



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Karine Gomes Leite

Caracterização morfométrica e morfológica por microscopia de campo claro, microscopia de varredura a laser confocal e microscopia eletrônica de varredura de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 (Trematoda: Digenea) recuperado de bovinos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Rio de Janeiro

2015

Karine Gomes Leite

Caracterização morfométrica e morfológica por microscopia de campo claro, microscopia de varredura a laser confocal e microscopia eletrônica de varredura de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 (Trematoda: Digenea) recuperado de bovinos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L533 Leite, Karine Gomes.

Caracterização morfométrica e morfológica por microscopia de campo claro, microscopia de varredura a laser confocal e microscopia eletrônica de varredura de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 (Trematoda: Digenea) recuperado de bovinos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil / Karine Gomes Leite. – 2015.
68 f.

Orientador: José Roberto Machado e Silva.

Coorientador: Eduardo José Lopes Torres.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Eurytrema coelomaticum* - Teses. 2. Microscopia confocal - Teses. 3. Microscopia eletrônica de varredura - Teses. 4. Helminologia veterinária - Teses. 5. Bovino - Parasito - Teses. I. Silva, José Roberto Machado. II. Torres, Eduardo José Lopes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.995.1:619

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Karine Gomes Leite

**Caracterização morfométrica e morfológica por microscopia de campo claro,
microscopia de varredura a laser confocal e microscopia eletrônica de varredura de
Eurytrema coelomaticum (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 (Trematoda: Digenea)
recuperado de bovinos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:
Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 30 de março de 2015.

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador:

Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Renata Heisler Neves
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Delir Corrêa Gomes Maués da Serra Freire
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

À Joyce Gonçalves Rozário de Souza pelo apoio, incentivo, paciência e principalmente pela sua amizade, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva pelo estímulo, exemplo profissional e crédito em mim depositado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres pela disponibilidade, paciência e boa vontade em me ensinar tantas coisas, dentre elas, as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), histologia e morfometria.

À Dra. Delir Corrêa Gomes Maués da Serra Freire chefe do Laboratório de Helmitos Parasitos de Vertebrados (LHPV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e ao Dr. Jairo Pinheiro da Silva Pró-reitor Adjunto de Pesquisa e Pós Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a Dra. Renata Heisler Neves pelo ensino e acompanhamento em etapas do desenvolvimento desta dissertação.

À doutoranda Joyce Gonçalves Rozário de Souza por disponibilizar seu tempo me orientando e aconselhando durante toda a elaboração desta pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica Humana pela contribuição ao meu conhecimento em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

À Prof^a Dra. Débora Henrique da Silva Anjos responsável pelo Laboratório Biologia de Helmitos Otto Wucherer da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) por me acolher no laboratório e tornar possível à realização de alguns experimentos e procedimentos.

À técnica Thatiany Marinho do Laboratório de Microscopia confocal/fluorescência do Departamento de Anatomia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pelo acompanhamento e ajuda na obtenção de imagens por microscopia de varredura a laser confocal.

À técnica Rachel Rachid do Centro de Microscopia Eletrônica (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela disponibilidade e atenção em me auxiliar na captura das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Aos colegas de Pós-graduação Dayane Alvarinho e Makoto Enoki pela ajuda na execução de algumas técnicas.

Ao meu noivo Wallace Polastreli que se manteve presente, ajudando-me com os programas de computação usados para confeccionar este trabalho.

À minha mãe Prof^a Edine Gomes Leite que sempre me incentivou a estudar e me apoiou durante toda minha vida discente.

Aos colegas estudantes e demais funcionários do Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) pelo convívio e colaboração.

Não há ciência aplicada. A coisa importante é não parar de questionar. A curiosidade tem suas próprias razões de existir. Nunca perca a sagrada curiosidade.

Albert Einstein

RESUMO

LEITE, Karine Gomes. **Caracterização morfométrica e morfológica por microscopia de campo claro, microscopia de varredura a laser confocal e microscopia eletrônica de varredura de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 (Trematoda: Digenea) recuperado de bovinos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2015. 68 f.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A euritrematose é uma helmintose de ruminantes cujos agentes etiológicos são *Eurytrema coelomaticum* e *Eurytrema pancreaticum* que se alojam, principalmente, no pâncreas podendo causar alterações que desencadeiam pancreatite e caquexia. *E. coelomaticum* é a espécie prevalente no Brasil, porém existe uma carência de informações morfológicas sobre os vermes adultos. O objetivo desta dissertação foi realizar uma caracterização de *E. coelomaticum* recuperados de bovinos abatidos no Município do Rio de Janeiro, Bairro de Santa Cruz e no Município de Barra Mansa no Estado do Rio de Janeiro e comparar com espécimes depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC). Os espécimes foram corados pelo carmim clorídrico, montados em lâminas com bálsamo do Canadá, analisados por microscopia de campo claro e varredura a laser confocal. Alguns espécimes foram montados em parafina e processados segundo técnica histológica de rotina para análise histológica. Os demais espécimes foram processados e cobertos com uma fina camada de ouro 20-25nm para visualização no microscópio eletrônico de varredura. A análise morfométrica de 50 espécimes apresentou os seguintes valores (as medidas são apresentadas em milímetros), glândulas vitelínicas medindo 0,67-2,14 ($1,30\pm 0,44$) de comprimento e 0,33-0,93 ($0,58\pm 0,15$) de largura; distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral 1,38-2,8 ($2,13\pm 0,44$); distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo 1,98-5,35 ($3,65\pm 1,06$); distância entre ceco e região posterior do corpo 0,5-1,69 ($1,09\pm 0,35$). Através da análise morfológica por microscopia de campo claro comprovamos que glândulas de Mehlis, oótipo, reservatório vitelínico e ducto vitelínico estão presentes. A análise morfológica por microscopia a laser confocal, realizada pela primeira vez para observação de helmintos desta espécie, possibilitou a visualização mais detalhada das estruturas que constituem a bolsa do cirro, mostrando a vesícula seminal de formato enovelado estocando espermatozoides, presença de ducto ejaculatório e glândulas prostáticas; ovário com oócitos; canal de Laurer presente; testículos com espermatozoides; musculatura do corpo, ventosas e faringe densas. A microscopia eletrônica de varredura confirmou a ausência de estruturas no tegumento, sendo este liso, dotado unicamente de pequenas protuberâncias de formato cúbico; ventosa oral, ventosa ventral e cirro também liso e tegumento com reentrâncias. Concluímos que os dados morfométricos e morfológicos do presente estudo estão de acordo com aqueles já descritos na literatura. Novas medidas das glândulas vitelínicas; relação do comprimento do corpo pela largura do corpo; distâncias entre: região anterior do corpo e ventosa ventral; ventosa ventral e região posterior do corpo; ceco e região posterior do corpo, analisados neste estudo, assim como, a disposição dos feixes musculares do tegumento, ventosas e faringe; estruturas da bolsa do cirro, do ovário e testículos, visualizados por microscopia confocal, e a confirmação da ausência de estruturas no tegumento e no cirro, observados por microscopia eletrônica de varredura, contribuem para descrição e estudo da espécie.

Palavras-chave: *Eurytrema coelomaticum*. Morfometria. Morfologia. Microscopia de campo claro. Microscopia de varredura a laser confocal. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

LEITE, Karine Gomes. **Morphometric and morphological characterization by brightfield microscopy, confocal scanning laser microscopy and scanning electron microscopy of *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 (Trematoda: Digenea) recovered recovered cattle in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** 2015.68 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The eurytrematosis is a helminthiasis of ruminants whose etiological agents are *Eurytrema coelomaticum* and *Eurytrema pancreaticum* that lodge mainly in the pancreas and may cause changes that trigger pancreatitis and cachexia. *E. coelomaticum* is the prevalent species in Brazil, but there is a lack of morphological information about the adult flukes. The objective of this work was perform a characterization of *E. coelomaticum* slaughtered from cattle from the Santa Cruz and Barra Mansa County in the State of Rio de Janeiro and compare with specimens deposited in the Helminthological Collection of the Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC). The specimens were stained with hydrochloric carmine, mounted on slide glass on slides with Canada balsam, analyzed by brightfield microscopy and confocal scanning laser. Some specimens were mounted in paraffin and processed according to routine histological technique for histological analysis. The other specimens were processed and gold coated 20-25nm for viewing on a scanning electron microscope. The morphometric analysis of 50 specimens showed the following values (the measures are given in millimeters), vitelline glands measured 0.67 to 2.14 (1.30 ± 0.44) in length and 0.33 to 0.93 (0.58 ± 0.15) width; distance between the anterior region of the body and ventral sucker 1.38 to 2.8 (2.13 ± 0.44); distance between ventral sucker and the posterior region of the body 1.98 to 5.35 (3.65 ± 1.06); distance between the cecum and posterior region of the body 0.5 to 1.69 (1.09 ± 0.35). Through the morphological analysis by brightfield microscopy proved that Mehlis' glands, ootype, yolk reservoir and yolk duct are present. The morphological analysis by confocal microscopy, first performed for helminth observation of this specie, allowed a more detailed view of the structures that constitute the cirrus pouch showing the seminal vesicle coiled and storing sperm, presence of ejaculatory duct and prostate glands; ovary with oocytes; Laurer's channel; testicles with sperm; muscles of the body, suckers and pharynx dense. The scanning electron microscopy confirmed the absence of structures in the tegument is flattened with small lumps cubic shaped; oral sucker, ventral sucker and flat cirrus also and tegument with fold. It could be concluded that the morphometric and morphological data of the present study are consistent with those described in the literature. New measures of vitelline glands; ratio of body length to the width of the body; distances between: anterior region of body and ventral sucker; ventral sucker and the posterior region of the body; cecum and posterior region of the body, analyzed in this study, as well as the order of muscle bundles of the seed coat, suckers and pharynx; the cirrus pouch structures, ovary and testicles, visualized by confocal microscopy, and to confirm the absence of structures in the inner layer of the tegument and cirrus, observed by scanning electron microscopy contribute to the description and study of the species.

Keywords: *Eurytrema coelomaticum*. Morphometry. Morphology. Brightfield microscopy. Confocal scanning laser microscopy. Scanning electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Aspecto ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i> de Hong-Kong.....	21
Figura 2 –	Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Eurytrema spp</i>	23
Figura 3 –	Mapa do Estado do Rio de Janeiro, mostrando a localização do Bairro de Santa Cruz e o Município de Barra Mansa.....	29
Figura 4 –	Desenho esquemático mostrando as variáveis morfométricas obtidas em <i>Eurytrema coelomaticum</i>	31
Figura 5 –	Imagens de <i>Eurytrema coelomaticum</i> obtidas por microscopia de campo claro	47
Figura 6 –	Aspecto ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i> por microscopia de campo claro	48
Figura 7 –	Imagens da região anterior e ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i> obtidas por microscopia de varredura a laser confocal	50
Figura 8 –	Imagens do sistema reprodutor masculino de <i>Eurytrema coelomaticum</i> obtidas por microscopia de varredura a laser confocal	51
Figura 9 –	Imagens do sistema reprodutor feminino e poro excretor de <i>Eurytrema coelomaticum</i> obtidas por microscopia de varredura a laser confocal....	52
Figura 10 –	Desenho esquemático das estruturas que compõem a bolsa do cirro com base nas imagens obtidas por microscopia de campo claro, de varredura a laser confocal e eletrônica de varredura	53
Figura 11 –	Desenho esquemático do sistema reprodutor feminino com base nas imagens obtidas por microscopia de luz de campo claro e varredura a laser confocal.....	54
Figura 12 –	Imagens de cortes histológicos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> obtidas por microscopia de campo claro	55
Figura 13 –	Microscopia eletrônica de varredura da superfície do tegumento de espécimes adultos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> mostrando as inclusões cúbicas de cristais de proteínas.....	57
Figura 14 –	Microscopia eletrônica de varredura da superfície ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Comparação das medidas do corpo de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	38
Gráfico 2 –	Comparação da relação: comprimento do corpo/ largura do corpo de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	39
Gráfico 3 –	Comparação do comprimento do corpo com medidas das ventosas oral e ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	40
Gráfico 4 –	Comparação do comprimento e da largura das ventosas oral e ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	40
Gráfico 5 –	Comparação da relação: largura da ventosa oral/ largura da ventosa ventral de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	41
Gráfico 6 –	Comparação do comprimento do corpo e da distância entre ventosas de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	42
Gráfico 7 –	Comparação do comprimento e da largura da faringe de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	42
Gráfico 8 –	Comparação do comprimento da bolsa do cirro de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	43
Gráfico 9 –	Comparação do comprimento e da largura dos testículos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	43
Gráfico 10 –	Comparação do comprimento e da largura do ovário de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	44
Gráfico 11 –	Comparação do comprimento das glândulas vitelínicas de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	44
Gráfico 12 -	Comparação do comprimento e da largura dos ovos uterinos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência para coloração de <i>Eurytrema coelomaticum</i> pelo carmin clorídrico	30
Tabela 2 – Sequência para processamento histológico de <i>Eurytrema coelomaticum</i> ...	33
Tabela 3 – Sequência para coloração de cortes histológicos de <i>Eurytrema coelomaticum</i> pela hematoxilina.....	33
Tabela 4 – Dados morfométricos (mm) e análise estatística (ANOVA) de <i>Eurytrema coelomaticum</i> provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).....	36
Tabela 5 - Comparação dos dados morfométricos (mm) de <i>Eurytrema coelomaticum</i> descritos na literatura com o presente estudo.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFA	Ácido acético, formalina e álcool
ANOVA	Análise estatística de variância
A-VV	Distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral
BC	Bolsa do cirro
C	Cirro
CC	Comprimento do corpo
Ce	Ceco
CENABIO	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
Ce-P	Distância entre região posterior do corpo e ceco
CHIOC	Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz
CL	Canal de Laurer
CP	Cristais de proteínas
CS	Células secretoras
DE	Ducto ejaculatório
DV	Ducto vitelínico
E	Esôfago
Es	Espermatozoide
F	Faringe
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GM	Glândulas de Mehlis
Gp	Gonoporo
GP	Glândula prostática
GV	Glândula vitelínica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission Radiation</i>
LC	Largura do corpo
O	Ovo
Od	Oviduto
Oo	Oócito
Ot	Oótipo

