do cisto	Estruturas	Divisão do cisto em camadas	Alcian blue pH 2,5	PAS	Orceína de Taenzer-Unna	Tricrômio de Gomori
Pequeno	Cisto*		-	+	-	++
	Larva		-	++	-	***
	Material amorfo		-**	+	-	-
Grande		Externa	-	+	-	++
	Cisto	Mediana	-	-	-	+
		Interna	-	+	-	++
	Larva		-	++	-	+++****
	Material amorfo		+	++	-	-

- = Não reagiu
 + = Reação positiva fraca
 ++ = Reação positiva forte
 +++ = Reação positiva muito forte

*Não foi possível observar a divisão em camadas nos cistos pequenos.

** Observado dentro dos cistos pequenos, porém não se constituiu especificamente em material amorfo.

***Reação intensa para camada muscular da larva.

**** Referente à cutícula da larva.

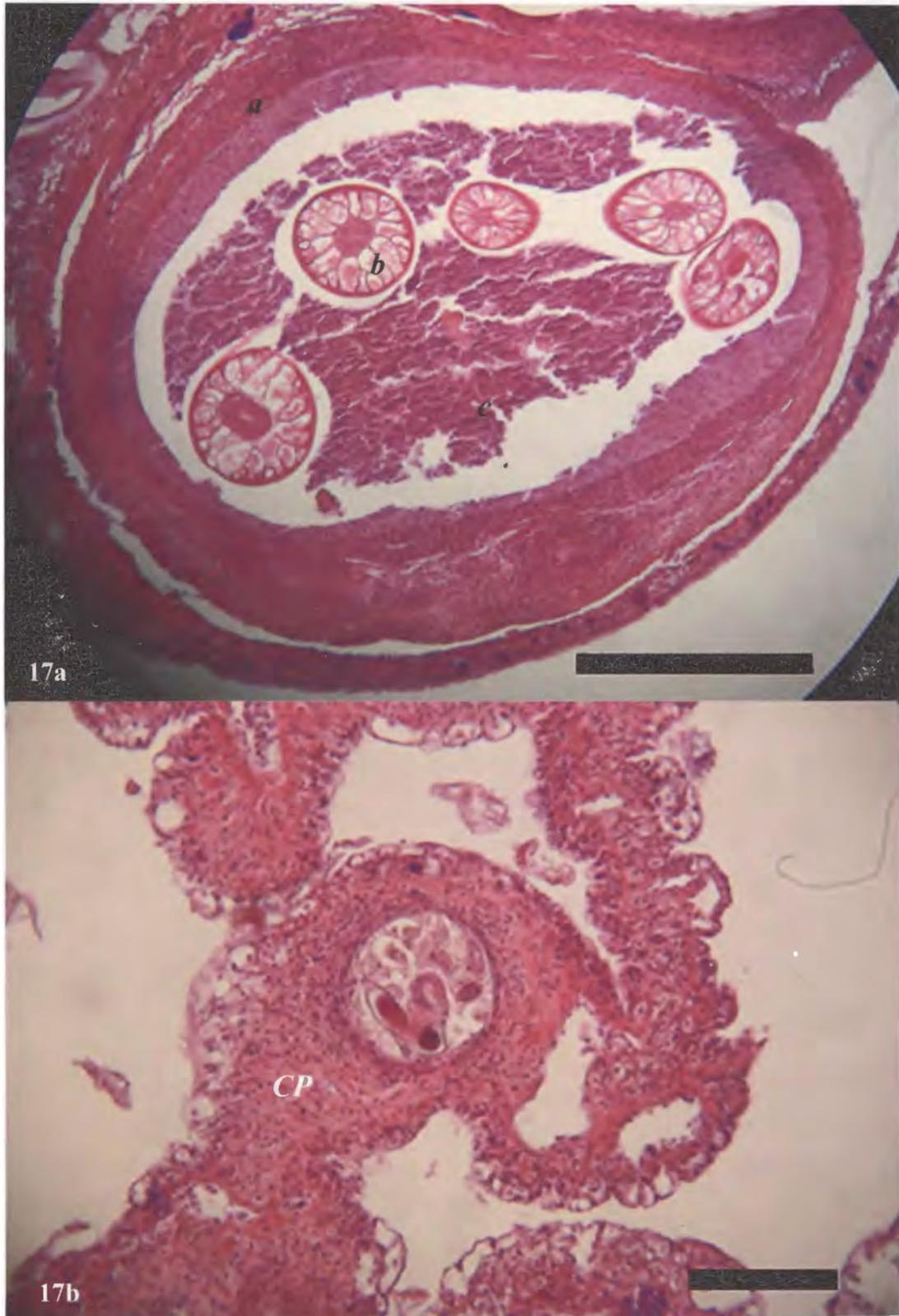


Figura 17: Cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Cisto grande evidenciando: *a.* parede do cisto; *b.* larva; *c.* material amorfo. Coloração: HE. Objetiva: 10x. Barra de escala=500micrômetros. **b.** Cisto pequeno evidenciando a cavidade paleal (CP) onde está inserido. Coloração: HE. Objetiva: 20x. Barra de escala=150micrômetros.

