

Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae)

Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini¹
Suzana Bencke Amato²

ABSTRACT. Development of *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) in *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae). To follow the larval development of *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) in *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) snails were separated in three classes using the shell diameter: Class A (14.5-10.2 mm), Class B (10.1-6.9 mm) and Class C (6.8-2.6 mm). Only snails belonging to classes A and B acquired the infection. Specimens of *E. coelomaticum* removed from the pancreatic ducts were exposed to three physiological solutions: Earle, Locke and saline 0.85%, to obtain eggs for the experimental infections. The Locke solution induced the best egg release. The route of migration the intramolluscan development of *E. coelomaticum* was studied with the aid of histology. The minimal period of intramolluscan development, ending at the expelling of daughter sporocysts, was 107 days for the snails infected in March, and 79 days for the snails infected in November. The Student "t" test and the Chi-square test showed a significant difference ($\alpha = 5\%$) between the two periods, although the mean temperature registered during the experiments did not significantly differed ($\alpha = 5\%$). The elimination of daughter sporocysts occurred through the snail's pneumostome, and always at night. Most sporocysts were eliminated at intervals that varied between one to three days, without regularity. The time of elimination of the daughter sporocysts was different for the two infection period studied: 12 weeks for the snails infected in March, and three weeks for those infected in November. Positive correlation between the number of sporocysts expelled by the snail host and higher temperatures registered in the laboratory was observed. This correlation was more evident in November infection.

KEY WORDS. *Eurytrema coelomaticum*, *Bradybaena similaris*, intramolluscan development, route of migration, sporocyst elimination rhythm

O desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) em seu primeiro hospedeiro intermediário, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), tem sido estudado por vários pesquisadores. Contudo, não existem registros precisos quanto à rota de migração e eliminação dos esporocistos de segunda geração. De acordo com KOZUTSUMI & ITAGAKI (1989) os esporocistos de segunda geração de *E. pancreaticum* (Janson, 1889) migrariam através dos sinus retal e lateral do molusco *B. similaris*, emergindo para o exterior através de perfuração do manto próximo ao pneumóstoma.

1) Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Caixa postal 74555, 23851-970 Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: solangeb@gbl.com.br

2) Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa postal 700, 90001-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: sbamato@vortex.ufrgs.br

TANG (1950), ao dissecar espécimes de *B. similaris* infectados com *E. pancreaticum* após 165 dias de infecção, observou alguns esporocistos de segunda geração totalmente desenvolvidos, migrando para a porção anterior da abertura respiratória do molusco. TANG & TANG (1977) observaram que o desenvolvimento de *E. coelomaticum* em *B. similaris* durava seis meses e, que após este período os esporocistos de segunda geração migravam para o pneumóstoma. SAKAMOTO *et al.* (1980) observaram esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* na abertura respiratória de *B. similaris*, aos 150 dias pós-infecção, sugerindo que a emergência ocorria via pneumóstoma.

O desenvolvimento de parasitos nos moluscos é influenciado por diversos fatores, destacando-se entre eles a temperatura. SMYTH (1966) observou que a velocidade de desenvolvimento do helminto é diretamente proporcional à temperatura ambiente, sob a qual o molusco é mantido durante o período de infecção. CHINONE *et al.* (1976) estudaram o desenvolvimento de *E. pancreaticum* em *B. similaris* através de infecções experimentais realizadas em diferentes épocas do ano, verificaram que a duração do desenvolvimento larval no molusco variava de acordo com a época de infecção. Segundo estes autores, a extensão da luminosidade durante o dia poderia ter influenciado indiretamente o desenvolvimento deste trematódeo digenético, uma vez que a temperatura, outro fator a ser considerado, foi controlada e igual para as diferentes épocas de infecção. TANG & TANG (1977) verificaram as taxas sazonais de infecção dos hospedeiros intermediários de *E. pancreaticum* e, observaram uma alta prevalência de infecção, para ambos os hospedeiros, no verão, alcançando o pico no outono e diminuindo nos meses de inverno. Este trabalho teve por objetivo: determinar a rota de migração dos estágios larvais, a via de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* e relacionar a temperatura ambiente com o ritmo de eliminação de esporocistos de segunda geração.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes de *E. coelomaticum* foram obtidos de bovinos naturalmente infectados e separados em grupos com 35 espécimes. Foram testadas três soluções fisiológicas para a eliminação de ovos por *E. coelomaticum*: solução de Earle, solução de Locke (HUMASON 1972) e solução salina 0,85%, sendo realizadas seis repetições para cada solução. Os helmintos eram transferidos para placas de petri contendo as soluções, onde permaneciam por 24 horas, à temperatura ambiente, após este período os ovos eram lavados em água destilada e transferidos para pequenos frascos e mantidos em refrigerador. Foi feita uma estimativa do número de ovos eliminados em cada solução utilizada, a partir de alíquotas com volume de 0,3 ml, os ovos foram contados com auxílio de uma câmara de McMaster, para cada solução foram feitas três contagens e o restante dos ovos foi mantido em refrigerador, para as infecções experimentais dos moluscos.