Ov	Ovário
PE	Poro excretor
RC	Reentrâncias do corpo
RLCE	Ramos laterais do canal excretor
RV	Reservatório vitelínico
T	Testículo
U	Útero
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VE	Vesícula excretora
VO	Ventosa oral
VO- VV	Distância entre ventosa oral e ventosa ventral
VS	Vesícula seminal
VV	Ventosa ventral
VV-P	Distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
N.	Número
s	Segundo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	17
2	GÊNERO EURYTREMA	18
3	<i>Eurytrema coelomaticum</i> (GIARD & BILLET, 1892) LOOSS 1907.....	20
4	CICLO BIOLÓGICO	22
5	EURITREMATOSE	24
6	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	25
7	JUSTIFICATIVA	26
8	OBJETIVOS	27
8.1	Geral	27
8.2	Específicos	27
9	MATERIAL E MÉTODOS	28
9.1	Obtenção de parasitos	28
9.2	Fixação e coloração dos helmintos para microscopia de campo claro e varredura a laser confocal	29
9.3	Análise morfométrica	30
9.4	Análise morfológica por microscopia de campo claro	32
9.5	Análise morfológica por microscopia de varredura a laser confocal	32
9.6	Análise histológica por microscopia de campo claro	32
9.7	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura	34
9.8	Análise estatística	34
10	RESULTADOS	35
10.1	Morfometria	35
10.2	Morfologia	46
10.2.1	<u>Análise morfológica por microscopia de campo claro</u>	46
10.2.2	<u>Análise morfológica por microscopia de varredura a laser confocal</u>	49
10.2.3	<u>Análise histológica por microscopia de campo claro</u>	55
10.2.4	<u>Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura</u>	56
11	DISCUSSÃO	59
	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

INTRODUÇÃO

Os trematódeos pertencentes ao Filo Platyhelminthes são animais geralmente de corpo chato, tegumento liso ou provido de espinhos normalmente pouco desenvolvidos. Apresentam uma ventosa oral anterior e uma segunda ventosa ventral ou acetábulo situada no meio da face ventral, ou então terminal, que pode ser rudimentar ou deixar de existir. São parasitos em todas as fases do ciclo, evoluindo sempre em pelo menos dois hospedeiros, um molusco e outro vertebrado (TRAVASSOS, 1950; DA FONSCECA & PEREIRA, 2002; BRAY & GIBSON, 2008).

As espécies do gênero *Eurytrema*, apresentam alta relevância na medicina veterinária. Porém, ainda existe uma série de conflitos na literatura quanto à diferenciação morfológica de algumas espécies.

Em 1892 Giard & Billet descreveram *Eurytrema coelomaticum* como *Distoma coelomaticum*, posteriormente Railliet & Marotel (1898) a denominaram como *Dicrocoelium pancreaticum* e por fim Looss & Cuffey (1907) consideraram estas espécies sinônimas e as redescreveram como *Eurytrema coelomaticum*.

Os helmintos desta espécie parasitam comumente os ductos pancreáticos, ocasionalmente ductos biliares e raramente intestino delgado de ruminantes, sendo descritos em bovinos, caprinos, ovinos, bubalinos, leporinos e camelídeos (MATTOS JR; VIANNA, 1987). *Eurytrema coelomaticum* é descrito como um dos agentes etiológicos da euritrematose, que pode causar alterações nos hospedeiros definitivos como pancreatite, caquexia e diabetes. Aparece com prevalência no Brasil, já sendo considerado por alguns autores endêmica. Porém, existem diversos dados na literatura quanto a sua distribuição geográfica e similaridade com *E. pancreaticum* (Janson, 1889), que por vezes já foram consideradas sinônimas.

Trabalhos recentes de biologia molecular mostraram dados que as separam em duas espécies distintas (ZHENG et al., 2007 e CAI et al., 2012). No entanto este trabalho não detalhou a morfologia destes parasitos, restando ainda uma série de lacunas em relação à diferenciação morfológica entre estas espécies.

1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Filo Platyhelminthes

Subclasse Trematoda (Rudolphi, 1808)

Infraclasse Digenea (Van Beneden, 1858)

Ordem Plagiorchida (La Rue, 1957)

Família Dicrocoeliidae (La Rue, 1957)

Gênero *Eurytrema* (Looss, 1899)

Eurytrema coelomaticum (Giard & Billet, 1892)

2 GÊNERO EURYTREMA

O gênero *Eurytrema* foi descrito por Looss (1899) sendo *E. pancreaticum* a espécie tipo. Em 1907 Looss e Cuffey descrevem *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum* como espécies distintas. No entanto, por algum tempo, autores como Travassos (1919), Dollfus (1922), Ware (1923), Purvis (1931) e Tang & Tang (1977) as consideravam sinônimas.

Bhalerao (1936) revisou a literatura sobre o gênero *Eurytrema* e reconheceu 17 espécies, que foram agrupadas em 5 subgêneros, sendo *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum* considerados sinônimas.

Travassos (1944), na revisão da família Dicrocoeliidae, reduziu o número de espécies deste gênero para 9 e os subgêneros para 4 e reconheceu efetivamente *E. coelomaticum* como espécie distinta de *E. pancreaticum*, ressaltou ainda que a espécie prevalente na América do Sul era *E. coelomaticum*. Segundo Travassos (1944), os helmintos adultos de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* se distinguem pela relação e tamanho das ventosas, onde *E. coelomaticum* apresenta ventosas com diâmetro subigual, enquanto que *E. pancreaticum* apresenta a ventosa oral significativamente maior que a ventosa ventral; e ainda, em *E. coelomaticum* a distância entre ventosas é menor, apresentando normalmente menos de um terço do tamanho do corpo do helminto. A partir desta consideração, outros autores começaram a caracterizá-los como espécies diferentes acrescentando informações morfológicas a *E. coelomaticum*, como por exemplo, a ausência de circunvoluções do útero na região anterior a ventosa ventral e morfologia das glândulas vitelínicas como pequenos folículos arredondados (EDUARDO et al., 1976).

Levando em consideração a classificação de Looss (1907) e a afirmação de Travassos (1944), muitos autores podem ter identificado *E. pancreaticum* em seus trabalhos, quando na realidade se tratava de *E. coelomaticum*, como Horta (1918), Figueiredo (1928), Freire (1967), Campos et al. (1974), Ribeiro et al. (1980), Buseti et al. (1983) e Correa et al. (1984). O mesmo pode ter ocorrido em outros países do continente sul americano, como na Venezuela, onde Mayaundon (1954) reportou a ocorrência de *E. pancreaticum* e levantou suspeita de que o animal parasitado fora importado do Brasil (BASSANI et al., 2007).

Zheng (2007) e Cai (2012) comprovaram que *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* tratam-se de espécies distintas com base em sequências do RNA ribossomal 18S. A árvore filogenética inferida a partir destes estudos demonstrou que estes helmintos não estão situados no mesmo ramo, o que indica que sejam espécies diferentes. A partir da árvore filogenética,

presumiu-se que o ancestral comum do gênero *Eurytrema* se divergiu em dois ramos. Um ramo incluindo *E. cladorchis* adaptado ao parasitismo em animal selvagem, enquanto que o outro ramo incluindo *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum* adaptado para o parasitismo nos animais domésticos. Figueira et al. (2014) fez a mesma análise filogenética de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* nas Américas, chegando também a conclusão destes se tratarem de espécies filogeneticamente distintas.

Sakamoto & Oikawa (2007), visualizaram pela primeira vez helmintos das espécies *E. pancreaticum* e *E. coelomaticum* na sua fase adulta em microscópios eletrônicos de varredura e de transmissão e identificaram a presença de estruturas na neoderme destas espécies, eles caracterizaram estas estruturas como inclusões cúbicas de cristais de proteína.

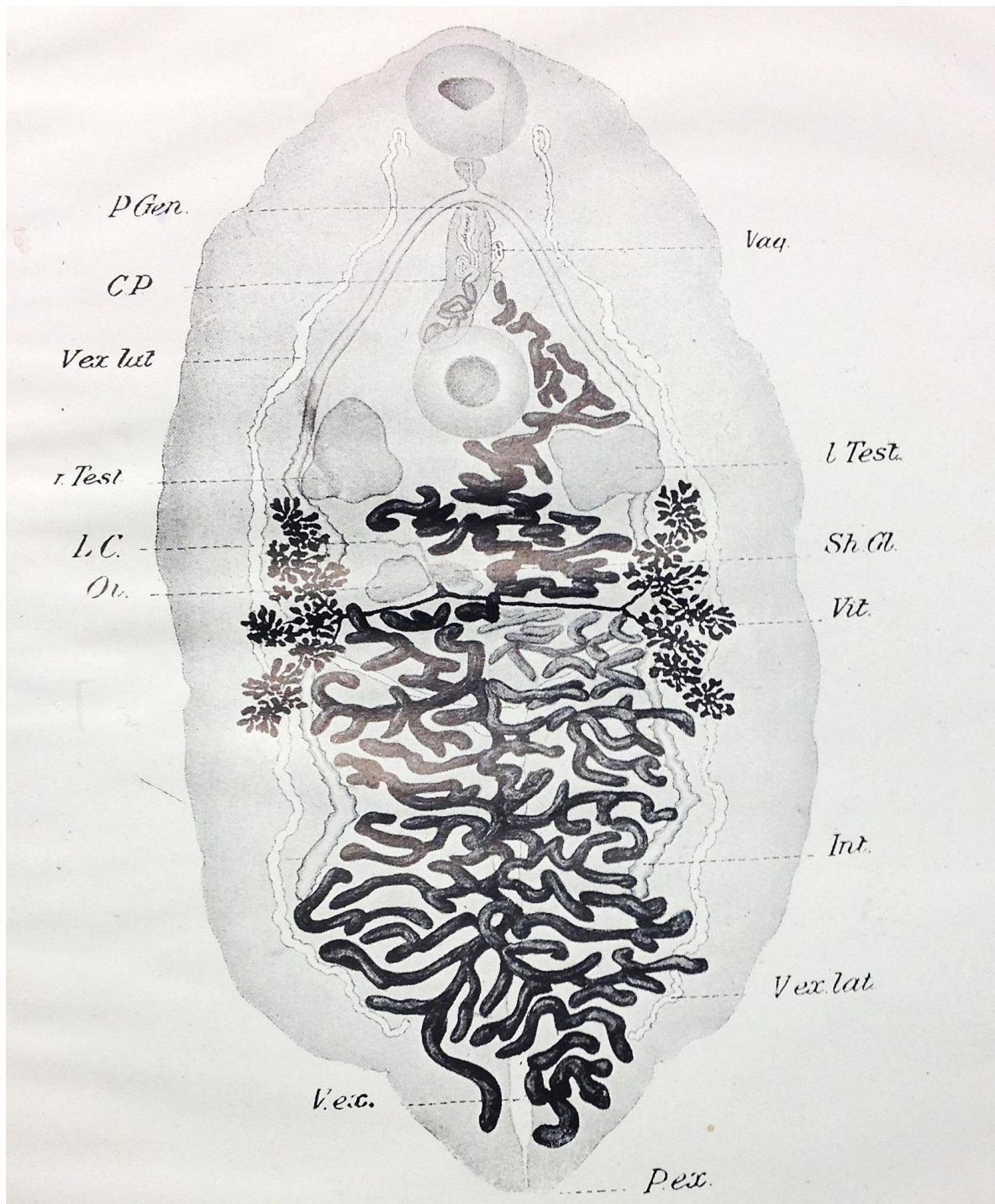
Em sua revisão sobre euritrematose bovina, Bassani (2007), apresenta uma tabela com as principais publicações do gênero *Eurytrema*, contemplando os autores, espécies e regiões de procedência. Na tabela aparecem cerca de treze autores que registraram a presença de *E. coelomaticum* no Brasil em bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos e sete autores registraram infecções por *E. pancreaticum* nestes mesmos hospedeiros e também em camelídeos e suínos.

3 *Eurytrema coelomaticum* (GIARD & BILLET, 1892) LOOSS, 1907

Helmintos adultos de *Eurytrema coelomaticum* foram descritos por Looss & Cuffey (1907) apresentando a morfologia geral do corpo alongada e achatada, com aspecto ovoide à filiforme. O comprimento do corpo com variação de 7,5 mm a 10 mm. As ventosas oral e ventral são de tamanho subigual, sendo a ventosa oral subterminal e a ventral voltada para a face ventral. O poro genital está localizado ligeiramente após a bifurcação do esôfago e as glândulas vitelínicas estão situadas na região mediana do corpo (Figura 1).

Posteriormente, Travassos (1969) faz uma descrição mais detalhada da espécie concluindo que *E. coelomaticum* possui corpo com tegumento liso, achatado medindo 10 a 13 mm de comprimento por 6 a 7 mm de largura. A ventosa oral é subterminal apresentando de 0,9 a 1 mm de diâmetro. A ventosa ventral está localizada no terço médio do corpo, com dimensões iguais às da ventosa oral. A faringe, o esôfago e os cecos intestinais são delgados. O poro genital está localizado ligeiramente posterior à bifurcação do esôfago. A bolsa do cirro apresenta-se de tamanho proporcionalmente grande e geralmente claviforme. Os testículos são pós-acetabulares com zonas coincidentes e campos afastados. O ovário é submediano, e pós-testicular. As glândulas de Mehlis, a espermateca (receptáculo seminal) e o canal de Laurer estão presentes. Os vitelinos laterais (glândulas vitelínicas) estão localizados extracecais e com alguns folículos intercecais. Os ovos medem 0,042-0,50 mm de comprimento por 0,023-0,03 mm de largura. A vesícula excretora é simples e o poro excretor é terminal.