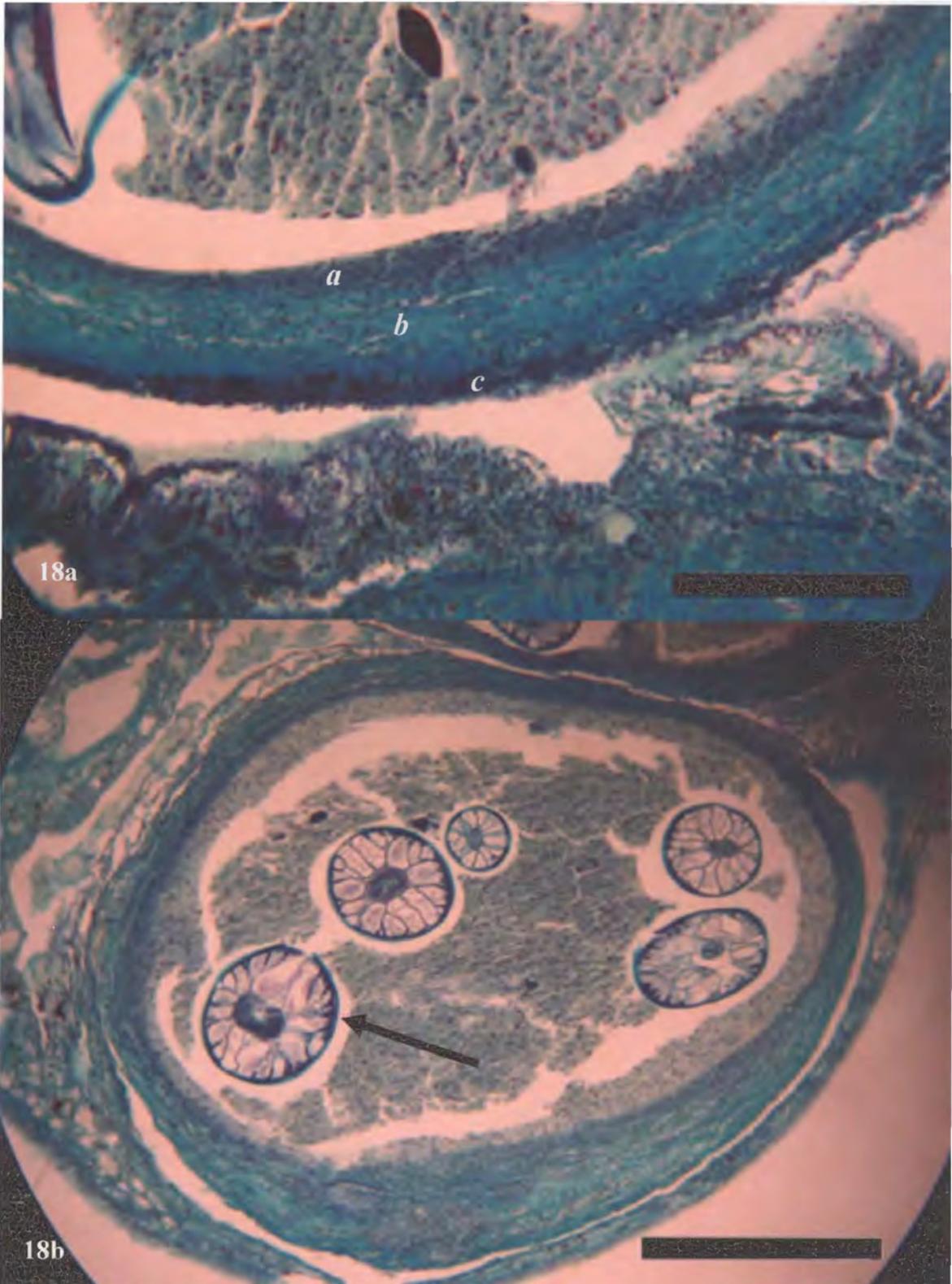


Figura 18: Cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Constituição da parede do cisto: *a.* camada interna; *b.* camada mediana; *c.* camada externa. Coloração: Tricrômio de Gomori. Objetiva: 20x. Barra de escala=200micrômetros. **b.** Cisto grande evidenciando a reação da cutícula da larva. Coloração: Tricrômio de Gomori. Objetiva: 20x. Barra de escala=500micrômetros.

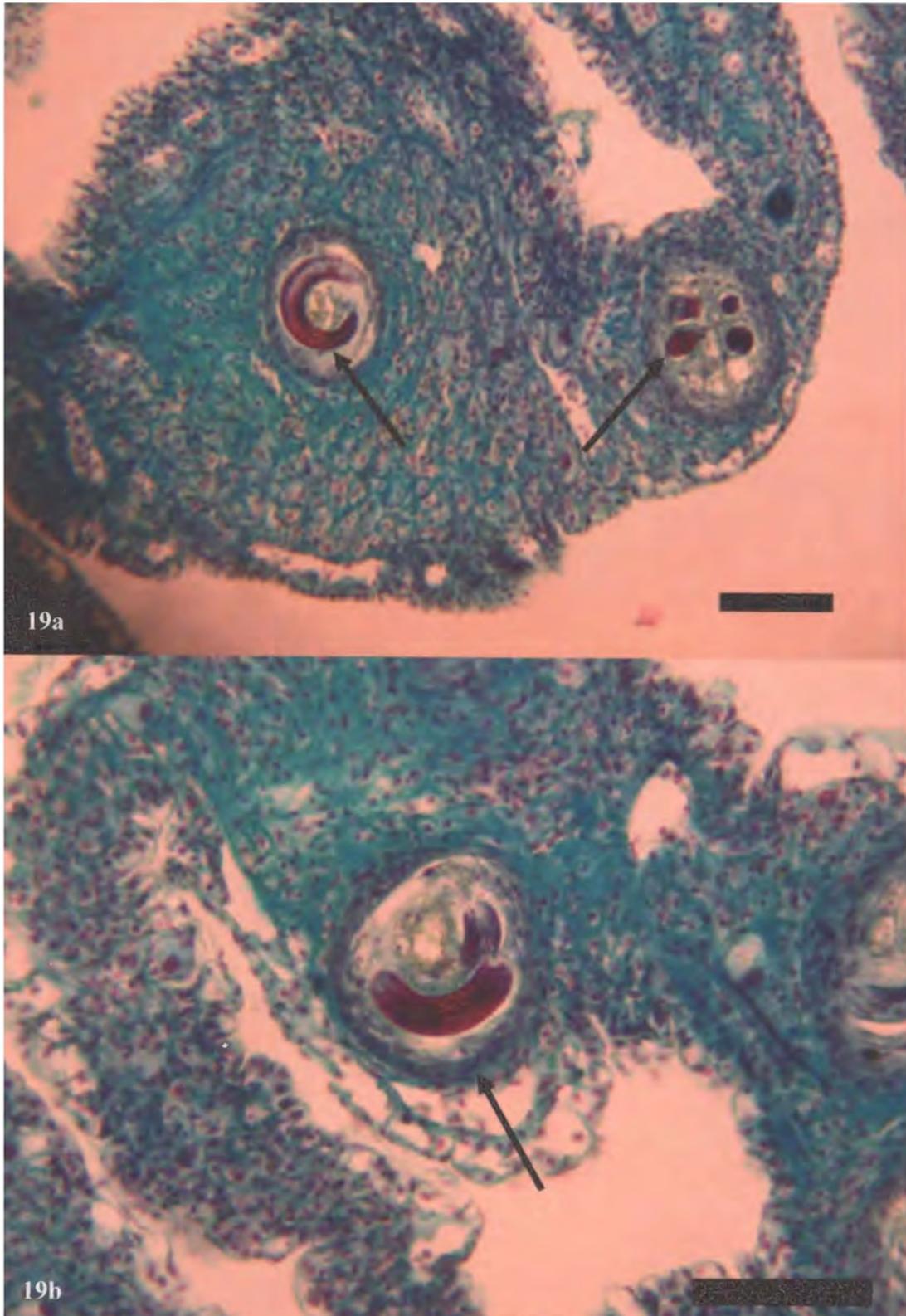


Figura 19: Cistos pequenos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Cistos evidenciando a coloração vermelho intenso das larvas. Coloração: Tricrômio de Gomori. Objetiva: 10x/Zoom 2x. Barra de escala=200micrômetros. **b.** Cisto evidenciando a reação de sua parede. Coloração: Tricrômio de Gomori. Objetiva: 20x/Zoom 2x. Barra de escala=150micrômetros.