Os moluscos foram divididos em três classes de acordo com o diâmetro de concha: Classe A (14,5-10,2 mm), Classe B (10,1-6,9 mm) e Classe C (6,8 e 2,6 mm), para a realização das infecções experimentais com *E. coelomaticum*, sendo mantidos em terrários sob temperatura ambiente. A alimentação básica consistiu de repolho, alface e cenoura, além de uma fonte suplementar de minerais. Foram comparados dois períodos de infecção, um realizado em março e outro em novembro.

Sessenta dias após o início do experimento, os moluscos foram transferidos para placas de petri forradas com papel filtro umedecido com água, recebendo alimentação exclusivamente vegetal. Essas placas foram observadas, diariamente, pela manhã e à tarde, à procura dos esporocistos expelidos de *E. coelomaticum*.

Foram feitos registros diários das temperaturas, máxima e mínima, durante o experimento, sendo as médias obtidas nos dois períodos de infecção estudados, analisadas estatisticamente pelo teste de análise da variância, com nível de significância de 5%. A duração do desenvolvimento larval de *E. coelomaticum* em *B. similis*, culminando com a primeira eliminação de esporocistos de segunda geração, nos dois períodos de infecção estudados, foi analisada estatisticamente, pelos testes "t" de Student para populações heterocedásticas e Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%. O ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* foi relacionado com a temperatura do laboratório e analisado estatisticamente pelo teste de regressão linear simples (ZAR 1996).

O acompanhamento da rota de migração de *E. coelomaticum* pela massa visceral de *B. similis* foi realizado através de dissecações periódicas dos moluscos, de acordo com o tempo necessário para o desenvolvimento de cada estágio larval de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* no primeiro hospedeiro intermediário, disponível na literatura (TANG 1950; TANG & TANG 1977; SAKAMOTO *et al.* 1980; MATTOS 1987; KOZUTSUMI & ITAGAKI 1989). A massa visceral era retirada do interior da concha e transferida para o fixador Dubosq-Brasil modificado (etanol 80° GL, 600 ml; ácido acético glacial, 150 ml; e formalina comercial, 250 ml), onde permanecia por 12 horas. Seguiu-se o processamento histológico e os cortes seriados foram corados com hematoxilina-eosina (BANCROFT & STEVENS 1996).

RESULTADOS

Entre as soluções fisiológicas testadas, a que possibilitou uma maior eliminação de ovos foi a solução de Locke, em todas as repetições realizadas, seguida da solução de Earle e da solução salina 0,85%, respectivamente, conforme pode ser observado na tabela I. O teste de Tukey, demonstrou, ao nível de significância de 1%, que o resultado obtido com a solução de Locke diferiu significativamente, daqueles obtidos com as soluções de Earle e salina 0,85%, sendo que entre as duas últimas soluções não se observou diferença significativa.

Tabela I. Eliminação de ovos por *Eurytrema coelomaticum* em diferentes soluções fisiológicas.

Soluções fisiológicas *	Número de repetições **	Número médio de ovos eliminados	
		Média ± Desvio padrão	
Locke	6	746,0 ± 139,0 a	
Earle	6	304,6 ± 154,7 b	
Salina 0,85%	6	194,5 ± 132,0 b	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($\alpha = 5\%$). (*) De acordo com HUMASON (1972); (**) foram utilizados 35 espécimes de *E. coelomaticum* em cada repetição.

A tabela II mostra os resultados da infecção experimental de 194 moluscos, divididos em três classes de diâmetro de concha. Apenas os moluscos das classes