Figura 1- Aspecto ventral de *Eurytrema coelomaticum* de Hong-Kong



Legenda: (P.Gen.) - poro genital, (Vag.) - vagina, (C.P.) - bolsa do cirro, (V.ex. lat.) - ramos laterais da vesícula excretora, (r. Test.) - testículo direito, (l. Test.) - testículo esquerdo, (L.C.) - canal de Laurer, (Sh.G.) - glândula de Mehlis, (Ov.) - ovário, (Vit.) - glândula vitelínica, (Int.) - intestino ou ceco, (V. ex.) - vesícula excretora, (P. ex.) - poro excretor.

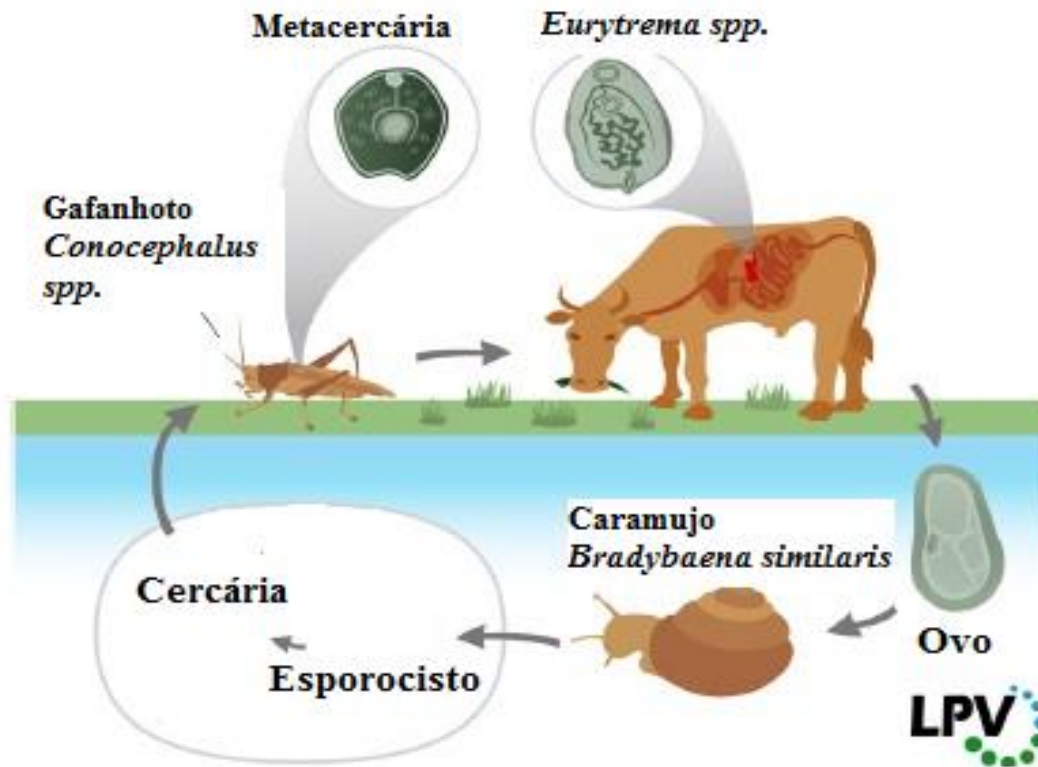
Fonte: LOOSS, A. & CUFFEY, E, 1907.

4 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico de *E. coelomaticum* é do tipo heteroxeno, sendo o primeiro hospedeiro intermediário representado por espécies de moluscos gastrópodes terrestres do gênero *Bradybaena*, que ingerem os ovos provenientes das fezes dos hospedeiros definitivos (Figura 2).

Bradybaena similaris (Fèrussac, 1821), foi descrita no Brasil como o primeiro hospedeiro intermediário de *E. coelomaticum* (RAGUSA & CAMPOS, 1976). Após sair do ovo o miracídio penetra na parede do tubo digestivo do caramujo, onde se desenvolve em esporocisto-mãe. Esses crescem e no seu interior muitos esporocistos-filhos se desenvolvem. O desenvolvimento no interior do molusco se completa em 90 dias após a infecção sob temperatura de 26°C. Os esporocistos-filhos, quando se tornam alongados, abandonam o esporocisto-mãe e migram para a superfície externa do trato digestivo, atingindo a abertura respiratória, por meio da cavidade hemocelomática, sendo liberados no ambiente. Estes, por sua vez, contêm centenas de cercárias que apresentam morfologia distinta entre *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*. A emergência dos esporocistos-filhos normalmente ocorre horas antes do amanhecer (ITAGAKI & CHINONE, 1982). O segundo hospedeiro intermediário é representado por um artrópode do gênero *Conocephalus* conhecido vulgarmente como “esperança”. De acordo com Ragusa & Campos (1976), estes ingerem as cercárias, que dentro do seu celoma se desenvolvem em metacercárias sendo este fenômeno influenciado pelo aumento de temperatura, onde, em torno de 15 dias a 30 °C ocorre seu amadurecimento. A partir de um único ovo de *Eurytrema* são produzidos cerca de 100 esporocistos filhos, que por sua vez contêm em torno de 200 cercárias, perfazendo um total de 20.000 formas infectantes, representadas pelas metacercárias (ITAGAKI & CHINONE, 1982). Tang & Tang (1977) relataram que as metacercárias são encontradas na cavidade abdominal do inseto, podendo ou não atingir a região do tórax. Seu número pode variar de 1 a 461 metacercárias por inseto. Os hospedeiros definitivos, bovinos, ovinos, caprinos, camelídeos e até mesmo o homem adquirem a infecção através da ingestão de metacercárias eliminadas pelos insetos sobre as pastagens (BASCH, 1966). As metacercárias são liberadas dos cistos no duodeno, migrando posteriormente para o pâncreas (MATTOS Jr. & VIANNA, 1987; JUBB, 1993). Nos hospedeiros definitivos o período pré-patente é de 90 a 100 dias e o período patente é de um a dois anos. Os parasitos adultos mantêm-se no pâncreas, ductos pancreáticos, ductos biliares e mais raramente intestino delgado.

Figura 2 – Representação esquemática do ciclo biológico de *Eurytrema spp.*



Legenda: Fases: ovo, esporocisto, cercária, metacercária e helminto adulto. LPV- Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Fonte: TESSELE, B. et al. (2013) adaptado.

5 EURITREMATOSE

As espécies de *Eurytrema* alojam-se inicialmente no ducto pancreático, embora infecte o trato biliar simultaneamente, podendo produzir pancreatite intersticial e subsequente obstrução ductal.

Com relação à patogenia, Figueiredo (1928) descreveu as lesões produzidas pelo *E. coelomaticum* como um processo de pancreatite intersticial crônica com proliferação de tecido conjuntivo, destruição dos ácinos glandulares, conservação das ilhotas de Langerhans e infiltrações linfocitárias, sendo este aspecto relacionado com os arredores dos locais onde são encontrados os parasitos. Outras alterações clínicas como ligeira caquexia, debilidade, ausência de diarreia, anemia e alterações cardiorrespiratórias foram descritas por Correa et al. (1984).

Em geral, os animais parasitados apresentam infecção subclínica, sendo comum os casos assintomáticos. Quando sintomáticos o diagnóstico laboratorial da euritrematose baseia-se em exames coproparasitológicos e os animais infectados podem ser tratados com fármacos anti-helmínticos, apesar de trabalhos terem mostrado a baixa eficiência destes para combater a infecção (BASSANI, 2007).

6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A distribuição geográfica do *Eurytrema spp.* é ampla, ocorrendo na Europa, Rússia Oriental, Ásia e também na América do Sul (YAMAGUTI, 1975).

Segundo Manninger & Mocsy (1973) espécies de *Eurytrema* foram registradas em bovinos e caprinos na Índia, Indonésia, Japão, América do Sul, e em camelos na Ásia Central.

Outros autores fizeram registros em outros animais como, búfalos, bovinos, ovinos e caprinos no Japão, Indochina, Índia e América do Sul (LAPAGE, 1956; NIEBERLE & COHRS, 1970).

No Brasil o primeiro caso de infecção por *Eurytrema spp.* foi diagnosticado em ruminantes (HORTA, 1918). No entanto, somente a partir de 1976 é que se tomou conhecimento de estudos biológicos do *E. coelomaticum*, e poucos trabalhos foram desenvolvidos desde então.

7 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a dificuldade de diferenciação e identificação das espécies do gênero *Eurytrema* faz-se necessário uma maior investigação sobre as características morfológicas de *E. coelomaticum* em sua fase adulta. O avanço da microscopia nas últimas décadas tem motivado os pesquisadores a aplicarem essas técnicas para o conhecimento e/ou aprofundamento nas características dos helmintos em diferentes temáticas da helmintologia, como a taxonomia e sistemática, biologia, avaliação de efeitos de fármacos, entre outras. Com esse propósito foram realizadas microscopias de campo claro, varredura a laser confocal e eletrônica de varredura com intuito de acrescentar informações morfométricas e morfológicas que contribuam na identificação da espécie *E. coelomaticum* e quiçá sua distribuição geográfica e epidemiologia.

8 OBJETIVOS

8.1 Geral

Realizar caracterização detalhada da morfologia e morfometria de helmintos adultos de *Eurytrema coelomaticum* recuperados de bovinos no Município do Rio de Janeiro, Bairro de Santa Cruz e Município de Barra mansa, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

8.2 Específicos

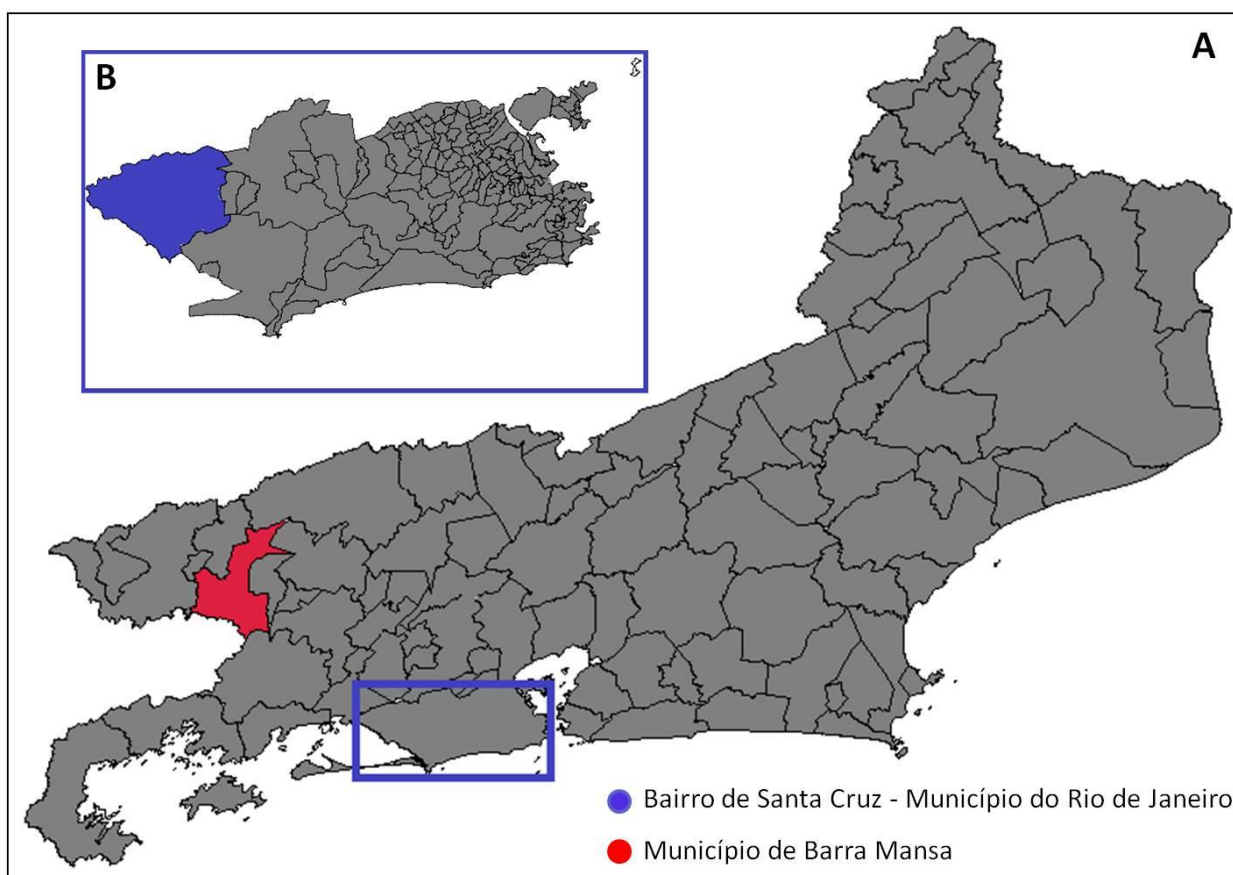
- a) Realizar a caracterização morfológica e morfométrica das estruturas com potencial taxonômico, utilizando a microscopia de campo claro;
- b) Detalhar a organização e distribuição das estruturas internas utilizando a microscopia de varredura a laser confocal;
- c) Realizar cortes histológicos para contribuir com a caracterização morfológica;
- d) Descrever a ultraestrutura de superfície dos parasitos utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Obtenção dos parasitos

Parte das amostras utilizadas nesse estudo foi doada pela Dr^a Delir Corrêa Gomes Maués da Serra Freire do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Esse material havia sido coletado por este grupo durante abate de um bovino no Bairro de Santa Cruz (22° 55' 13" S e 43° 41' 6" O) Zona Oeste do município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro (Figura 3 A). Outras amostras foram cedidas pelo Dr. Jairo Pinheiro da Silva da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Estas haviam sido coletadas de bovinos no Município de Barra Mansa (22°32'25,19"S e 44°10'35,33"O), Estado do Rio de Janeiro (Figura 3 B). Todos os bovinos foram abatidos em abatedouros registrados e as amostras doadas pelos responsáveis por estes estabelecimentos. As amostras foram comparadas com espécimes identificados como *E. coelomaticum* depositados no acervo da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) (N. 34174 *Bos taurus* – Pâncreas – Bálamo, Santa Catarina 12-910; N.1.159 a. *Bos tauros* – Pâncreas – Bálamo. Retiro, Minas Gerais, 9-916; N. 17.423 *Bos tauros* – Pâncreas – Bálamo. Retiro, Minas Gerais; N. 25.087 *Bos tauros* – Pâncreas – Bálamo. Brasil; N. 34.174 *Bos tauros* – Bálamo, 20-07-99).