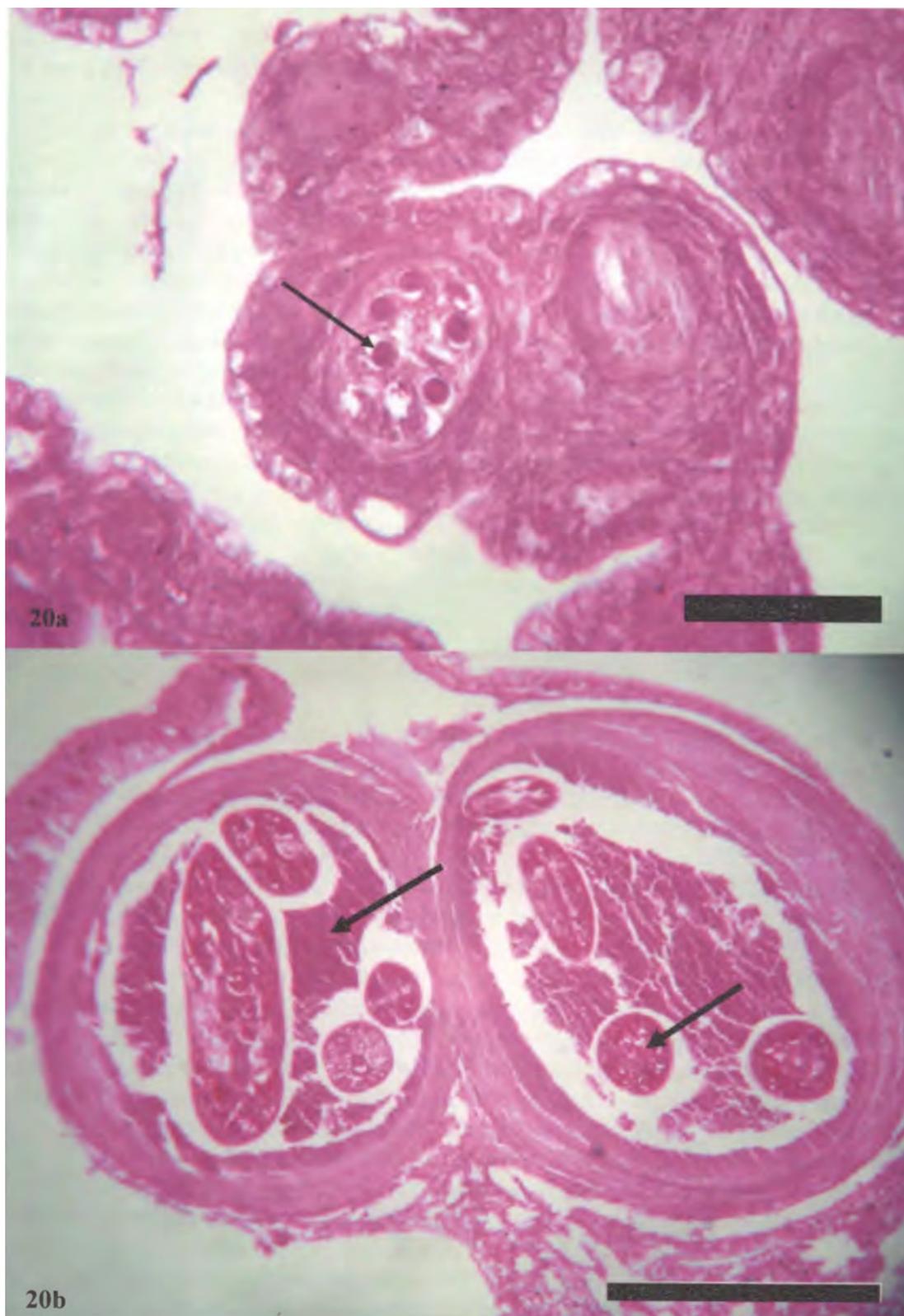


Figura 20: Cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Cisto pequeno evidenciando a reação da larva. Coloração: PAS. Objetiva: 10x/Zoom 3x. Barra de escala=150micrômetros. **b.** Cisto grande evidenciando a reação do material amorfo e da larva. Coloração: PAS. Objetiva: 4x/Zoom 2x. Barra de escala=1000micrômetros.

5 DISCUSSÃO

5.1 Locais de Coleta dos Moluscos e a Atividade Antrópica

Achatina fulica foi registrada em 23 dos 26 estados brasileiros, incluindo o Distrito Federal. Embora os registros ainda estejam incompletos, do total de 5.561 municípios distribuídos por todo o Brasil, *A. fulica* foi registrada em 439 deles. Provavelmente a dispersão do molusco por quase todo o país seguiu padrão semelhante ao de expansão inicial ocorrido no estado do Paraná, ou seja, distribuição para fins comerciais que coincidiu com a liberação dos caramujos em ambientes naturais após o abandono das criações. Dentre os estados com maior número de infestação, boa parte fica no Sudeste e Centro-Oeste do país, sendo que o estado do Rio de Janeiro aparece em quarto lugar com 57 de seus municípios com registro da presença do molusco (THIENGO et al. 2007b).

No estado do Rio de Janeiro houve uma crescente e rápida expansão de *A. fulica*, tendo em junho de 2002 o registro da ocorrência em oito municípios, cinco meses depois, em outros oito municípios. Em janeiro de 2005 foi registrada a dispersão em 39 e em junho de 2006 foram registrados em 57 dos 92 municípios. O município de Mesquita, localizado no Rio de Janeiro, segundo Thiengo et al (2007b) apresenta registro da ocorrência de *A. fulica* a partir de novembro de 2002 (Figura 21) o que corrobora os resultados obtidos por Franco (2005) que realizou estudo sobre impactos ambientais causados pela introdução de *A. fulica* neste município.

5.1.1 Atividade antrópica e espécies exóticas invasoras

Espécies exóticas invasoras não apenas sobrevivem e se adaptam ao novo meio, mas passam a exercer processos de dominância sobre a biodiversidade nativa, alteram características naturais e o funcionamento de processos ecológicos, incorrendo em quebra de resiliência de ecossistemas naturais, redução de populações de espécies nativas e perda efetiva de biodiversidade (ZILLER, 2005).

O fluxo de espécies no planeta aumentou intensamente em função do comércio mundial e do trânsito de passageiros no transporte marítimo e aéreo, mas a chegada de novas espécies deve-se principalmente a introduções voluntárias para uso humano.

Para que espécies exóticas possam chegar a um novo ambiente, precisam ultrapassar algumas barreiras. A primeira é a barreira geográfica que naturalmente confina a espécie à sua área de distribuição. Passada esta, enfrenta barreiras ambientais que na maior parte dos casos inviabilizam a sua sobrevivência. Por essa razão, espécies que são introduzidas, diversas vezes, por interesse comercial e cultivadas sob cuidados especiais, apresentam maiores chances de estabelecimento. Ultrapassadas estas barreiras, há ainda uma terceira, a dispersão da espécie estabelecida. Se não há meios de dispersão eficientes, a espécie tem menos chance de se tornar invasora. O auxílio humano é também elemento comum neste caso. Quanto maior o número de focos de introduções sucessivas, mais ampla e mais difícil de controlar a invasão (MOODY e MACK (1988) in ZILLER (2005).