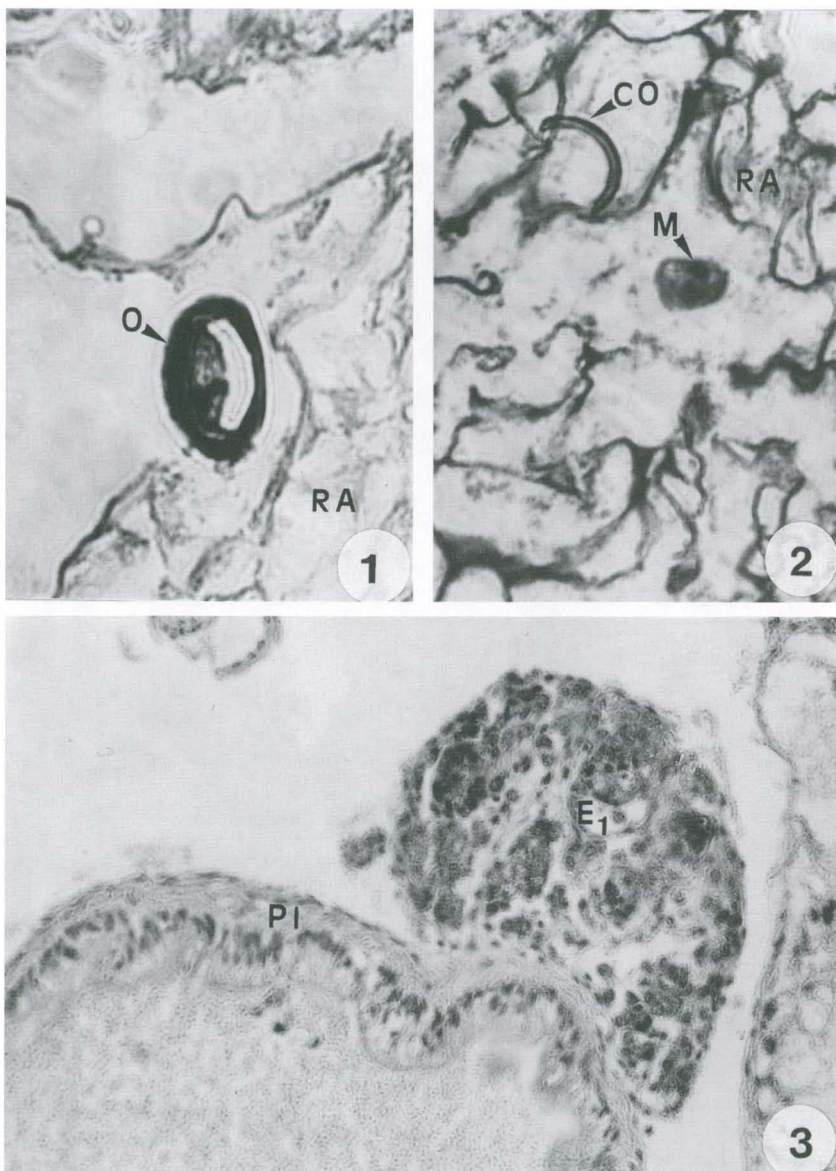
A e B adquiriram a infecção. A classe A foi a que apresentou maior número de moluscos infectados (52,7% e 45%), para as infecções realizadas em março e novembro, respectivamente. Na classe C nenhum molusco adquiriu a infecção, para as duas épocas de infecção estudadas. Comparando-se os resultados percentuais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