Figura 3 – Mapa do Estado do Rio de Janeiro, mostrando a localização do Bairro de Santa Cruz e o Município de Barra Mansa



Legenda: A- Estado do Rio de Janeiro - Município de Barra mansa (vermelho) ; B – Bairro de Santa Cruz (azul) Município do Rio de Janeiro.

Fonte: A- Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Riodejaneiro_estado.gif> – adaptado.

B – Disponível em: <<http://portalgeo.rio.rj.gov.br/bairros Cariocas/imagens/bairros.gif>> - adaptado.

9.2 Fixação e coloração dos helmintos para microscopia de campo claro e varredura a laser confocal

Os helmintos recuperados de bovino em Santa Cruz se encontravam fixados e conservados em AFA (álcool 70%, formol 37% e ácido acético puro), já os recuperados de bovinos em Barra Mansa tinham sido fixados em AFA e conservados em álcool 70%, as lâminas depositadas na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), se encontravam coradas pelo carmim clorídrico e montadas em bálsamo.

Para a coloração foi realizado um processo regressivo segundo AMATO et al., (1991) adaptado conforme a tabela 1.

Após a coloração foram montadas lâminas histológicas permanentes, pingando uma gota de bálsamo do Canadá sobre a lâmina em seguida depositando o helminto sobre o bálsamo e colocando a lamínula sobre o material. Todas as lâminas foram numeradas e identificadas.

Tabela 1. Sequência para coloração de *Eurytrema coelomaticum* pelo carmim clorídrico

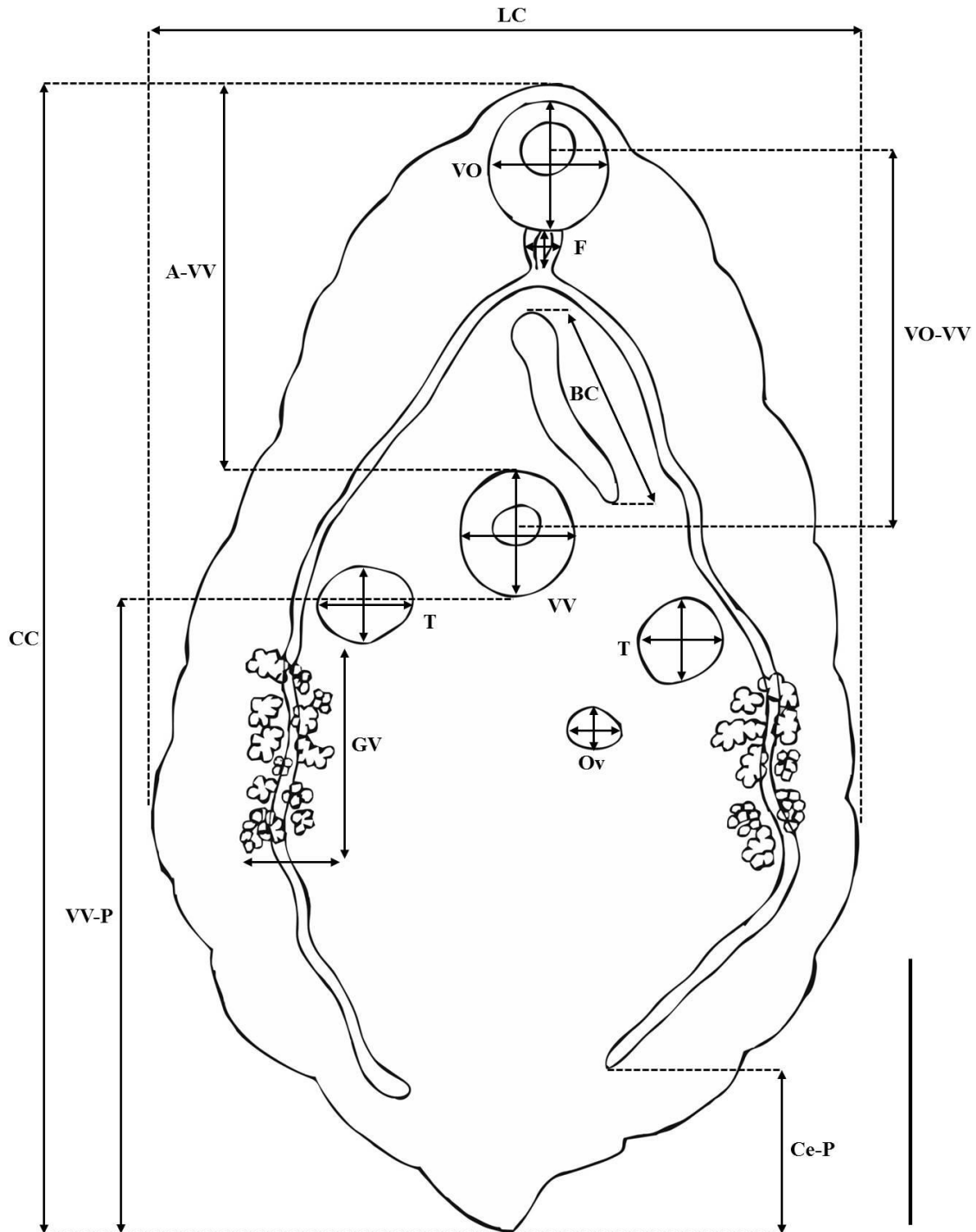
Reagentes	Tempo
Álcool 70%	15 min
Carmim clorídrico	8-10 min
Álcool 70%	15 min
Álcool 80%	15 min
Álcool 90%	15 min
Álcool 100%	15 min
Álcool 100%	15 min
Salicilato de metila	1-2h

Fonte: AMATO et al. (1991). Adaptado.

9.3 Análise morfométrica

Os espécimes foram observados por microscopia de campo claro (Olympus CX31, Japão) e desenhados com o auxílio de câmara clara acoplada ao equipamento. As estruturas morfológicas foram medidas nos desenhos com auxílio de régua e os dados morfométricos observados são apresentados na Figura 4. As seguintes medidas lineares foram tomadas: comprimento do corpo (CC), - largura do corpo (LC), - distância entre a região anterior do corpo e ventosa ventral (A-VV), comprimento e largura da ventosa oral (VO), comprimento e largura da faringe (F), distância entre ventosa oral e ventosa ventral (VO-VV), comprimento da bolsa do cirro (BC), comprimento e largura da ventosa ventral (VV), comprimento e largura dos testículos (T), comprimento e largura do ovário (Ov), comprimento e largura das glândulas vitelínicas (GV), distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo (VV-P) e distância entre ceco e região posterior do corpo (Ce-P).

Figura 4. Desenho esquemático mostrando as variáveis morfométricas obtidas em *Eurytrema coelomaticum*.



Legenda: CC- comprimento do corpo; LC- largura do corpo; A-VV- distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral; VO- ventosa oral comprimento e largura; F- faringe; VO-VV- distância entre ventosa oral e ventosa ventral; BC- bolsa do cirro comprimento; VV- ventosa ventral comprimento e largura; T – testículo comprimento e largura; Ov – ovário comprimento e largura; GV- glândula vitelínica comprimento e largura; VV-P- distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo; Ce-P - distância entre ceco e região posterior do corpo – escala 1mm.

Fonte: A autora.

9.4 Análise morfológica por microscopia de campo claro

Cada lâmina foi observada com o uso do microscópio de campo claro (Nikon H600L, Japão) acoplado a câmera fotográfica digital (Nikon DS-Ri1, Japão) na Disciplina de Parasitologia da UERJ, onde observamos o formato e a posição dos órgãos do helminto.

9.5 Análise morfológica por microscopia de varredura a laser confocal

As mesmas lâminas coradas pelo carmim e analisadas por microscopia de campo claro também foram caracterizadas com o uso da microscopia de varredura a laser confocal (Nikon, modelo C2, Estados Unidos), no Laboratório de Microscopia Confocal/Fluorescência da UERJ. Utilizamos a unidade de laser: módulo de 3-laser, detector padrão fluorescente até 4 canais e detector diascópico de 1 canal. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram respectivamente 556 nm e 573 nm e Pinhole com abertura de 1,4. Onde observamos a musculatura do tegumento, ventosas e faringe, a forma dos órgãos reprodutores e a presença de células reprodutivas nestes.

9.6 Análise histológica por microscopia de luz de campo claro

Os espécimes foram processados conforme Tabela 2, incluídos em parafina, cortados longitudinalmente com espessura de 3 μm em micrótomo (American Optical 820, Estados Unidos) no Departamento de Patologia, Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Posteriormente foram desparafinizados e corados por hematoxilina e eosina conforme Tabela 3.

Tabela 2 - Sequência para processamento histológico de *Eurytrema coelomaticum*

Estágios	Reagentes	Tempo
Lavagem	Água corrente	5 min
Desidratação	Álcool absoluto 4x	15 min
Diafanização	Xilol 3x	15 min
Impregnação	Parafina 2x	30 min

Fonte: CAPUTO et al. (2009). Adaptado.

Tabela 3 - Sequência para coloração dos cortes histológicos de *Eurytrema coelomaticum* pela hematoxilina e eosina

Estágios	Reagentes	Tempo
Desparafinização	Xilol	20 s
Desparafinização	Xilol	20 s
Hidratação	Álcool 100%	30 s
Hidratação	Álcool 90%	30 s
Hidratação	Álcool 70%	30 s
Hidratação	Água destilada	10 s
Coloração	Hematoxilina	20 min
Lavagem	Água corrente	4 min
Lavagem	Água destilada	10 s
Desidratação	Álcool 80%	1 min
Coloração	Eosina	2 min
Lavagem	Água corrente	2 min
Lavagem	Água destilada	10 s
Desidratação	Álcool 70%	1 min
Desidratação	Álcool 90%	1 min
Desidratação	Álcool 100%	1 min
Diafanização	Xilol	2 min
Diafanização	Xilol	2 min

Fonte: CAPUTO et al. (2009). Adaptado.

Após a coloração as lâminas permanentes foram montadas em Entellan (Merck). Todas as lâminas foram numeradas e identificadas.

Em seguida as lâminas foram observadas através da microscopia de campo claro (Olympus - BX41, Japão) acoplado à câmera fotográfica (Nikon - Bel photonics, Japão) para análise das ventosas, faringe, bolsa do cirro, ovário e testículos.

9.7 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura

As amostras que já se encontravam fixadas e conservadas tanto em AFA quanto em álcool 70% foram montadas em uma cesta de ponto crítico, desidratadas em soluções de etanol de concentração crescente, 70%, 80%, 90%, 100% (2x) e 100% super seco por 40 min de imersão em cada em temperatura ambiente. Logo, a cesta contendo as amostras foram transferidas para o aparelho e secas pelo método de ponto crítico em CO₂. Posteriormente, as amostras foram montadas em *stubs*, com o auxílio de estilete, pincel e estereomicroscópio para que os helmintos pudessem ser orientados e aderidos ao suporte metálico coberto por fita adesiva de carbono. Alguns foram posicionados com a face ventral voltada pra cima e outros com a face dorsal. Todas as amostras foram metalizadas, com uma fina camada (20-25nm) de ouro (DE SOUZA, 2011).

Após a metalização as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura em modo de alto vácuo (Zeiss, EVO-MA10) situado no Centro de Microscopia da UFRJ (CENABIO).

9.8 Análise estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando o método de comparação múltipla de *Tukey* no programa *GraphPad InStat* (versão 3.01) para verificar se existe diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente. Foram consideradas diferenças significativas $P < 0,05$. A partir destes dados foram elaborados tabelas e gráficos.

10 RESULTADOS

10.1 Morfometria

Dos 55 espécimes de Santa Cruz, Barra Mansa e depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz foram analisadas as seguintes características: comprimento e largura do corpo, relação do comprimento do corpo pela largura do corpo, distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral, distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo, distância entre ceco e região posterior do corpo, comprimento e largura da ventosa oral, comprimento e largura da ventosa ventral, relação da largura da ventosa oral pela largura da ventosa ventral, distância entre ventosas, comprimento e largura da faringe, comprimento da bolsa do cirro, comprimento e largura dos testículos, comprimento e largura do ovário, comprimento e largura da glândula vitelínica e comprimento e largura dos ovos uterinos. Os dados sobre a média, desvio padrão, valores mínimo e máximo e análise estatística de variância (ANOVA) são apresentados na tabela 4 e uma comparação dos dados do presente estudo com os dados descritos na literatura é apresentada na tabela 5. Os valores são apresentados em milímetros (mm).

Os 50 espécimes provenientes do Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, Rio de Janeiro apresentaram as seguintes variações morfométricas: comprimento do corpo 3,87 a 8,95, largura 2,09 a 4,91; a relação comprimento do corpo pela largura do corpo 1,37-3,04; distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral 1,38-1,69; distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo 1,98-5,35; distância entre ceco e região posterior do corpo 0,5-1,69; ventosa oral com comprimento de 0,5-0,96 e largura de 0,45-0,91; ventosa ventral com comprimento de 0,46-0,88 e largura de 0,46-0,85; a relação entre largura da ventosa oral pela largura de ventosa ventral foi de 0,77-1,20; distância entre ventosas 1,38-2,74; a faringe apresentou 0,11-0,29 de comprimento e 0,10-0,29 de largura; comprimento da bolsa do cirro 0,64-1,66; o testículo direito (próximo ao ovário) apresentou comprimento de 0,16-1,10 e largura de 0,24-0,88; o testículo esquerdo (lado oposto ao do ovário) apresentou comprimento de 0,2-0,82 e largura de 0,16-0,83; comprimento do ovário 0,09-0,38 e largura 0,16-0,48; as glândulas vitelínicas apresentaram comprimento de 0,67-2,14 e largura de 0,33-0,93; os ovos uterinos apresentaram comprimento de 0,038-0,049 e largura de 0,026-0,03.