Ainda que poucas espécies dentre os grandes números de introduções consigam sobrepor todas essas barreiras, um pequeno percentual o faz, com ou sem ajuda humana. O ponto importante no estabelecimento de espécies invasoras é que elas podem ser em pequeno número, porém a amplitude dos impactos é de grandes proporções. O grande agravante é que invasões biológicas não desaparecem por conta própria em médio ou longo prazos. Ao contrário de outros impactos ambientais comuns, como derramamentos de produtos tóxicos,

apenas se agravam ao longo do tempo e somente são reversíveis ou controláveis com interferência humana. E é nesta situação que se encontra a espécie de molusco terrestre *Achatina fulica*, que foi introduzida pelo homem no Brasil e diferente de outras espécies invasoras, se adaptou muito bem às condições locais e tem causado sérios impactos ao meio ambiente.

Atualmente o Brasil enfrenta a fase explosiva da invasão. Densas populações de *A. fulica*, geralmente com muitos espécimes de grande tamanho, ocorrem em áreas urbanas, principalmente em jardins ornamentais e vegetais (THIENGO et al., 2007b).

Assim como, em outros locais, *A. fulica* se dispersou consideravelmente no município de Mesquita, RJ. Provavelmente, a espécie invasora tenha chegado primeiramente na área menos conservada e, depois, tenha sido levada para a área mais conservada, especialmente por veículos que trafegam em ambas as áreas como: carroças e automóveis, que saem das áreas menos conservadas e chegam até a mais conservada, principalmente na represa (poço) existente no local, aonde as pessoas vão para desfrutar de momentos de lazer e acabam por disseminar o molusco, muitas das vezes, involuntariamente.

O nível de distribuição mais elevado do molusco na área menos conservada está relacionado principalmente à atividade humana, que nesta área também é maior. Esta área antrópica tem oferecido ao molusco excelentes condições de vida que vão desde disponibilidade farta de alimento à variedade de locais que acabam servindo de esconderijo/abrigo e são propícios para sua instalação e reprodução, fato este também observado por Thiengo et al. (2007b). Segundo Colley e Fischer (2004), foi constatado que na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, PR, esses “espécimes só ocorreram em ambiente antrópico, principalmente em locais que apresentavam mais cercas vivas, solo úmido e lixo”, ou seja, um ambiente bem similar ao dos locais onde foi realizada a presente pesquisa.

Outro fato relevante é que a área menos conservada está num local muito carente do município, onde as pessoas têm pouca informação e acesso às condições básicas de saneamento, principalmente ao destino do esgoto doméstico, que geralmente é lançado nos rios ou no próprio quintal, juntamente com seus resíduos (lixo), tanto alimentares quanto restos de construção civil, etc. Esses fatores têm contribuído para constituição de ambientes favoráveis para o estabelecimento de *A. fulica* e também de roedores (ratos domésticos). Tal fato chama a atenção dos órgãos de saúde pública devido a coexistência dos hospedeiros (intermediários e definitivos) da parasitose que tanto preocupa quanto a sua instalação, a angiostrongilíase.

A ocorrência desses moluscos escondidos ou abrigados em frestas de rochas, muros, escombros, vegetação (árvores, jardins, terrenos baldios), restos de lixo, telha, entulho, próximo aos rios, dentro dos canos de saída de esgoto (podendo causar sua obstrução) e principalmente nos dias de chuva, dá-se devido às características do animal que tem preferência por ambientes úmidos, sendo encontrados, portanto, em maior atividade durante a noite e utilizando estes ambientes para se protegerem dos raios solares (BARBOSA et al., 2002). A presença de espécimes de *A. fulica* em muros com cal, verificada no presente estudo, com pedaços de reboco com caiação ou de cal extinta, endurecida, provavelmente esteja relacionada à necessidade de cálcio pelo molusco para seus processos fisiológicos, como reparo da concha e reprodução conforme observado por Paiva (2004).

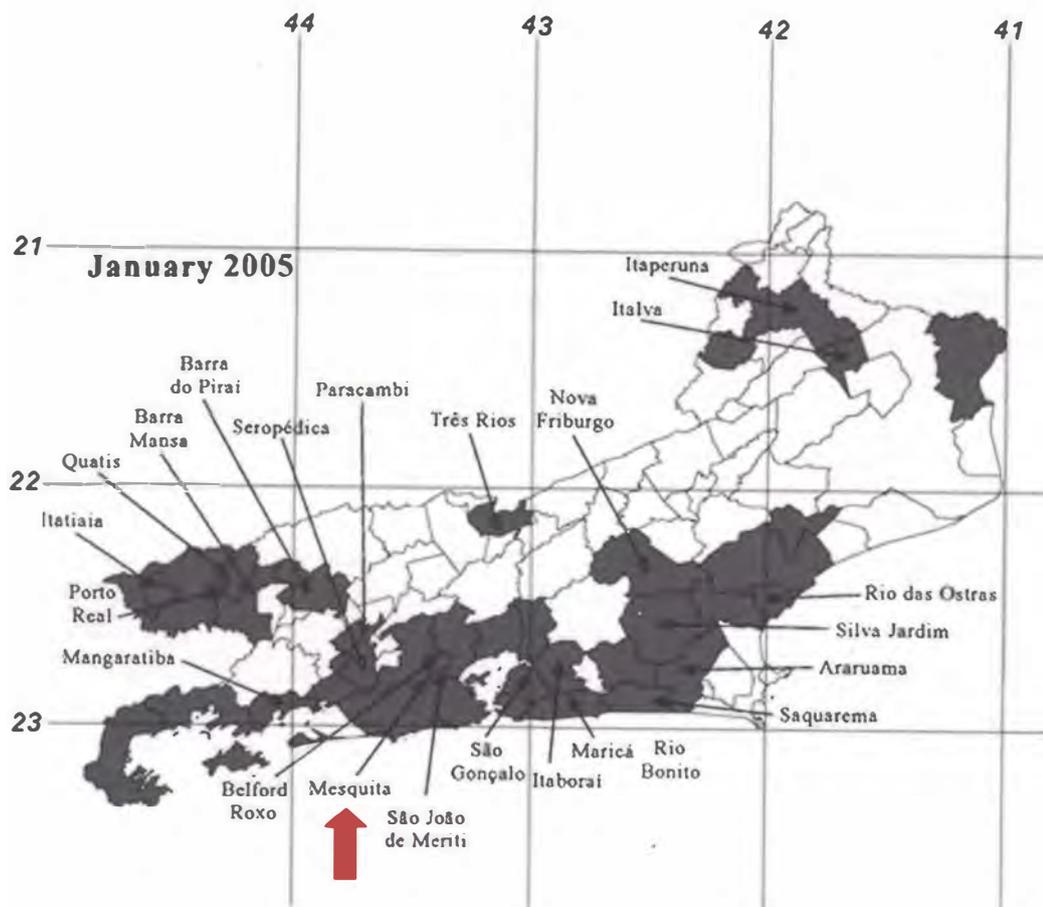


Figura 21: Distribuição de *Achatina fulica* no estado do Rio de Janeiro, em janeiro de 2005, com municípios infestados escurecidos e os infestados desde novembro de 2002 com indicação de seus nomes. Destaque para o município de Mesquita, RJ.

Fonte: THIENGO et al., 2007a.