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

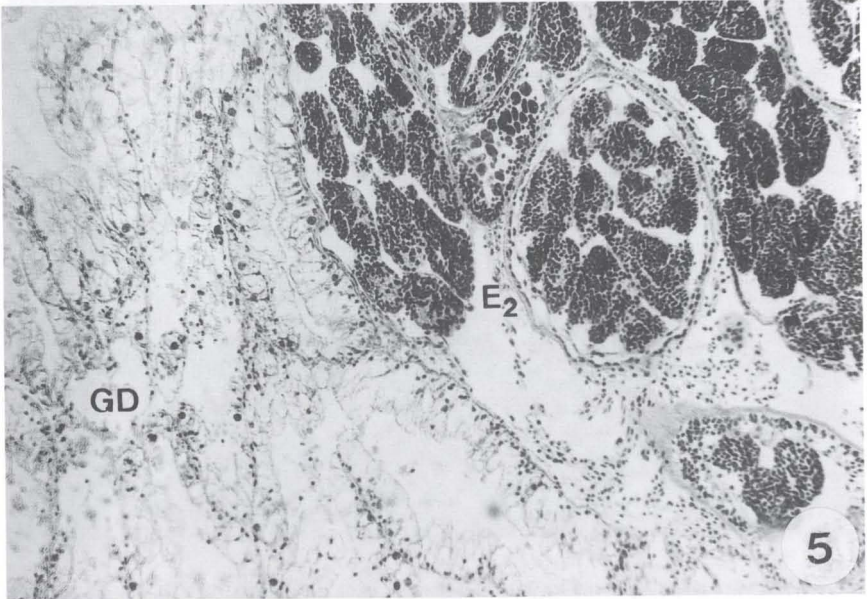
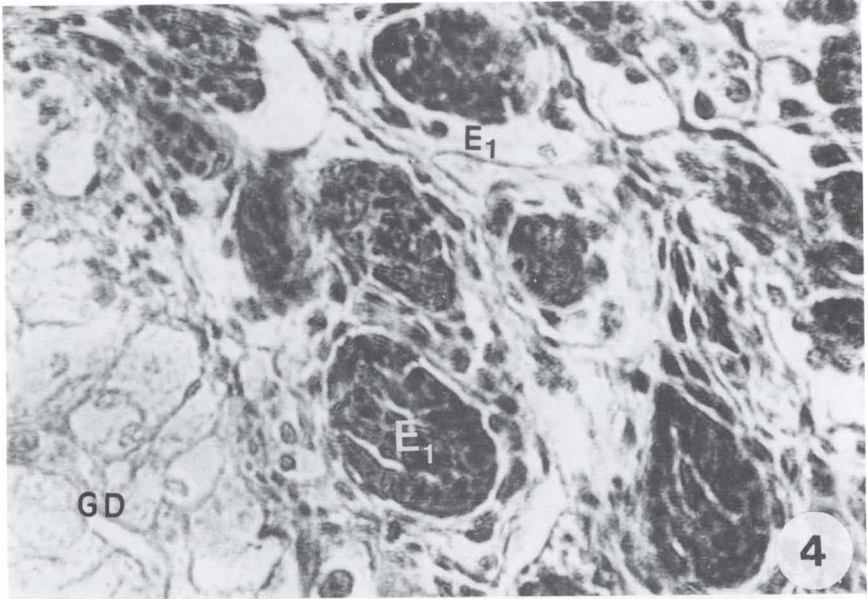
Classes de diâmetro de concha	Número de moluscos utilizados		Número de moluscos infectados		Porcentagem de infecção	
	Novembro	Março	Novembro	Março	Novembro	Março
A	36	40	19	18	52,7	45,0
B	28	30	6	8	21,4	26,6
C	30	30	0	0	0,0	0,0

(Classe A) diâmetro entre 14,5 e 10,2 mm; (Classe B) diâmetro entre 10,1 e 6,9 mm; (Classe C) diâmetro entre 6,8 e 2,6 mm.

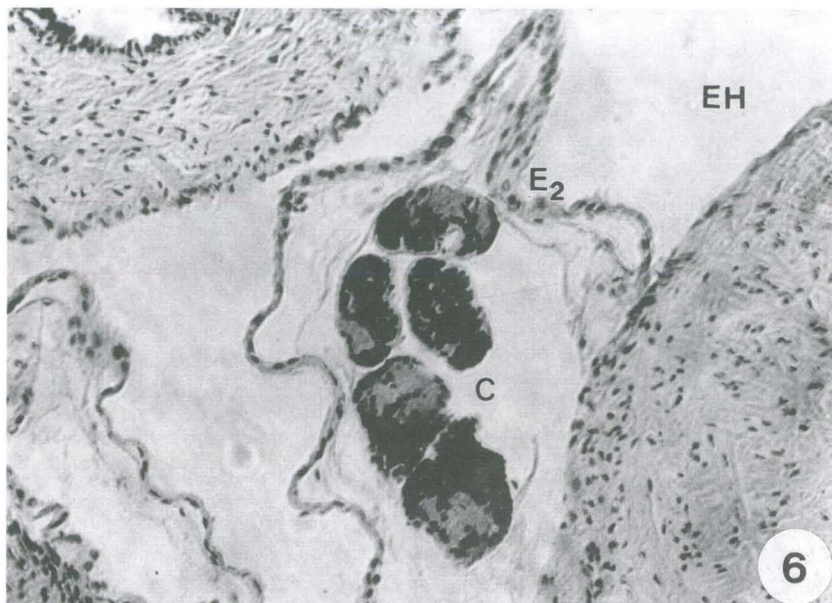
Os ovos de *E. coelomaticum* ingeridos pelos moluscos, foram observados na porção anterior do trato digestivo aos 15 minutos após o contato inicial com os ovos (Fig. 1). Um miracídio livre foi observado no lúmen do trato digestivo de um molusco, dissecado uma hora após o contato inicial com os ovos e processado histologicamente (Fig. 2). Nas dissecações realizadas aos 10 dias após a infecção, observou-se esporocistos de primeira geração fixados na serosa da porção posterior do intestino, cortes histológicos desta região mostraram que os esporocistos apresentavam formato oval, contendo em seu interior uma massa de células germinativas (Fig. 3). Aos 25 dias de infecção, foram observados esporocistos de primeira geração em vários estágios de desenvolvimento, espalhados pelo tecido peri-intestinal e ao redor da glândula digestiva (Fig. 4). Pode-se observar esporocistos de segunda geração em vários estágios de desenvolvimento, ao redor da glândula digestiva, aos 60 dias pós-infecção (Fig. 5). Esporocistos de segunda geração, totalmente desenvolvidos, foram observados nas dissecações realizadas aos 70 dias pós-infecção, migrando pelos espaços hemolinfáticos, no sentido da volta corporal do molusco (Fig. 6). Os esporocistos de segunda geração emergiram sempre durante a noite, através do pneumóstoma. Embora, as placas de petri contendo os moluscos experimentalmente infectados fossem observadas diariamente, no início da manhã e ao final da tarde, apenas nas observações feitas pela manhã foram encontrados esporocistos. Não houve constância no intervalo entre uma eliminação e outra, porém as eliminações, em sua maioria, ocorreram em intervalos de 1 a 3 dias. Os esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* que emergiam de *B. similaris*, foram encontrados depositados sobre o vidro das placas de petri, em grupos ou isolados, quando apenas um esporocisto era eliminado. Esses esporocistos, apresentavam-se envolvidos por uma substância mucilagínosa. A figura 7, mostra em um corte histológico, após 79 dias de infecção, um esporocisto de segunda geração, contendo cercárias totalmente desenvolvidas, no pneumóstoma. Este achado se constituiu no primeiro registro histológico de esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum* emergindo pelo pneumóstoma de *B. similaris*.