Tabela 4: Dados morfométricos (mm) e análise estatística (ANOVA) de *Eurytrema coelomaticum* provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e no Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC)

	Santa Cruz (n=25)	Barra Mansa (n=25)	CHIOC (n=5)	P < 0,05
Comprimento do corpo (CC)	5,58±1,14 (3,87-8,54)	7,07±1,24 (4,43-8,95)	8,37±2,39 (6,77-12,58)	a/b
Largura do corpo (LC)	2,77±0,40 (2,09-3,54)	3,66±0,69 (2,20-4,91)	3,75±0,54 (3,03-4,32)	a/b
Relação CC/LC	2,01±0,23 (1,68-2,76)	1,94±0,32 (1,37-3,04)	2,21±0,41 (1,86-2,91)	-
Distância entre A-VV	1,85±0,32 (1,38-2,51)	2,27±0,31 (1,69-2,80)	2,87±0,43 (2,58-3,62)	a/b/c
Distância entre VV-P	3,08±0,80 (1,98-5,24)	4,0±0,82 (2,41-5,35)	4,76±1,78 (3,35-7,85)	a/b
Distância entre Ce-P	0,95±0,29 (0,5-1,54)	1,18±0,26 (0,79-1,69)	1,29±0,92 (1,17-1,38)	A
Comprimento VO	0,63±0,11 (0,5-0,83)	0,78±0,44 (0,62-0,96)	0,81±0,83 (0,75-0,96)	a/b
Largura VO	0,60±0,11 (0,45-0,87)	0,69±0,10 (0,54-0,91)	0,79±0,13 (0,67-1,0)	a/b
Comprimento VV	0,61±0,08 (0,46-0,74)	0,77±0,06 (0,64-0,88)	0,91±0,13 (0,77-1,12)	a/b/c
Largura VV	0,59±0,08 (0,46-0,74)	0,74±0,06 (0,61-0,85)	0,82±0,08 (0,69-0,90)	a/b
Relação entre largura VO/VV	1,0±0,11 (0,77-1,20)	0,92±0,10 (0,77-1,17)	0,95±0,11 (0,79-1,11)	-
Distância entre VO-VV	1,86±0,35 (1,38-2,58)	2,26±0,30 (1,69-2,74)	2,94±0,43 (2,52-3,62)	a/b/c
Comprimento faringe	0,17±0,06 (0,11-0,29)	0,22±0,03 (0,16-0,29)	0,16±0,04 (0,14-0,24)	A
Largura faringe	0,18±0,04 (0,10-0,30)	0,22±0,03 (0,17-0,29)	0,21±0,05 (0,16-0,29)	A
Comprimento bolsa do cirro	0,85±0,13 (0,64-1,20)	1,23±0,18 (0,95-1,66)	1,51±0,23 (1,29-1,85)	a/b/c
Comprimento testículo direito	0,37±0,12 (0,16-0,64)	0,55±0,13 (0,32-1,0)	0,55±0,08 (0,45-0,64)	a/ b
Largura testículo direito	0,41±0,12 (0,24-0,64)	0,55±0,15(0,35-0,88)	0,51±0,08 (0,40-0,61)	A
Comprimento testículo esquerdo	0,38±0,12 (0,20-0,62)	0,51±0,12 (0,32-0,82)	0,58±0,04 (0,56-0,67)	a/b
Largura testículo esquerdo	0,41±0,12 (0,16-0,64)	0,57±0,13 (0,33-0,83)	0,53±0,06 (0,43-0,59)	A
Comprimento do ovário	0,20±0,06 (0,09-0,33)	0,25±0,06 (0,14-0,38)	0,36±0,12 (0,29-0,58)	a/b/c
Largura do ovário	0,24±0,07 (0,16-0,45)	0,29±0,08 (0,16-0,48)	0,40±0,17 (0,19-0,62)	b/c
Comprimento glândulas vitelínicas	1,04±0,30 (0,67-1,91)	1,50±0,37 (0,88-2,14)	1,62±0,67 (1,09-2,61)	a/b
Largura glândulas vitelínicas	0,52±0,14 (0,33-0,91)	0,62±0,13 (0,35-0,93)	0,71±0,15 (0,48-0,88)	a/b
Comprimento ovo uterino	0,043±0,003 (0,038-0,049)	0,042±0,003 (0,037-0,049)	0,043±0,003 (0,039-0,049)	-
Largura ovo uterino	0,028±0,001 (0,026-0,030)	0,027±0,001 (0,026-0,030)	0,027±0,002 (0,025-0,030)	-

Legenda: Dados morfométricos média ± desvpad (mínimo-máximo); A-VV (região anterior do corpo e ventosa ventral), VV-P (ventosa ventral e região posterior do corpo), Ce-P (ceco e região posterior do corpo); P = análise de variância (ANOVA) a - quando há diferença significativa entre Santa Cruz x Barra Mansa; b- quando há diferença significativa entre Santa Cruz x CHIOC; c- quando há diferença significativa entre Barra Mansa x CHIOC.

Tabela 5 – Comparação dos dados morfométricos (mm) de *Eurytrema coelomaticum* descritos na literatura com o presente estudo

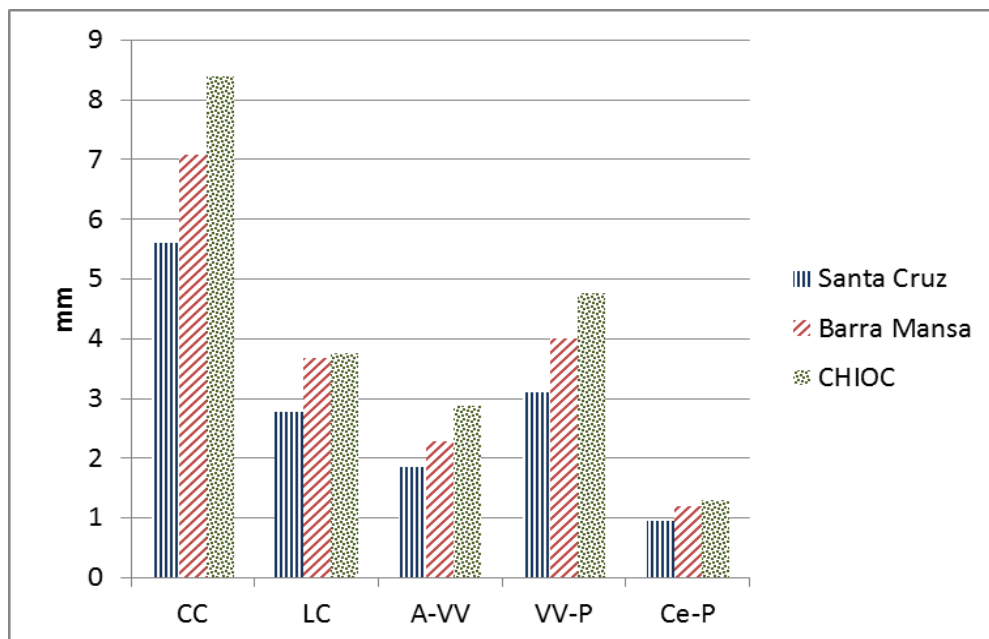
	Giard & Billet, 1892	Railliet & Marotel, 1898	Looss & Cuffey, 1907	Travassos, 1944	Presente estudo
Comprimento do corpo	15	7-10	7,5-10	10-13	6,51±1,59
Largura do corpo	5	4-4,5	3,5-5,5	6-7	3,26±0,71
Diâmetro da ventosa oral	-	0,7-0,9	0,83-0,95	0,9-1	0,72±0,13
Diâmetro da ventosa ventral	-	-	0,83-0,98	0,9-1	0,71±0,12
Relação entre ventosas	-	-	-	1:1	0,96±0,09 (1:1)
Diâmetro da faringe	-	-	-	0,2-0,3	0,2±0,04
Comprimento da bolsa do cirro	-	0,9-1,4	-	1,4-1,7	1,08±0,27
Diâmetro dos testículos	-	-	-	1-1,3	0,49±0,14
Diâmetro do ovário	-	-	-	0,5	0,28±0,09
Comprimento do ovo	-	0,044-0,049	0,046	0,042-0,050	0,042±0,003
Largura do ovo	-	0,023-0,030	0,027	0,023-0,030	0,028±0,001
Distância entre ventosas	-	1,3-2,4	2,5-2,97	2,5-2,8	2,13±0,45

Legenda: Valores de média, mínimo–máximo e média com desvio padrão (Presente estudo). O valor do diâmetro equivale a maior medida dos órgãos circulares.

A partir das médias das variáveis características analisadas em todas as amostras, montamos gráficos para comparar e avaliar as diferenças entre os espécimes obtidos neste estudo (Gráficos 1-12).

Segundo a análise estatística de variância (ANOVA) os valores médios do comprimento do corpo (CC), da largura do corpo (LC), das distâncias entre região anterior do corpo e ventosa ventral (A-VV), distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo (VV-P) e distância entre ceco e região posterior do corpo (Ce-P) apresentaram diferença significativa entre os espécimes das três procedências. Apesar dos espécimes apresentarem diferenças significativas em relação às medidas das suas estruturas taxonômicas específicas, observamos que a relação entre as estruturas, no mesmo espécime se manteve conservada quando foi comparada entre os espécimes das diferentes localidades, acompanhando o tamanho do comprimento do corpo dos helmintos. Em todos os espécimes a largura do corpo mede aproximadamente a metade do comprimento do corpo, a distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral equivaleu a 1/3 do comprimento do corpo, a distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo apresentou aproximadamente a metade do valor do comprimento do corpo e distância entre ceco e região posterior do corpo menor que 1/3 do tamanho do corpo do helminto (Gráfico 1).

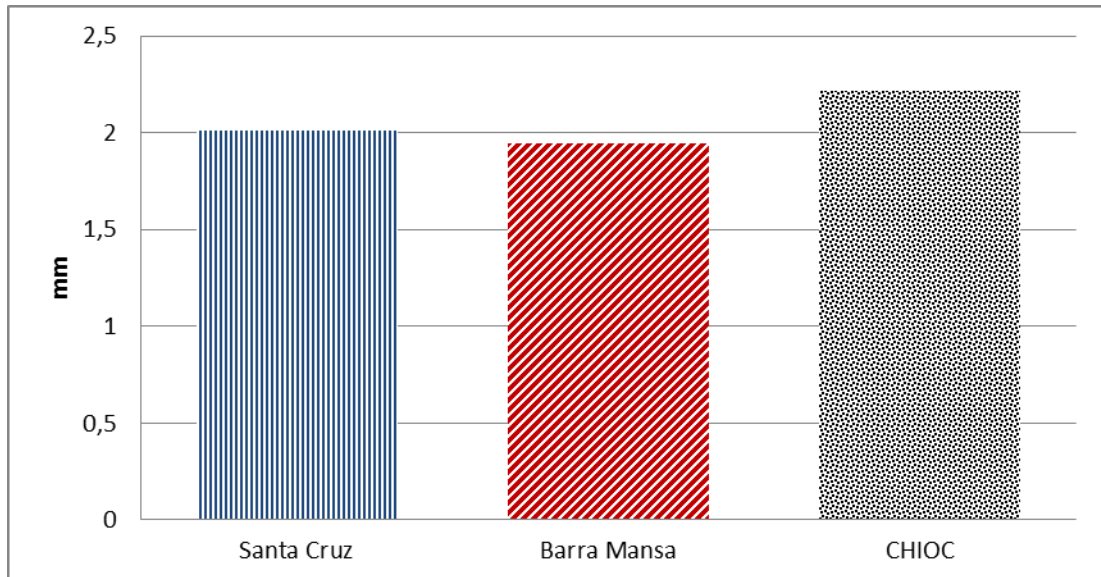
Gráfico 1 - Comparação das medidas do corpo de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: CC- comprimento do corpo, LC- largura do corpo, A-VV- distância entre região anterior do corpo e ventosa ventral, VV-P- distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo, Ce-P- distância entre ceco e região posterior do corpo. Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

A relação do comprimento do corpo pela largura do corpo dos espécimes das diferentes localidades não apresentou diferença significativa no teste ANOVA (Gráfico 2).