5.2 Controle

De forma geral, em comparação ao estudo de Franco realizado em 2005, que considerou locais de coleta de *A. fulica* similares aos deste estudo, o número de espécimes, assim como o tamanho do molusco encontrados no ambiente encontra-se reduzido. Provavelmente este fato deve-se às campanhas de combate já realizadas na região e pela conscientização da comunidade local que tem buscado formas de eliminação do molusco.

Muitas vezes, apesar da correta instrução por parte dos órgãos competentes, o combate não acontece de forma adequada. Foi possível observar e registrar relatos de moradores que afirmaram jogar sal sobre os moluscos ou recolhê-los (vivos) em sacolas plásticas para jogarem no lixo. Formas incorretas de identificação e eliminação/descarte do molusco podem ocasionar danos à malacofauna nativa, contribuir para uma maior dispersão do molusco, causar danos ao meio ambiente e, ainda, gerar outros problemas de saúde pública decorrentes desse tipo de ação (THIENGO, 2004; PAIVA, 2004).

Os moradores que mudaram alguns hábitos, como: não deixar entulhos ou restos de construção civil e alimentares próximos à residência, armazenar bem o lixo e a catação manual do molusco seguida por incineração, conseguiram atingir uma redução no número de espécimes observados nos arredores de sua residência. Tal fato vem ressaltar a importância da atividade antrópica nos dois sentidos da dispersão do molusco, podendo contribuir para seu aumento ou controle.

5.3 Parasitismo em *Achatina fulica*

5.3.1 Infecção

No presente estudo a maioria dos moluscos infectados se encontrava na área menos conservada o que diferencia dos resultados obtidos por Franco (2005) que realizou um estudo similar e observou que a maioria dos moluscos infectados encontrava-se na área mais conservada. Franco (2005) relacionou a infecção à proximidade ao Rio Dona Eugênia, o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo uma vez que todos os moluscos coletados e infectados encontravam-se ao longo da extensão mais e menos conservada do referido rio. Também sugere que o rio estaria agindo como um meio de dispersão do molusco, assim como, área de contato de *A. fulica* com o hospedeiro definitivo do parasito encontrado. Este fato poderia justificar o resultado não significativo da análise estatística quanto à relação da intensidade de infecção aos locais de coleta dos moluscos e à atividade antrópica nas duas áreas de coleta.

É interessante ressaltar que a prevalência de infecção encontrada nas duas áreas de coleta, 23%, foi superior à registrada por Franco (2005), 19%. Isso poderia evidenciar que o ciclo que envolve o nematóide em questão está acontecendo com maior frequência.

A relação significativa observada entre o tamanho (de concha) dos moluscos das duas áreas de coleta e o número de cistos, não pode ser constada nos trabalhos de Franco (2005). Essa relação poderia evidenciar que indivíduos de maior tamanho, provavelmente de maior idade, estiveram mais tempo expostos ao parasito, assim como tiveram mais tempo para aumentar a intensidade de infecção (efeito cumulativo).

5.3.2 Distribuição dos cistos

A distribuição dos cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal no presente estudo é similar à registrada por Thiengo (1995a e b), Franco (2005) e Thiengo et al. (2007a). Neste último trabalho a autora citou que os cistos que continham uma larva altamente enrolada no seu interior foram observados na superfície do tecido da cavidade paleal de *A. fulica*. Tanto nos trabalhos de Franco (2005), como nos de Thiengo (2007a), a concentração dos cistos acontece na região mais vascularizada da cavidade paleal, o que foi também observado neste estudo (Figura 22a, b e c). Esse fato ocorre, provavelmente, porque a localização neste sítio está relacionada com o maior suprimento de hemolinfa, o que resulta em uma melhor disponibilidade de nutrientes para a larva se estabelecer e se desenvolver.

Apesar dos trabalhos supracitados já terem registrado a ocorrência do cisto, provavelmente do mesmo parasito inclusive em *A. fulica*, é a primeira vez que há uma descrição do cisto e da larva.

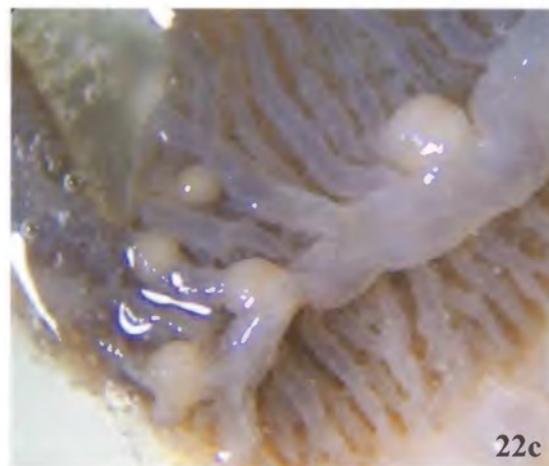


Figura 22: Cistos de nematóides encontrados na cavidade paleal de *Achatina fulica*. **a.** Resultado do trabalho de Franco (2005). Fonte: FRANCO, 2005. **b.** Resultado do trabalho de Thiengo (2007). Fonte: THIENGO et al., 2007a. **c.** Resultado da pesquisa atual.

5.3.1 Análise morfológica dos cistos e larvas de nematóides

Os estudos sobre a ocorrência de parasitos em *A. fulica* no Brasil é recente. Inicialmente buscou-se avaliar a potencialidade do molusco em atuar como hospedeiro intermediário de parasitos de importância para saúde pública que possuem uma variedade de hospedeiros intermediários, como é o caso de *A. costaricensis* e *A. cantonensis* (TELES et al., 1997; CARVALHO et al., 2003; NEUHAUSS et al., 2007). Porém, estudos recentes evidenciam a atuação de *A. fulica* envolvida no ciclo de *Aelurostrongylus abstrusus*, *A. cantonensis* e nematóides similares à *Strongyluris* sp infectando naturalmente espécimes desse molusco no país (CALDEIRA et al., 2007; TEODORO et al., 2007; THIENGO et al., 2007a).

Assim, na Tabela 5 estão relacionados os principais nematóides parasitas já registrados infectando naturalmente *A. fulica* no Brasil e suas principais características morfológicas, comparando-as com os dados constatados sobre o nematóide encontrado neste estudo. Essas características morfológicas podem ser observadas na Figura 23.

Tabela 5: Comparação das espécies de nematóide registradas no Brasil que infectam naturalmente *Achatina fulica* Bowdich, 1822. Medidas das médias (em mm) das larvas de terceiro estágio (L₃) de *Angiostrongylus cantonensis* e semelhantes à *Strongyluris* sp., dos três estágios (L₁, L₂, L₃) de *Aelurostrongylus abstrusus* e dos três grupos (pequeno, médio e grande) do nematóide encontrado no estudo. Sendo, CT – Comprimento Total; BA – Distância da abertura bucal até o anel nervoso; E – Comprimento do esôfago; C – Distância da abertura posterior do sistema digestivo até o final da cauda.