Figs 1-3. Corte histológico da região anterior do trato digestivo de *Bradybaena similaris* infectada experimentalmente. (1) Mostrando um ovo de *Eurytrema coelomaticum*, aos 15 minutos após o contato inicial com os ovos. (2) mostrando um miracídio de *E. coelomaticum* livre no lúmen do trato digestivo, uma hora após o contato inicial com os ovos; (3) mostrando um esporocisto de primeira geração de *E. coelomaticum* fixado na serosa da parede do intestino, aos 10 dias após a infecção. Coloração: HE, (CO) fragmento da casca do ovo, (E₁) esporocisto de primeira geração, (M) miracídio, (O) ovo, (PI) parede do intestino, (RA) resíduo alimentar.



Figs 4-5. Corte histológico, mostrando vários esporocistos de *Eurytrema coelomaticum*, em diferentes estágios de desenvolvimento. (4) De primeira geração espalhados pelo tecido peri-intestinal e ao redor da glândula digestiva de *Bradybaena similaris*, aos 25 dias após a infecção; (5) de segunda geração, ao redor da glândula digestiva de *B. similaris*, aos 60 dias após a infecção. Coloração: HE, (E₁, E₂) esporocistos de primeira e segunda gerações, (GD) glândula digestiva.



Figs 6-7. Corte histológico. (6) Mostrando um esporocisto de segunda geração de *Eurytrema coelomaticum* totalmente desenvolvido, migrando entre os órgãos internos de *Bradybaena similaris*, aos 70 dias após a infecção; (7) mostrando a região do pneumóstoma *B. similaris*, contendo um esporocisto de segunda de *E. coelomaticum*, pronto para ser expelido, aos 79 dias após a infecção. Coloração: HE, (C) cercária, (E₂) esporocisto de segunda geração, (EH) espaço hemolinfático, (P) pneumóstoma.

O tempo mínimo de desenvolvimento de *E. coelomaticum* em *B. similaris*, desde a ingestão dos ovos até a primeira eliminação dos esporocistos de segunda geração, foi de 107 dias para a infecção realizada em março e de 79 dias para a infecção realizada em novembro. A análise estatística, pelos testes "t" de Student e Qui-Quadrado, mostrou uma diferença significativa, ao nível de significância de 5%, na duração do desenvolvimento larval intramolusco para os dois períodos estudados. Embora, as médias das temperaturas, máxima e mínima, registradas nestes períodos (Tabs III, IV), através do teste de análise de variância, não tenham diferido significativamente, ao nível de significância de 5%.

Tabela III. Temperatura média relacionada à infecção experimental de *Bradybaena similaris* com ovos de *Eurytrema coelomaticum* realizada no mês de março.