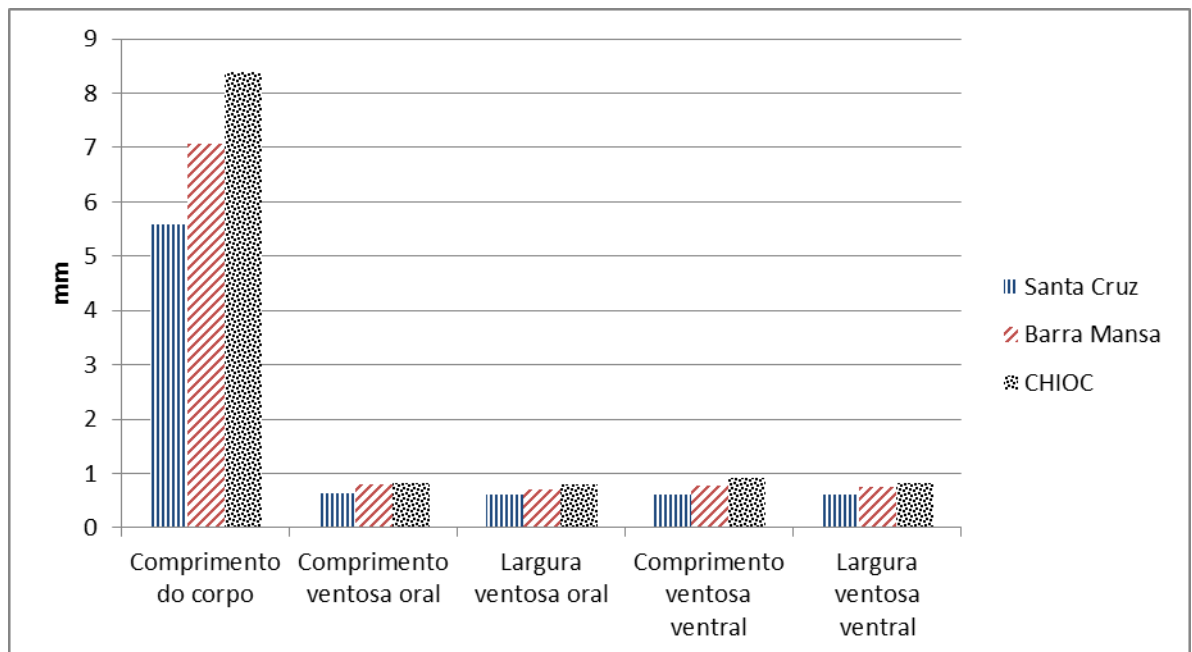
Gráfico 2 – Comparação da relação: comprimento do corpo / largura do corpo de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

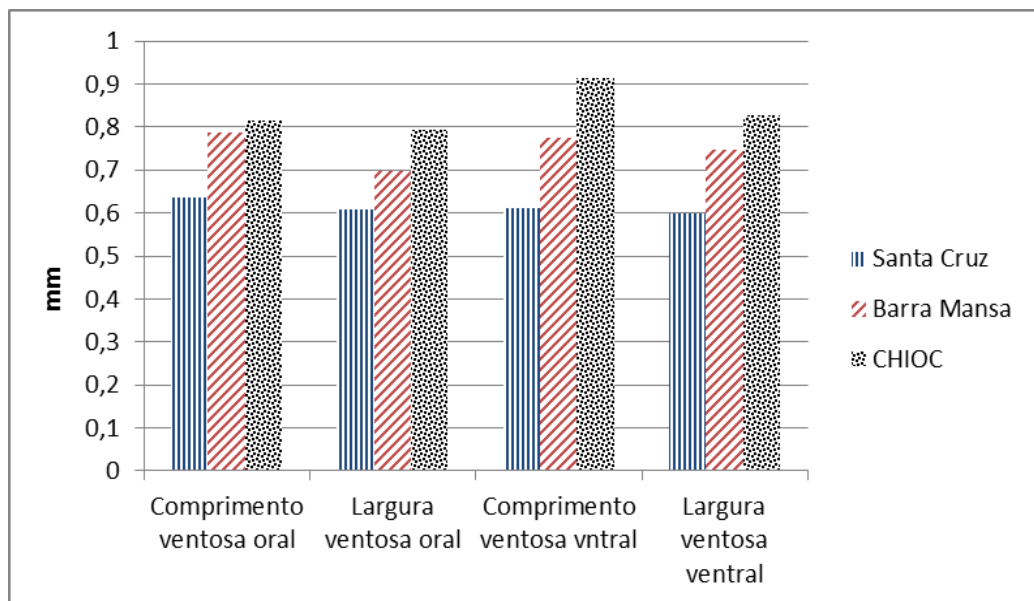
Já os dados referentes ao comprimento e a largura das ventosas oral e ventral apresentaram diferença significativa no teste de análise de variância. Contudo, o tamanho dessas estruturas pareceu estar relacionado ao tamanho do corpo do helminto. Quanto maior o tamanho do corpo maior a medida das ventosas, mesmo assim as médias das medidas das ventosas não ultrapassaram 1 mm, e as ventosas oral e ventral se mostraram subiguais tanto no comprimento quanto na largura (Gráficos 3 e 4).

Gráfico 3 – Comparação do comprimento do corpo com as medidas das ventosas oral e ventral de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

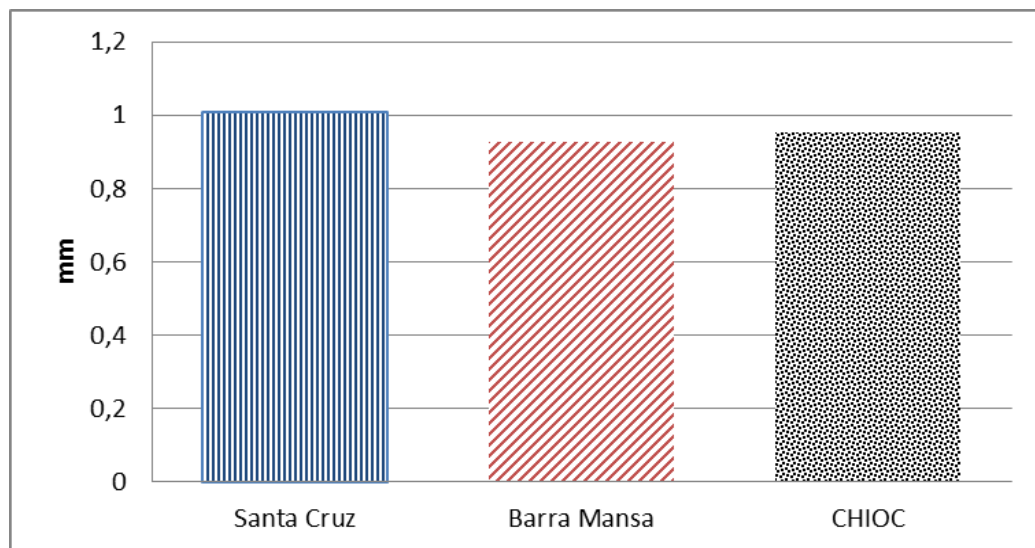
Gráfico 4 - Comparação do comprimento e da largura das ventosas oral e ventral de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Médias do comprimento e largura das ventosas oral e ventral de espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

A relação da largura da ventosa oral pela largura da ventosa ventral não apresentou diferença significativa, o que indica que as ventosas são subiguais e este pode ser um dos padrões característicos desta espécie (Gráfico 5).

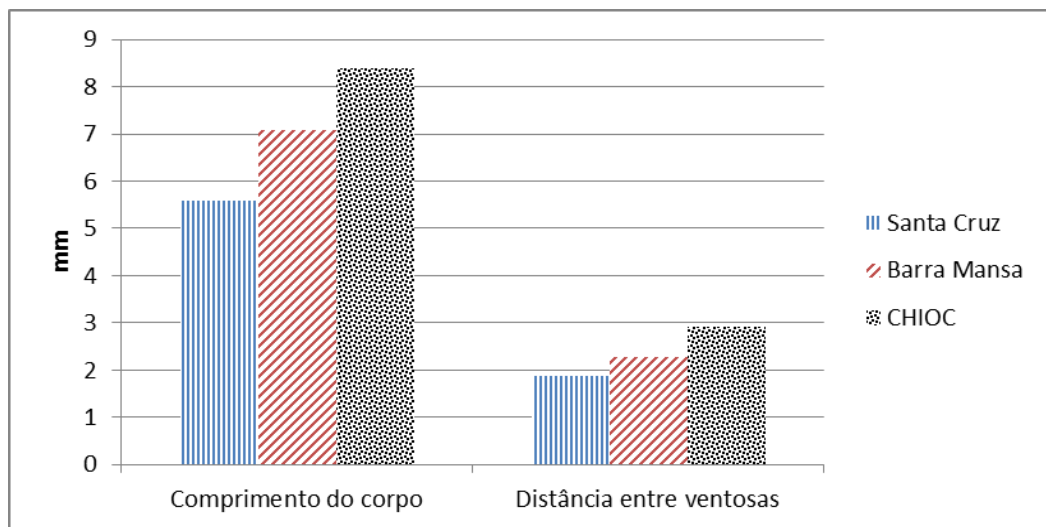
Gráfico 5 – Comparação da relação: largura da ventosa oral/ largura da ventosa ventral de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Relação entre largura da ventosa oral e largura da ventosa ventral entre espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e no Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

A distância entre ventosa oral e ventral apresentou diferença significativa quando comparamos os espécimes das diferentes procedências. Mas, em todos os espécimes o valor da distância entre ventosas foi equivalente a 1/3 do comprimento do corpo do parasito (Gráfico 6).

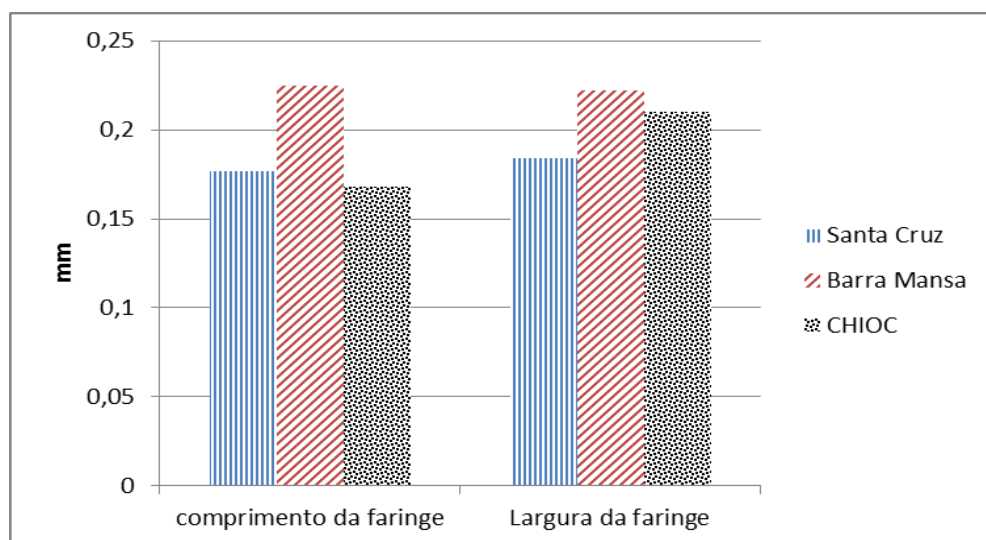
Gráfico 6 – Comparação do comprimento do corpo e da distância entre ventosas de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

O comprimento e a largura da faringe também apresentaram diferença significativa no teste ANOVA. Apesar desta diferença significativa, observamos que as medidas desta estrutura nos espécimes de cada procedência acompanham o comprimento do corpo dos helmintos (Gráfico 7).

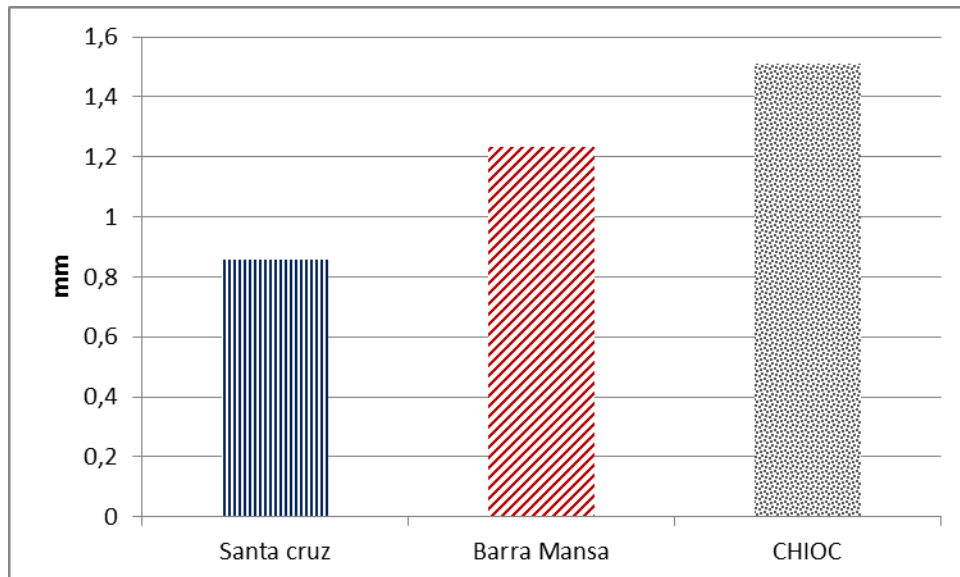
Gráfico 7 – Comparação do comprimento e da largura da faringe de *Eurytrema coelomaticum*.



Legenda: Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

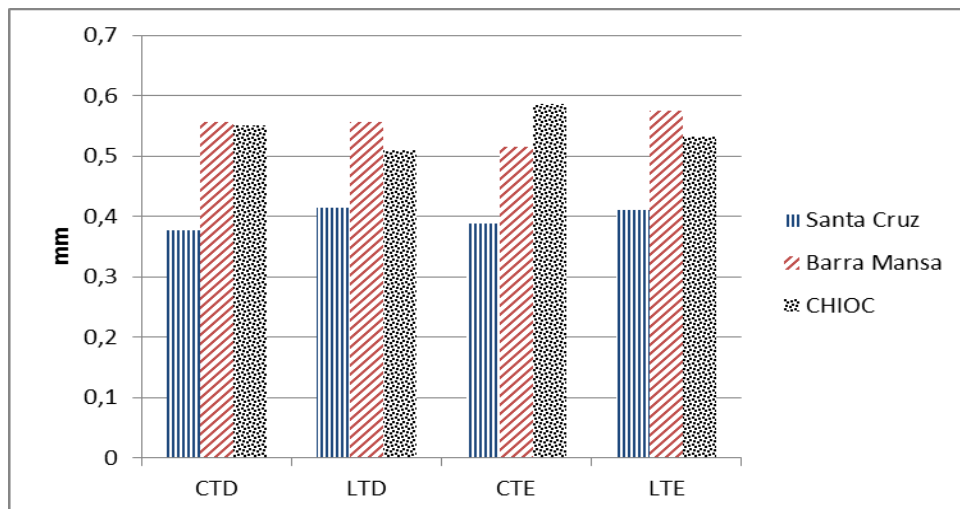
A bolsa do cirro, os testículos, o ovário e as glândulas vitelínicas apresentaram diferença significativa no teste de análise estatística de variância. No entanto foi observado que todas as medidas são proporcionais ao tamanho do helminto (Gráficos 8, 9, 10 e 11).