	<i>A. cantonensis</i>	<i>Strongyluris</i> sp.	<i>A. abstrusus</i>			Nematóide do estudo		
	L ₃ n = 35	L ₃ n = 40	L ₁ n = 30	L ₂ n = 30	L ₃ n = 30	Pequeno n = 10	Médio n = 10	Grande n = 10
CT	0,474	5,45	0,4	0,49	0,608	2,84	3,87	5,23
BA	*	0,235	0,069	0,075	0,09	**	0,18**	0,3**
E	0,181	0,65	0,162	0,172	0,206	0,54	0,6	0,67
C	0,174	0,305	0,142	0,16	0,209	0,24	0,23	0,32
TC	Ponta afilada	Curta e Longa	Nó arredondado			Curta e Longa		

* Valor não obtido na fonte de dados.

** Característica observada em uma larva de tamanho médio e em duas larvas de tamanho grande.

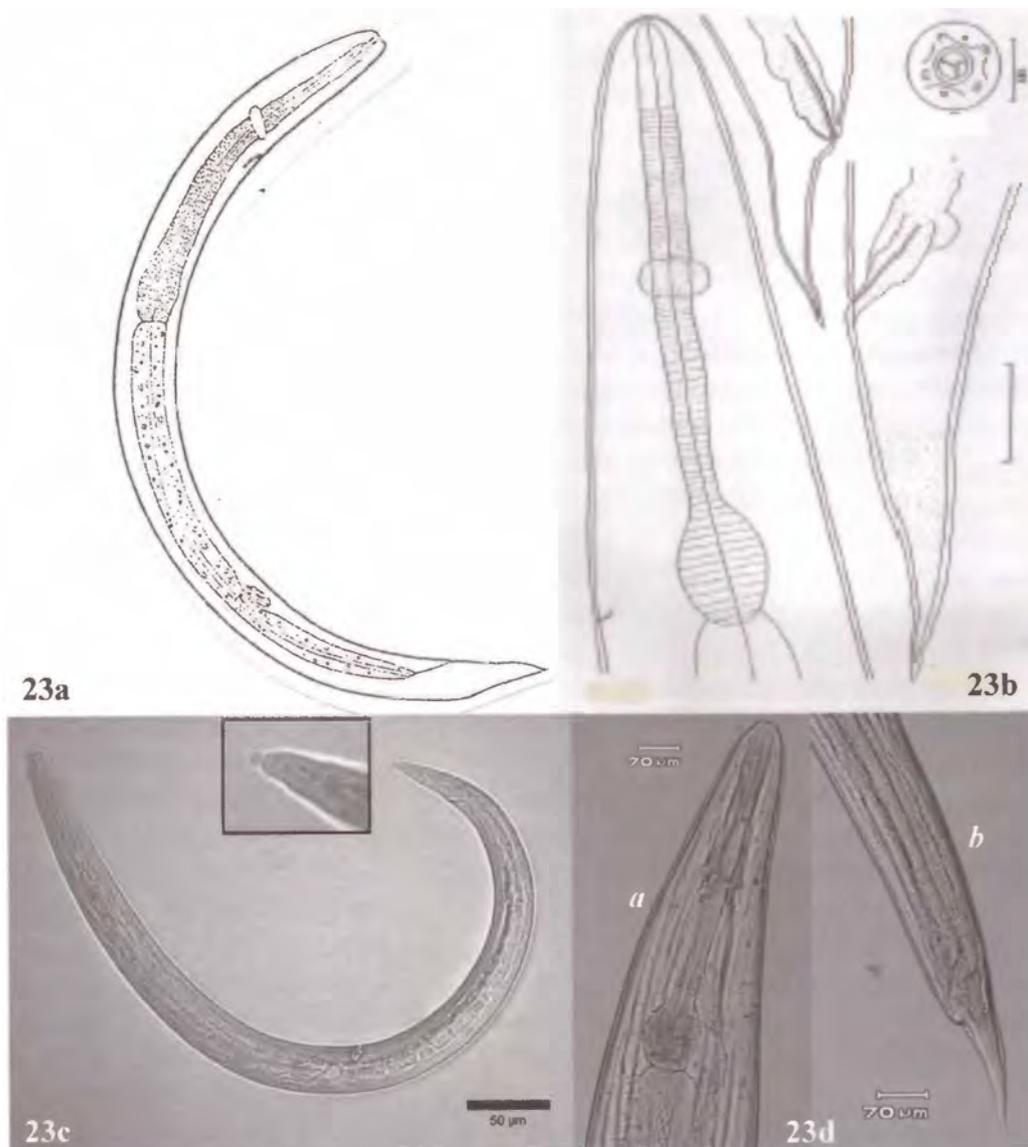


Figura 23: Morfologia de larvas de nematóides que infectam naturalmente *Achatina fulica* no Brasil. **a.** *Angiostrongylus cantonensis*. Fonte: ASH, 1970. **b.** Larvas semelhantes à *Strongyluris* sp. Fonte: THIENGO, 1995a. **c.** *Aelurostrongylus abstrusus*. Fonte: LOPEZ et al., 2004. **d.** Larva de nematóide encontrada neste estudo: *a.* Região anterior; *b.* Região posterior.

Diante dos caracteres morfológicos de cada nematóide apresentado, é possível verificar que o parasito registrado no presente trabalho se assemelha mais ao nematóide encontrado por Thiengo (1995a, 1995b, 2007a), e que é classificado como semelhante à *Strongyluris* sp.

No trabalho sobre o estudo da helmintofauna dos moluscos em área de ocorrência de angiostrongilose abdominal no Brasil, Thiengo (1995a) relata a ocorrência de larvas de nematóides semelhantes às de *Strongyluris* sp. em exemplares de *Bradybaena similaris*, *Bulimulus tenuissimus* (Orbigny, 1835), *Megalobulimus* sp., *Sarasinula marginata* (Semper, 1885) e *Subulina octona* provenientes de Uberlândia; *Belocaulus angustipes* (Heynemann, 1885) coletados em Crissiumal e *Phyllocaulis variegatus* (Semper, 1885) provenientes de Caiçara e de Crissiumal. Estas larvas foram também detectadas nos sedimentos recolhidos dos funis do aparelho de Baermann, em cistos proeminentes localizados na cavidade paleal de *Megalobulimus* sp. e na região anterior da cavidade do corpo de *S. marginata*. Até o momento, nenhum relato além dos trabalhos supra citados, havia sido observado na literatura.

Pode-se observar como caracteres similares entre o nematóide apresentado no estudo e o registrado por Thiengo (1995a, 1995b, 2007a), considerado pela autora como semelhante *Strongyluris* sp., pela proximidade das medidas obtidas das larvas: o tamanho total da larva, sendo a medida do grupo grande o mais próximo aos de L₃ registrados por Thiengo; a distância da abertura bucal até o anel nervoso, apesar de somente ter sido observado em três larvas de nematóide do presente estudo (uma de tamanho médio e duas de tamanho grande), o anel nervoso está posicionado no terço médio do esôfago, mesmo posicionamento registrado por Thiengo (1995a); o comprimento do esôfago e a distância da abertura posterior até o final da cauda, chamada por Thiengo (1995b) de abertura cloacal. A presença de papilas também foi registrada.