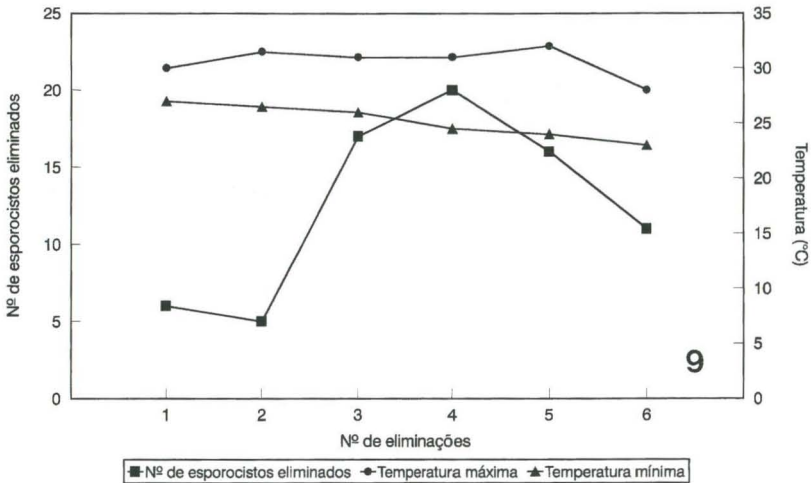
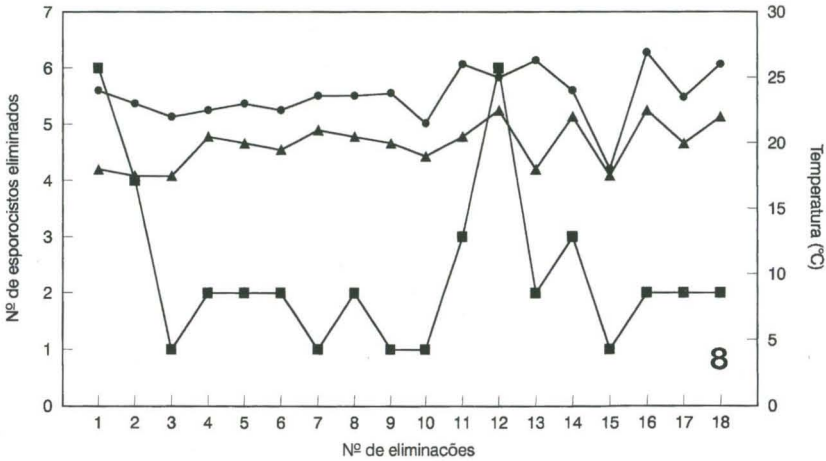
Período de infecção (meses)	Temperatura (°C)	
	Máxima	Mínima
Março	30,2	24,9
Abril	30,1	26,7
Maió	25,5	22,5
Junho	25,4	20,7

Tabela IV. Temperatura média relacionada à infecção experimental de *Bradybaena similaris* com ovos de *Eurytrema coelomaticum* realizada no mês de novembro.

Período de infecção (meses)	Temperatura (°C)	
	Máxima	Mínima
Novembro	29,9	25,7
Dezembro	30,4	27,1
Janeiro	31,3	28,0
Fevereiro	30,9	26,3

O tempo de eliminação dos esporocistos foi diferente para os dois períodos de infecção estudados. Para um molusco infectado em março, escolhido ao acaso, a eliminação durou 12 semanas, sendo realizadas 18 eliminações neste período e para um molusco infectado em novembro, igualmente escolhido ao acaso, a eliminação durou três semanas, com seis eliminações realizadas neste período. O número máximo de esporocistos eliminados por molusco foi 16 e o número mínimo foi de um único esporocisto, para os moluscos infectados em março e para os moluscos infectados em novembro, esses números foram 51 e 24, respectivamente.

As figuras 8 e 9, mostram o ritmo de eliminação dos esporocistos de *E. coelomaticum* por espécimes de *B. similaris* infectados experimentalmente em março e novembro, respectivamente. O ritmo de eliminação dos esporocistos de segunda geração quando relacionado à temperatura (máxima e mínima) registrada no laboratório durante o período de eliminação, pelo teste de regressão linear simples, mostrou uma correlação positiva entre a temperatura máxima e o número de esporocistos eliminados, nos dois períodos de infecção estudados. Sendo que esta correlação foi mais evidente nos moluscos infectados em novembro.



Figs 8-9. Ritmo de eliminação dos esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* por um espécime de *Bradybaena similis* infectado experimentalmente, relacionado com a temperatura do laboratório. (8) Infectado em março; (9) infectado em novembro.