Gráfico 8 – Comparação do comprimento da bolsa do cirro de *Eurytrema coelomaticum*

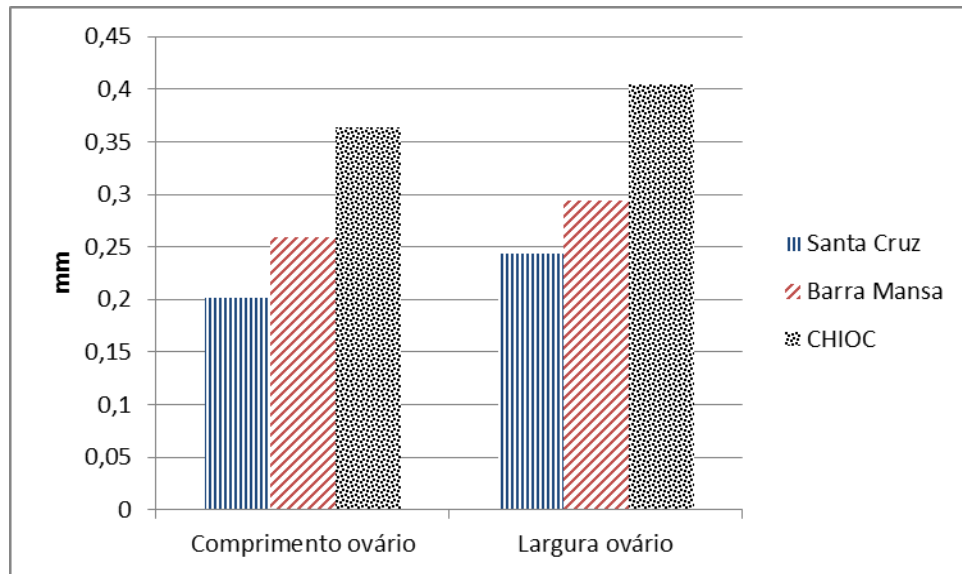


Legenda: Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e no Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

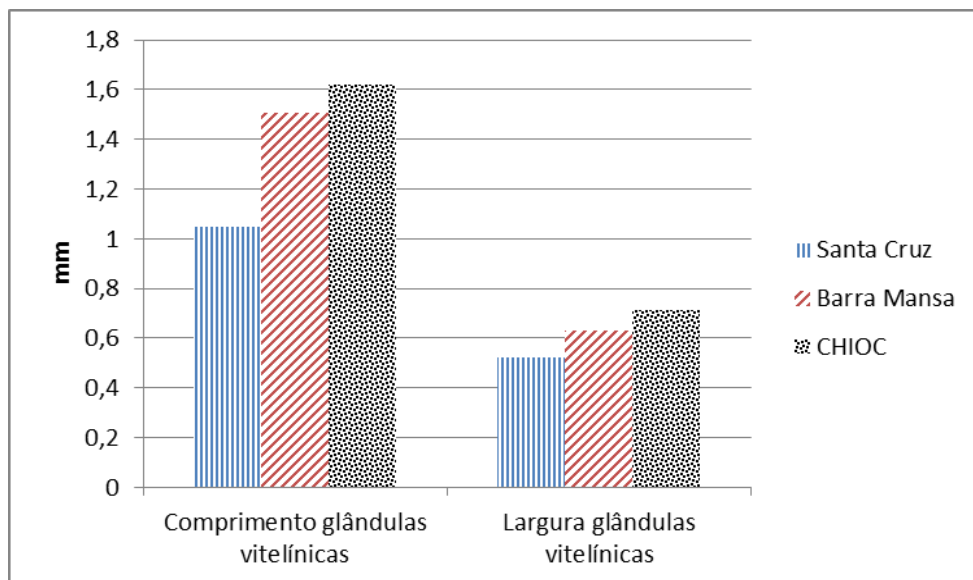
Gráfico 9 – Comparação do comprimento e largura dos testículos de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: CTD- Comprimento do testículo direito; LTD – Largura do testículo direito; CTE – Comprimento do testículo esquerdo; LTE – Largura do testículo esquerdo. Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e no Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

Gráfico 10 – Comparação do comprimento e da largura do ovário de *Eurytrema coelomaticum*

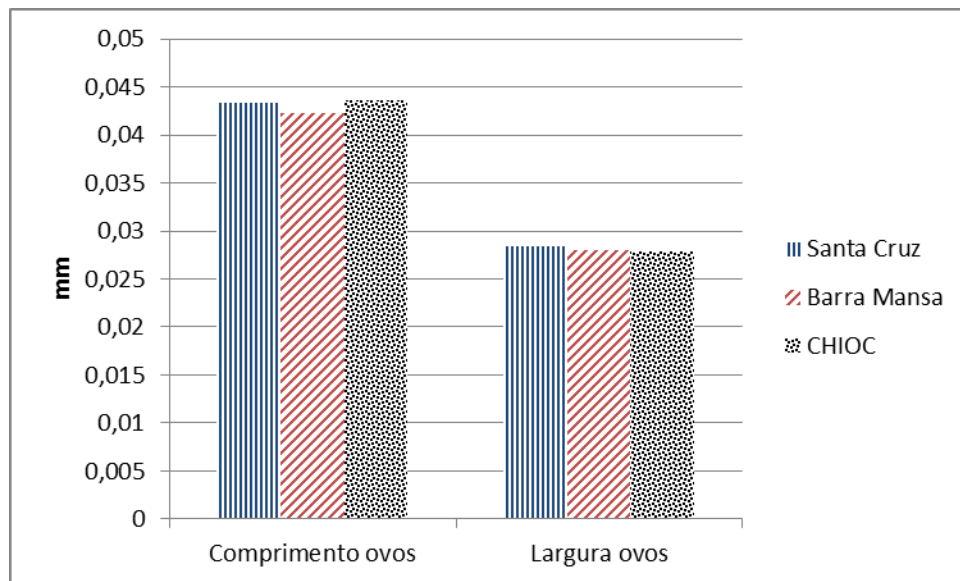
Legenda: Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e no município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

Gráfico 11 - Comparação do comprimento das glândulas vitelínicas de *Eurytrema Coelomaticum*

Legenda: Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

Já o comprimento e a largura dos ovos uterinos não apresentaram diferença significativa no teste ANOVA, apresentando o mesmo comprimento e a mesma largura em todos os espécimes analisados independente de sua procedência ou do tamanho do seu corpo (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Comparação do comprimento e da largura dos ovos uterinos de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: Espécimes de *Eurytrema coelomaticum* adultos provenientes de bovinos abatidos no Bairro de Santa Cruz e Município de Barra Mansa, RJ e depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

10.2 Morfologia

10.2.1 Análise morfológica por microscopia de campo claro

O corpo é achatado dorsoventralmente com formato ovoide a piriforme, lembrando uma folha. A margem é ondulada e a superfície do tegumento apresenta pequenas estruturas cúbicas, sem a presença de papilas ou espinhos (Figuras 5 e 6). A ventosa oral é subterminal de tamanho subigual ao da ventosa ventral ou acetábulo que se localiza na região pré-equatorial no terço médio do corpo. A faringe é pequena e se situa logo abaixo da ventosa oral, não existindo pré-faringe, seu formato é redondo a alongado. O esôfago é curto e bifurcado e de difícil visualização ao microscópio de campo claro. Deste prosseguem os cecos que são delgados e sinuosos e se estendem até a porção posterior, onde ocorre afilamento do corpo do helminto. O sistema reprodutor masculino é formado por dois testículos globosos e arredondados com diâmetros subiguais localizados após a ventosa ventral na região mediana do corpo em campos afastados; a bolsa do cirro está localizada abaixo da bifurcação do esôfago e acima da ventosa ventral, podendo por vezes estar muito próxima a ventosa ventral e sobrepondo-a, é volumosa de formato claviforme, abriga o cirro muscular, glândula prostática, ducto ejaculatório e vesícula seminal, sempre com sua porção final voltada para o mesmo lado em que se encontra o ovário. Raras vezes o cirro se mostrou extrovertido, e não apresentou estruturas como espinhos. O sistema reprodutor feminino é constituído por um único ovário pequeno que está ligeiramente abaixo dos testículos, mais próximo a um deles, é menor do que os testículos, também com forma esférica; glândulas de Mehlis e oótipo submedianos, localizados entre ovário e reservatório vitelínico, pouco visível na microscopia de campo claro; ducto vitelínico estreito abaixo do reservatório vitelínico e ligando-o as glândulas vitelínicas; canal de Laurer presente, porém não visível nesta microscopia, tendo sido observado na microscopia de varredura a laser confocal; glândulas vitelínicas laterais, tendo início abaixo dos testículos, por vezes sobrepondo os cecos e terminando antes do fim dos cecos, constituída por folículos reunidos em grupos que lembram cachos de uvas; o útero é longo, ocupa grande parte do interior do corpo do helminto, é intracecal se estendendo desde a região posterior a ventosa ventral até próximo à região da vesícula excretora, porém algumas alças dão a volta por cima da ventosa ventral por um único lado, sendo este inverso ao lado no qual a parte posterior da bolsa do cirro termina. O poro excretor é terminal, a

vesícula excretora é simples e apresenta ramificações que contornam praticamente toda a lateral do corpo do helminto. Os ovos são elipsoides de cor castanha e casca espessa.

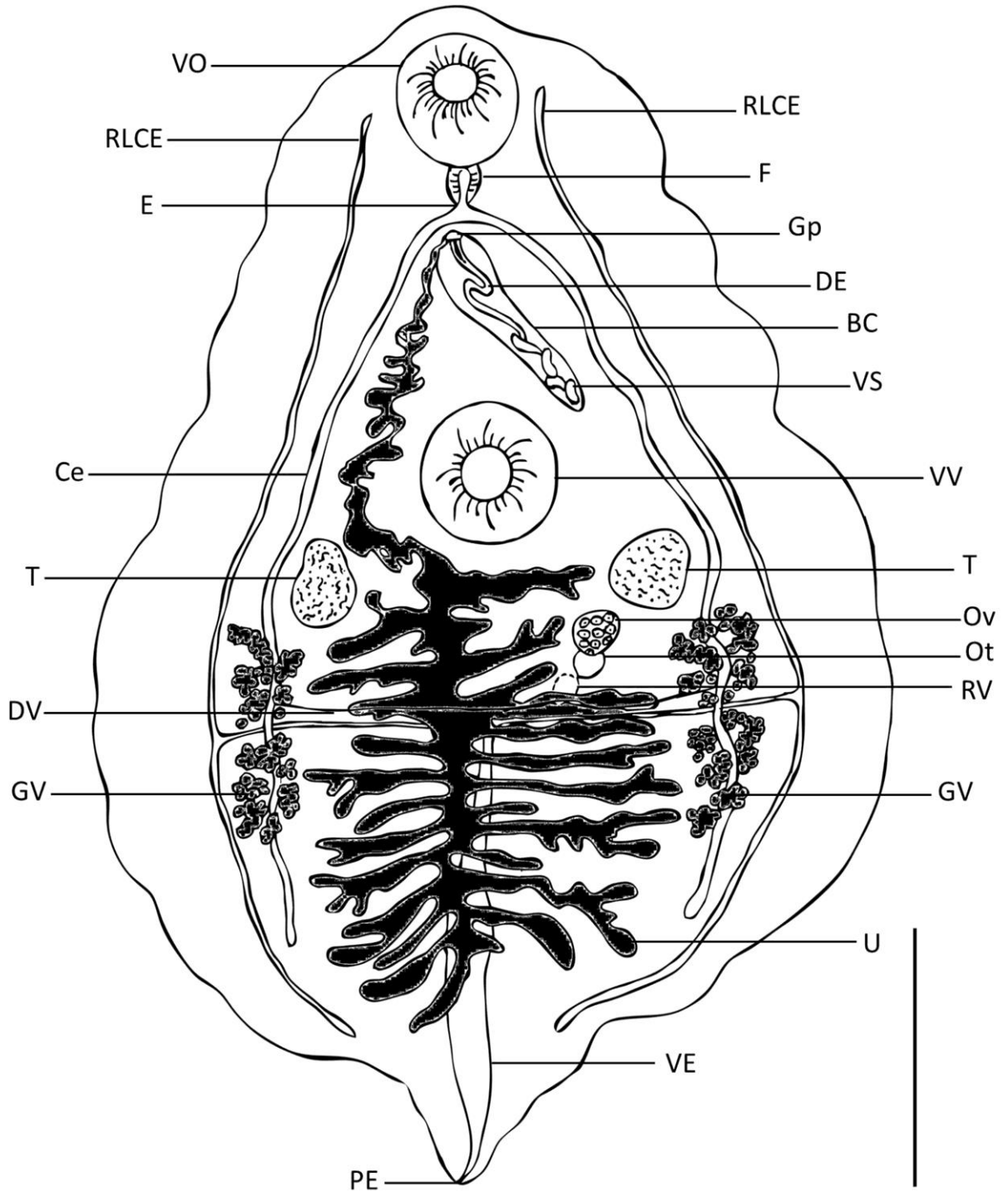
As características morfológicas foram iguais em todos os espécimes analisados.

Figura 5 – Imagens de *Eurytrema coelomaticum* por microscopia de campo claro



Legenda: A e B espécimes provenientes de Santa Cruz; C e D espécimes provenientes de Barra Mansa. A- ventosa oral (VO), faringe (F), bolsa do cirro (BC) e ventosa ventral (VV); B- testículos (T), glândulas vitelínicas (GV), oótipo (Ot), ovário (O), reservatório vitelínico (RV), ducto vitelínico (DV); C- cristais de proteínas (CP) reentrâncias do corpo (RC); D- útero (U), ceco (Ce), ramos laterais do canal excretor (RLCE) e poro excretor (PE) - escala 500 µm.