Considerando os valores médios das medidas das larvas apresentadas por Thiengo (1995b), as larvas do grupo grande de nematóide encontradas nesse estudo poderiam se tratar do terceiro estágio larval (L₃).

Em comparação com as demais espécies já registradas infectando naturalmente *A. fulica*, pode-se constatar que são bastante distintas, a começar pelo tamanho da larva, *Angiostrongylus cantonensis* e *Aelurostrongylus abstrusus* são larvas de tamanho bastante inferior às registradas neste estudo e, conseqüentemente, as demais medidas. A terminação da cauda também difere (especialmente a de *A. abstrusus*, que é bastante característica da espécie), as terminações da cauda das larvas observadas no presente estudo são de dois tipos: uma mais longa, que afina gradativamente e outra mais curta, que afina abruptamente. Essas características fazem com que o nematóide do estudo seja similar aos registrados como semelhantes à *Strongyluris* sp.

Comparando as larvas de nematóide registradas neste estudo com adultos de *Strongyluris oscar* Travassos, 1923, parasito do intestino grosso de lagartos (*Tropidurus* sp.) registradas no trabalho de Kohn et al. (1973), foi observado que apesar dos lábios serem irradiados e com presença de papilas, estes são proeminentes em *S. oscar*, o que difere do nematóide do estudo. O esôfago, em ambas as larvas, é longo e delgado, terminado em um bulbo esofagiano. Outra diferença está no intestino que, no caso de *Strongyluris* sp., apresenta a extremidade anterior dilatada. Já o posicionamento do anel nervoso é similar, sendo observado no terço médio do esôfago (incluindo o bulbo). A terminação da cauda é difícil de ser comparada, uma vez que nos nematóides do estudo ainda não foram possíveis de serem observados órgãos reprodutores. As diferenças na morfologia da cauda dos espécimes analisados parecem ser mais relacionados ao dimorfismo sexual do que a diferença de estágio de desenvolvimento larval.

Uma vez que a maioria dos caracteres utilizados para a identificação esteja relacionada ao sistema reprodutor masculino e feminino, não foi possível identificar taxonomicamente as larvas observadas no presente estudo.

Na Figura 24 podem ser observadas algumas das características de *S. oscar*, que apesar de ser a espécie registrada no Brasil é bastante similar a *S. panamaensis*, assim como as demais da região neotropical, com distinções nos órgãos reprodutores das larvas (KOHN et al. 1973; BURSEY et al., 2002).

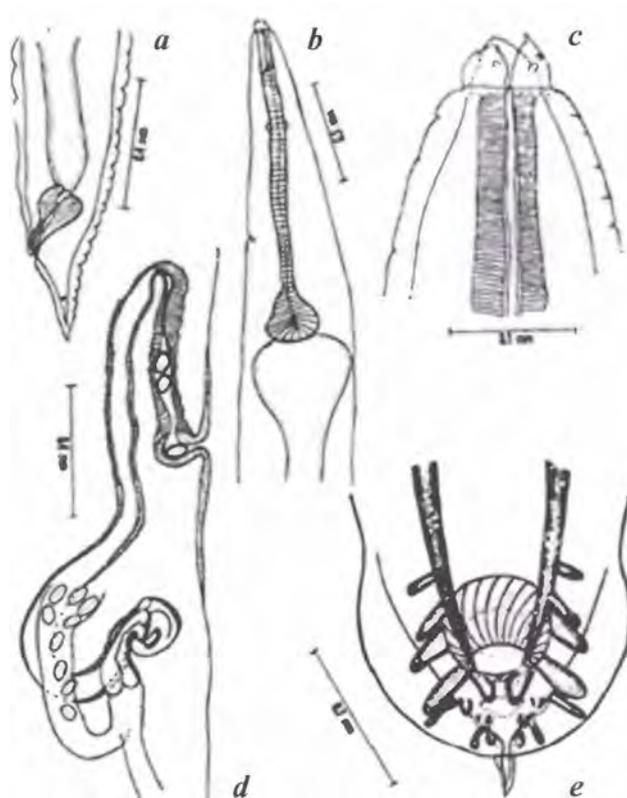


Figura 24: Morfologia de *Strongyluris oscari* Travassos, 1903. *a.* Extremidade posterior da fêmea. *b.* Extremidade anterior da fêmea. *c.* Extremidade anterior do macho. *d.* Ovejeter. *e.* Extremidade posterior do macho.

Fonte: KOHN et al., 1973.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A densidade populacional expressiva de *A. fulica* observada na área menos conservada confirma a influência da ação antrópica sobre a dispersão deste molusco.
- Não houve influência da atividade antrópica e do local de coleta sobre a prevalência de infecção.
- O Rio Dona Eugênia atua como um local de dispersão do molusco e de contato das espécies envolvidas no ciclo do parasito nas duas áreas de coleta.
- A região mais vascularizada da cavidade paleal, em função do maior número de cistos encontrados, constitui-se o sítio mais propício para o estabelecimento e desenvolvimento das larvas.
- As larvas não apresentaram alterações expressivas em seus caracteres morfológicos nas diferentes classes de tamanho observadas, sugerindo que na mudança de estágios larvais ocorra apenas aumento de tamanho.
- As larvas apresentaram diferenças morfológicas, especialmente quanto à extremidade posterior, sugerindo dimorfismo sexual.
- O cisto apresentou tamanho proporcional ao da larva, sugerindo que este aumente progressivamente de tamanho com o desenvolvimento do parasito. O material de reserva observado na larva, provavelmente seja utilizado durante o seu desenvolvimento.
- A partir de comparações com as informações disponíveis na literatura consultada as larvas encontradas no presente estudo assemelham-se a espécie do gênero *Strongyluris*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO, J. F. R.; BOEGER, W. A.; AMATO, S. B. **Protocolos para laboratório – Coleta e processamento de parasitos do pescado**. Seropédica, RJ: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1991. 81 p.

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmisson**. Wallingford: C. A. B. Internacional, 1992.

ARAÚJO, C. (Coord.). Moluscos exóticos introduzidos no país, principalmente *Achatina fulica* Bowdich, 1822. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 17, 2001, Recife. **XX Encontro Brasileiro do Malacologia**. Rio de Janeiro: SBMa/UERJ, 2001. Disponível em: <http://www2.uerj.br/~sbma/texto_do_documento_resultante_da_mesa_redonda_sobre_achatina_fulica.html>. Acesso em: 7 fev. 2005.

ASH, L. R. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 249-253, 1970.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York, NY, USA: Churchill Livingstone Inc., 1996. 766 p.

BARBOSA, A. F. et al. *Achatina fulica* Bowdich, 1822, o “Caramujo gigante africano”: história, biologia e controle de uma praga em expansão no Brasil (Mollusca, Gastropoda, Achatinoidea). **Informativo SBMa**, v. 33, n. 140, p. 4-5, 2002.

BURSEY, C. R. et al. *Strongyluris panamaensis* n. sp. (Nematoda: Heterakidae) and other helminthes from the lizard, *Anolis biporcatus* (Sauria: Polychrotidae), from Panama. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 118-123, 2003.