DISCUSSÃO

A solução fisiológica de Locke apresenta em sua composição 8,5 g de cloreto de sódio, mesma concentração da solução salina usada para animais homeotérmicos e seus parasitos. Embora a solução salina 0,85%, apresente a mesma concentração de cloreto de sódio, não dispõe dos demais componentes encontrados na solução de Locke. A solução de Earle apresenta 6,8 g de cloreto de sódio, esta concentração é recomendada para pecilotérmicos e seus parasitos. Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram que a concentração de cloreto de sódio presente em cada solução não foi crítica. Uma vez que, em todas as soluções testadas, houve eliminação de ovos. Entretanto, quando os resultados obtidos com as soluções de Locke e salina 0,85%

foram comparados, pode-se observar que, embora as duas soluções apresentem a mesma concentração de cloreto de sódio, a composição mais enriquecida da solução de Locke, possibilitou uma maior eliminação de ovos pelos helmintos. O número de ovos eliminados nas soluções de Earle e salina 0,85%, estatisticamente, não diferiu significativamente, o que talvez demonstre um certo equilíbrio entre a menor concentração de cloreto de sódio apresentada pela solução de Earle e a falta dos demais compostos químicos apresentada pela solução salina 0,85%.

Em seu trabalho realizado com *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, KENDALL (1964) observou que com o hospedeiro adequado, caramujos de todas as idades e tamanhos variados foram susceptíveis à infecção. Entretanto, não foi possível chegar à mesma conclusão com *E. coelomaticum*, que no presente estudo desenvolveu-se apenas em moluscos das classes com maior diâmetro de concha. Os resultados obtidos no presente estudo, encontram apoio em MALEK (1950) in KENDALL (1964), segundo este autor a idade tem pouco ou nenhum efeito sobre a susceptibilidade à infecção, embora tenha observado que espécimes jovens de *Biomphalaria boissyi* (Potiez & Michaud) raramente, apresentaram-se infectados com *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. De acordo com CHENG (1968), moluscos de diferentes idades apresentam níveis diferentes de susceptibilidade a infecções por estágios larvais de trematódeos digenéticos. A maioria dos trabalhos já realizados, se não todos, estão agrupados neste campo de pesquisa, quando a idade do molusco é estimada por seu tamanho, ou ensaios quantitativos de infectividade. Se tal resistência correlacionada com a idade é devida a algum fator humoral inato, ou a um fator celular, ainda não se sabe.

Trabalhos realizados por vários autores, mesmo aqueles que se referem ao estágio cercária, apresentam um consenso de que a migração se faz via sistema circulatório dos moluscos. Embora estes autores tenham se referido ao "sistema sanguíneo" como principal rota de migração dos estágios larvais de trematódeos digenéticos em seus hospedeiros moluscos (BRUMPT 1941; KENDALL & MCCULLOUGH 1951; PROBERT & ERASMUS 1965; KOZUTSUMI & ITAGAKI 1989), o sistema circulatório dos moluscos é semi-aberto, a hemolinfa circula também, por espaços (lacunas) existentes entre os órgãos internos e não exclusivamente por ductos ou canais, como foi sugerido por estes autores. Dessa forma, a denominação "sistema hemolinfático" é a mais apropriada para designar o sistema circulatório dos moluscos.

O esporocisto de primeira geração, desenvolve-se fixo na superfície externa do intestino, o que também foi observado por TANG (1950) e KOZUTSUMI & ITAGAKI (1989) com *E. pancreaticum*.

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

Os esporocistos de primeira geração produzem em seu interior os esporocistos de segunda geração, a partir das bolas germinativas. A localização dos esporocistos de segunda geração dos dicrocoelídeos é muito variada: colar do manto

(DENTON 1944); veias da parede da cavidade pulmonar (DENTON 1944); glândula digestiva e glândula de albumina, pneumóstoma e ao longo do intestino (DENTON 1944; KOZUTSUMI & ITAGAKI 1989). No presente estudo, os esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum*, foram observados migrando pelos espaços hemolinfáticos, próximos à porção final do intestino dos moluscos e emergiram utilizando a abertura respiratória do molusco. Outros autores também verificaram que os esporocistos de segunda geração deixavam o molusco, através do pneumóstoma, entretanto, nenhum deles documentou, fotograficamente o fato, como foi feito no presente estudo (TANG 1950; SAKAMOTO *et al.* 1980). KOZUTSUMI & ITAGAKI (1989) observaram esporocistos de segunda geração de *E. pancreaticum* emergindo através de perfuração do manto próximo ao pneumóstoma do molusco, porém, nunca pelo orifício respiratório. Entretanto, uma abertura natural do molusco parece ser mais apropriada para a emergência do que rompimento de tecido, uma vez que vários esporocistos sendo eliminados periodicamente pelo molusco, poderiam matar o hospedeiro, comprometendo a continuação do ciclo.