CALDEIRA, R. L. et al. Moluscos terrestres naturalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis* no Brasil. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 20, 2007, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos/ XX Encontro Brasileiro do Malacologia**. Rio de Janeiro: SBMa/UERJ, 2007. p. 369.

CARVALHO, O. S. et al. Potentiality os *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p.743-745, 2003.

CHITWOOD, B. G.; CHITWOOD, M. B. Snails as hosts and carriers of nematodes and Nematomorpha. **Nautilus**, v. 50, p. 130-135, 1937.

COLLEY, E.; FISCHER, M. L. Estimativa populacional e Distribuição de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, PR. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VI MOSTRA DE PESQUISA DA PUCPR, 12, 2004, Curitiba. **Cadernos de Resumo/XII Seminário de Iniciação Científica e VI Amostra de Pesquisa da PUCPR**. Curitiba: Champagna, 2004.

COLTRO, J. *Achatina fulica* (Bowdich, 1822): a new old problem. **Conchologists of America**, 1997. Disponível em: <<http://coa.acnatsci.org/conchnet/colt697.html>>. Acesso em: 20 dez. 2004.

COOK, H. C. **Carbohydrates**. In: Theory and practice of histological techniques. (J. D. Bancroft and A. Stevens, eds.). New York, NY, USA: Churchill Livingstone, p. 141-167, 1977.

FRANCO, D. O. **Impactos ambientais causados pela introdução de *Achatina fulica* Bowdich, 1822**. Rio de Janeiro: Universidade Castelo Branco, 2005. 106 p.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; CAMILO-COURA, L.; LENZI, H. L. Abdominal angiostrongyliasis – an under-diagnosed disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. (supp.IV), p. 353-354, 1987.

GRACZYK, T.K.; FRIED, B. Helminth biology, adaptation, transmission, and survival. **Recent Research Developments in Microbiology**, v. 5, p. 171-185, 2001.

HUMASON, G. L. **Animal Tissue Techniques**. San Francisco, CA, USA: W. H. Freeman and Company, 1972. 641 p.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Santos, São Paulo, 1983. 123 p.

KOHN, Anna; PINTO, R. M.; FERNANDES, B. M. M. Contribuição ao conhecimento de *Strongyluris oscari* Travassos, 1923 (Nematoda, Subuluroidea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 71, n. 3, 1973.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York, NY, USA: McGraw-Hill Book Inc., 1968. 258 p.

MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTOSKI, W. A. **Parasitologia médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. p. 320-323, 2003.

MENGERT, H. Nematoden und schnecken. **Zeitschrift für Morphologie und Ökologie, Tiere**, v. 41, p. 311-349, 1953.

MORFOLOGIA ESCARGOTS. **FUNCIA**. Disponível em: <<http://www.escargot.com.br/escargot.html>>. Acesso em: 9 jan. 2005.

NEUHAUSS, E. et al. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 49-52, 2007.

OLIVEIRA, M. P.; REZENDE, G. J. R.; CASTRO, G. A. **Catálogo de moluscos da Universidade Federal de Juiz de Fora: Sinonímia de família, gênero e espécie**. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil: Imprensa Universitária da UFJF, 1981. 520 p.

PAIVA, C. L. ***Achatina fulica*: praga agrícola e ameaça à saúde pública no Brasil**. 2004. Disponível em: <<http://www.geocities.com/lagopaiva/achat>>. Acesso: 9 jan. 2005.

- PINHEIRO, J. et al. Ultrastructure of the miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 97, p. 367-372, 2005.
- POINAR, G. O. **Key to the groups and genera of nematode parasites of invertebrates**. Commonwealth Agricultural Bureaux. England: S. Willmott, 1977. 40 p.
- PONTES, F. Defesa Civil realiza trabalho de conscientização na Zona Oeste. **O GLOBO Online**, Rio de Janeiro, 25 jul. 2006. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/rio/mat/2006/07/25/284990058.asp>. Acesso em: 03/01/08.
- OLSEN, O. W. **Parasitologia Animal. I. El Parasitismo y los Protozoa**. Editorial AEDOS. Barcelona, España, 1977. 284p.
- REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. 379p.
- REY, L. Dicionário de Termos Técnicos de Medicina e Saúde. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003. 1008p.
- ROSEN, L. Angiostrongyliasis. In: HUBBERT, W. T.; MCCULLOCH, W. F.; SCHNURRENBERGER, P. R. **Diseases transmitted from animals to man**. Springfield: Charles C. Thomas, p. 567-571, 1975.
- SIMONE, L. R. L. O caramujo gigante em tamanho e em problemas. **Informativo SBMa**, Rio de Janeiro, p. 5 - 6, maio 2002.
- SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. 7. ed. Mexico: Nueva Editorial Interamericana S. A. de C. V., 1987. 823p.
- TELES, H. M. S. et al. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 3, p. 310-312, 1997.
- TELES, H. M. S.; FONTES, L. R.. Angiostrongilíase e escargot: nova ameaça à saúde pública. **Secretário de Saúde**, v. 30, p. 24-26, 1998.
- TELES, H. M. S.; FONTES, L. R. Escargot: mais um perigo à mesa. Nova ameaça à saúde pública e à agricultura. **Vetores & Pragas**, ano 1, v. 1, p. 4-8, 1998.
- TEODORO, T. M. et al. Diagnóstico molecular de larvas de helmintos presentes em *Achatina fulica* Bowdich, 1822. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 20, 2007, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos/ XX Encontro Brasileiro do Malacologia**. Rio de Janeiro: SBMa/UERJ, 2007. p. 242.
- THIENGO, S. A. R. C. **Estudo da helmintofauna dos moluscos em áreas de ocorrência de angiostrongilose abdominal no Brasil**. 1995a. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

THIENGO, S. C. Presence of *Strongyluris*-like larvae (Nematoda) in some terrestrial mollusks in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 5, p. 619-620, 1995b.

THIENGO, S. C. Tirando a limpo a praga dos caramujos africanos. **SBMA**. Rio de Janeiro: Setor de Imprensa da Fiocruz, 2004. Disponível em: <http://www2.uerj.br/~sbma/tirando_a_limpo_a_praga_dos_caramujos_africanos>. Acesso em: 9 jan. 2005.

THIENGO, S. C. et al. Rapid spread of an invasive in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brazil. **Biological Invasions**, v. 9, n. 6, p. 693-702, 2007b.

THIENGO, S. C. et al. First Record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina (Lissachatina) fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, *In Press, Accepted Manuscript*, Available online 4 nov. 2007a.

URQUHART, G. M. et al., **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1998. 274p.

VASCONCELOS, M. C. de; PILE, E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 6, p. 582-584, 2001.

YAMAGUTI, S. **Systema helminthum**. 5. ed. v. 3. New York: Interscience Publishers LTD, 1961.

ZILLER, S. R. Espécies exóticas invasoras e restauração de áreas degradadas. **SOBRADE**. Disponível em: http://www.sobrade.com.br/textos/trabalhos/especies_exoticas_invasoras. Acesso em: 23 jan. 2005.