O horário de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum*, observado no presente estudo, está de acordo com CHINONE *et al.* (1976), que trabalharam com esta mesma espécie e difere de TANG (1950) com *E. pancreaticum*, onde a eliminação ocorreu tanto de dia quanto à noite. O horário noturno para a eliminação dos esporocistos, deve representar uma sincronização do ciclo do parasito aos hábitos do segundo hospedeiro intermediário, um ortóptero do gênero *Conocephalus* Thünberg, 1815, identificado no Brasil por MATTOS *et al.* (1987). Os ortópteros têm o pico de atividade nas horas mais frescas do dia (observações de campo), dessa forma, sendo os esporocistos eliminados durante a madrugada, quando esses insetos forem se alimentar pela manhã, terão acesso aos esporocistos se infectando. Além disso, os esporocistos serão menos atingidos por fatores ambientais, como temperaturas altas e baixa umidade.

A duração do período de eliminação dos esporocistos de segunda geração de *E. coelomaticum*, verificada no presente estudo, diferente para os dois períodos de infecção estudados, aproxima-se dos resultados obtidos por CHINONE *et al.* (1976), embora esta proximidade seja mais evidente para a infecção realizada em novembro. O intervalo entre as eliminações dos esporocistos, observado no presente estudo, aproxima-se dos resultados obtidos por CHINONE *et al.* (1976) que verificaram as eliminações com intervalos de dois dias. A duração do período de eliminação e o número de esporocistos eliminados, foram diferentes nos dois períodos de infecção estudados, o mesmo foi observado por CHINONE *et al.* (1976) com infecções realizadas em diferentes épocas do ano. Embora, a análise estatística não tenha demonstrado diferença significativa para as temperaturas, nos dois períodos de infecção estudados, verificou-se uma relação positiva entre temperaturas mais elevadas e número de esporocistos eliminados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANCROFT, J.D. & A. STEVENS. 1996. **Theory and Practice of Histological Techniques**. New York, Churchill Livingstone Inc., 766p.
- BRUMPT, E. 1941. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** 18: 9-45.

- CHENG, T.C. 1968. The compatibility and incompatibility concept as related to trematodes and molluscs. **Pacific Science** **22**: 141-160.
- CHINONE, S.; K. MARUYAMA & H. ITAGAKI. 1976. Development of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda). I. Development in the first intermediate snail host. **Bull. Azabu Vet. College** **1**: 15-22.
- DENTON, J.F. 1944. Studies on the life history of *Eurytrema procyonis* Denton, 1942. **Jour. Parasitol.** **30**: 277-286.
- HUMANSON, G. 1972. **Animal tissue techniques**. San Francisco, W.H. Freeman Co., 4th ed., 661p.
- KENDALL, S.B. 1964. Some factors influencing the development and behaviour of trematodes in their molluscan hosts, p. 50-73. In: A.E.R. TAYLOR (Ed.). **Host-Parasite Relationships in Invertebrate Host Second Symposium of the British Society for Parasitology**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, England, 134p.
- KENDALL, S.B. & F.S. MCCULLOUGH. 1951. The emergence of the cercaria of *Fasciola hepatica* from the snail *Lymnaea truncatula*. **Jour. Helminthol.** **25**: 77-92.
- KOZUTSUMI, T. & H. ITAGAKI. 1989. Migration and emergence of *Eurytrema pancreaticum* daughter sporocysts from host snail (Trematoda, Dicrocoeliidae). **Japan. Jour. Parasitol.** **38**: 290-295.
- MATTOS JR., D.G. DE; S.B. AMATO & S.S. DA S. VIANNA. 1987. Identificação do segundo hospedeiro intermediário de *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae) na região do Vale do Paraíba, São Paulo. **Arqvs. Univ. Fed. Rural Rio de Janeiro, Seropédica**, **10**: 69-81.
- PROBERT, A.J. & D.A. ERASMUS. 1965. The migration of *Cercaria* x *Baylis* (Strigeida) within the molluscan intermediate host *Lymnaea stagnalis*. **Parasitol.** **55**: 77-92.
- SAKAMOTO, T.; I. KONO; N. YASUDA & C. YAMAUCHI. 1980. Studies on *Eurytrema coelomaticum*. I. Preliminary observations on the biological characters of *E. coelomaticum*. **Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.** **16**: 83-92.
- SMYTH, J.D. 1966. **The Physiology of Trematodes**. London, Oliver and Boyd, 256p.
- TANG, C.C. 1950. Studies on the life history of *Eurytrema pancreaticum* Janson, 1889. **Jour. Parasitol.** **36**: 559-573.
- TANG, Z. & C. TANG. 1977. The biology and epidemiology of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) and *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) in cattle and sheep in China. **Acta Zool. Sinica** **23**: 267-282.
- ZAR, J.H. 1996. **Biostatistical Analysis**. New Jersey, Prentice Hall, 121p.

Recebido em 16.IX.1999; aceito em 25.V.2001.