Figura 6 – Aspecto ventral de *Eurytrema coelomaticum* por microscopia de campo claro



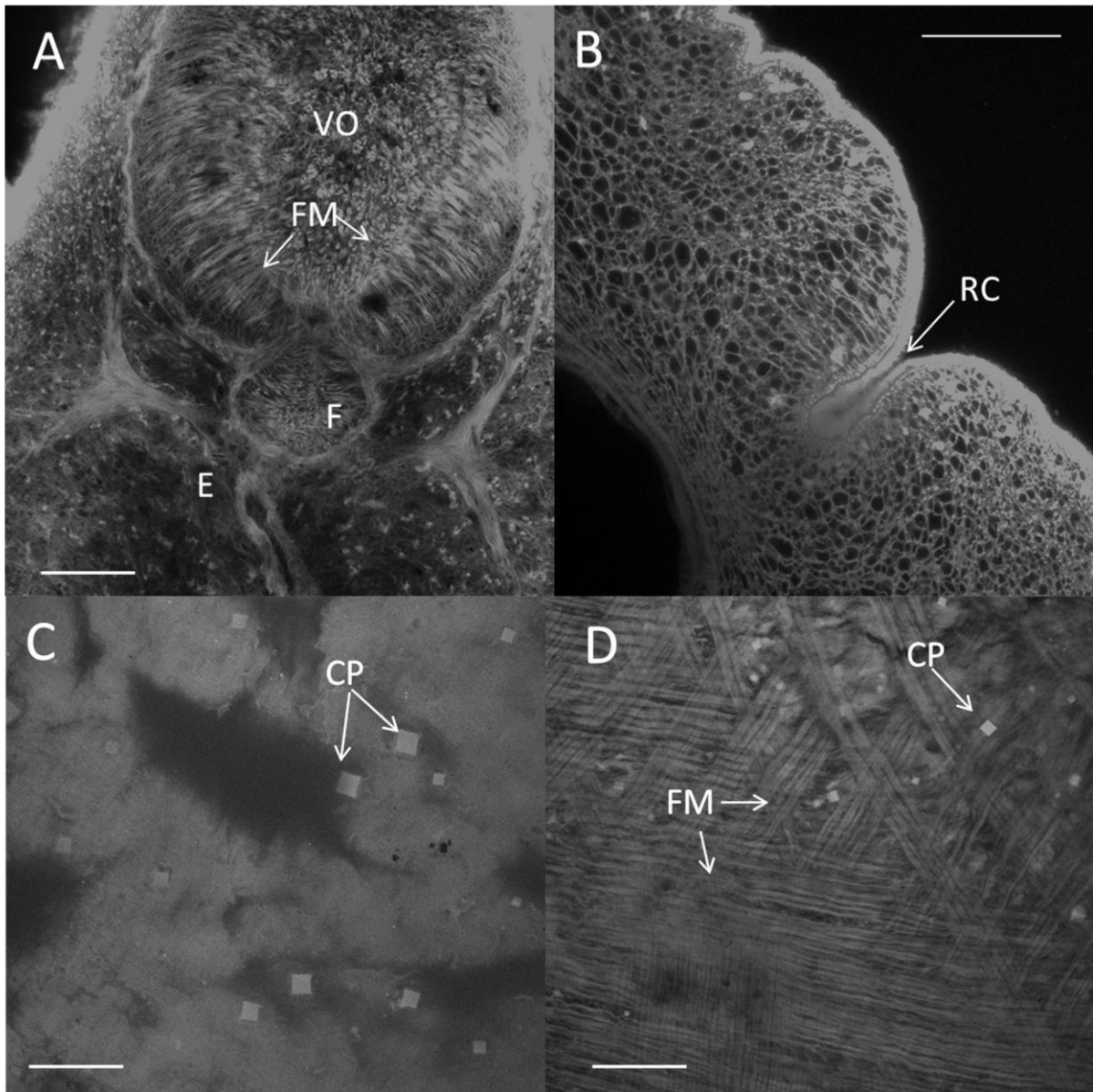
Legenda: VO - ventosa oral, RLCE - ramos laterais do canal excretor, F - faringe, E - esôfago, Gp - gonoporo, DE - ducto ejaculatório, BC - bolsa do cirro, VS - vesícula seminal, VV - ventosa ventral, T - testículos, Ov - ovário, Ot - oótipo, RV - reservatório vitelínico, DV - ductos vitelínicos, GV - glândulas vitelínicas, Ce - ceco, U - útero, VE - vesícula excretora e PE - poro excretor - escala 1mm.

10.2.2 Análise morfológica por microscopia de varredura a laser confocal

Pode-se observar que o corpo do parasito apresenta uma espessa camada de fibras musculares densas, distribuídas em feixes longitudinais e transversais que se intercalam formando uma rede muscular que fica menos densa no interior do corpo do helminto dando lugar ao parênquima que é constituído por grandes células, também na região mais superficial do tegumento se projetam cristais cúbicos de proteínas. É comum o corpo formar “pregas” na região lateral, aqui denominadas reentrâncias do tegumento. Tanto a ventosa oral quanto a ventosa ventral apresentam musculatura muito densa formada principalmente por fibras radiais, ocorrendo também fibras circulares e obliquas. A faringe é menos espessa que as ventosas, porém também apresenta fibras musculares dispostas radialmente. O esôfago é um tubo delgado, curto e bifurcado com paredes fortes e apresenta células glandulares no seu entorno, dele partem os dois cecos que também são delgados e pouco sinuosos (Figura 7). Com relação aos órgãos que formam o aparelho reprodutor masculino pode-se observar a distribuição interna das estruturas que são envoltas pela membrana fibrosa denominada bolsa do cirro. Na porção anterior da bolsa aparece o gonoporo que também é fibroso e é o local por onde o cirro se projeta para o meio exterior, ele é seguido pelo ducto ejaculatório que apresenta diversas voltas e é rodeado por células nucleadas secretoras e pela glândula prostática que apresenta células alongadas. A vesícula seminal é a última porção da bolsa do cirro é vesiculosa e enovelada, armazenando diversos espermatozoides e está situada abaixo do ducto ejaculatório (Figuras 8 e 10). Os testículos são formados por folículos glandulares e espermatozoides (Figura 8 D). No sistema reprodutor feminino o ovário apresenta uma membrana basal que envolve os oócitos. Conectado ao ovário por um ducto estreito denominado oviduto se encontra o oótipo, local onde ocorre a fecundação, com formato alongado e rodeado pelas células da glândula de Mehlis. Logo abaixo se encontra o reservatório vitelínico, que se ligam as glândulas vitelínicas pelo ducto vitelínico. Também conectado ao ovário se encontra o canal de Laurer, curto, sinuoso e fibroso. (Figuras 9 e 11). O útero continha inúmeros ovos, que em sua maioria apresentavam-se embrionados (Figura 9 C).

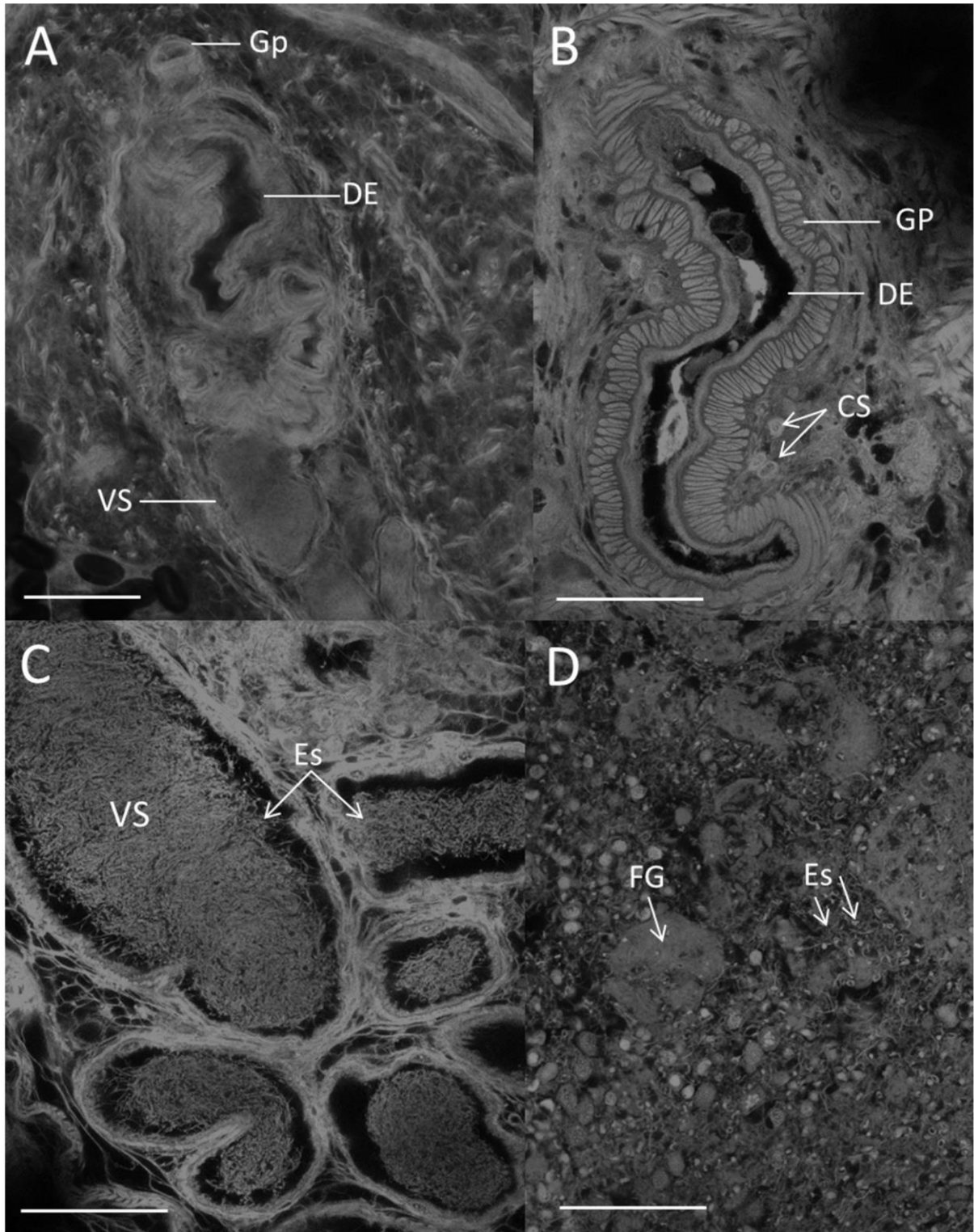
As características morfológicas foram iguais em todos os espécimes analisados.

Figura 7 – Imagens da região anterior e ventral de *Eurytrema coelomaticum* obtidas por microscopia de varredura a laser confocal



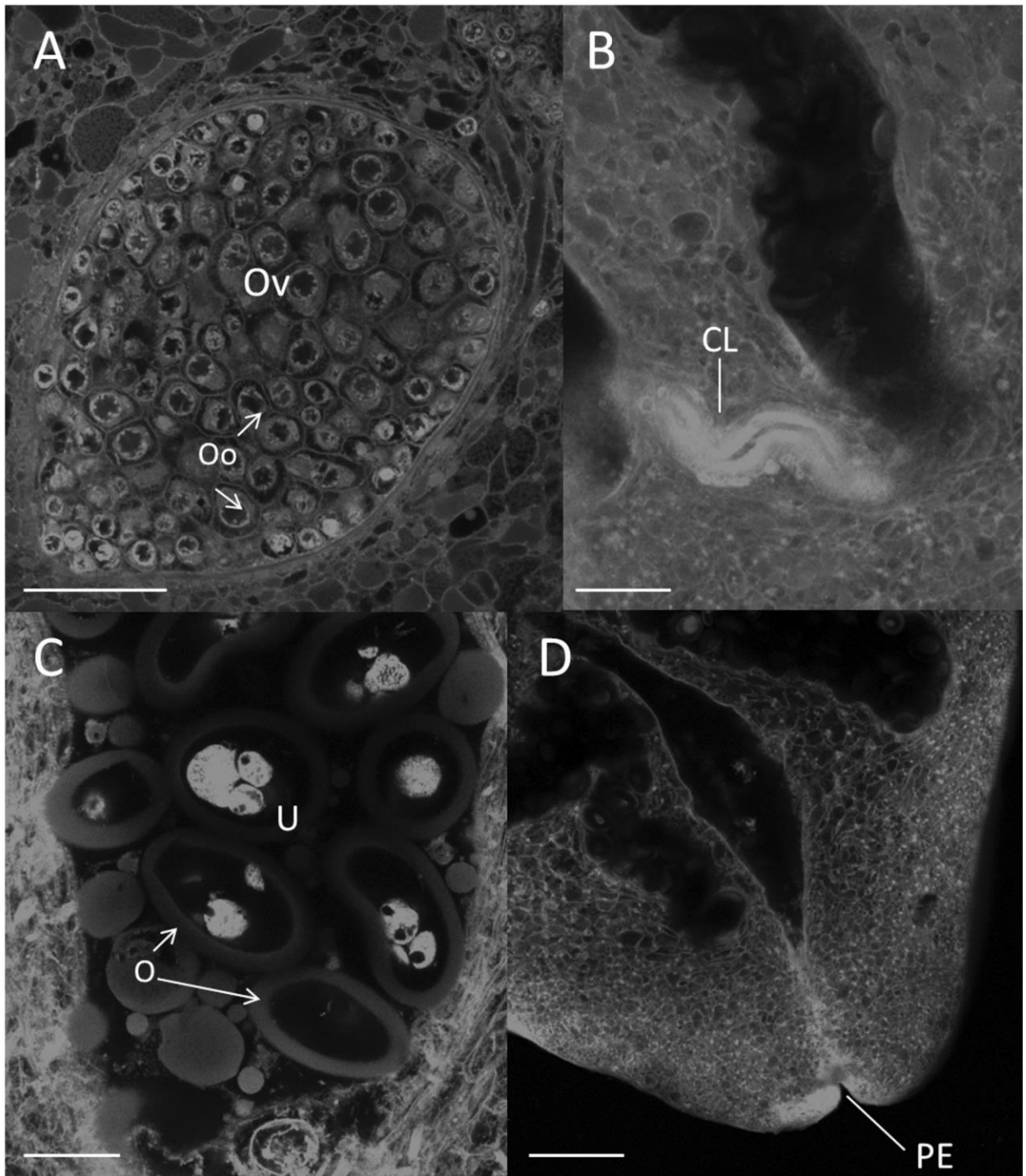
Legenda: A - Ventosa oral (VO) com feixes musculares (FM), faringe (F) e esôfago (E) - escala 100 μ m; B - reentrâncias do corpo (RC) – escala 50 μ m; C –inclusões cúbicas de cristais de proteínas na superfície da corpo (CP) - escala 50 μ m; D- corpo com feixes musculares (FM) e cristais de proteínas (CP) – escala 50 μ m.

Figura 8 – Imagens do sistema reprodutor masculino de *Eurytrema coelomaticum* obtidas por microscopia de varredura a laser confocal



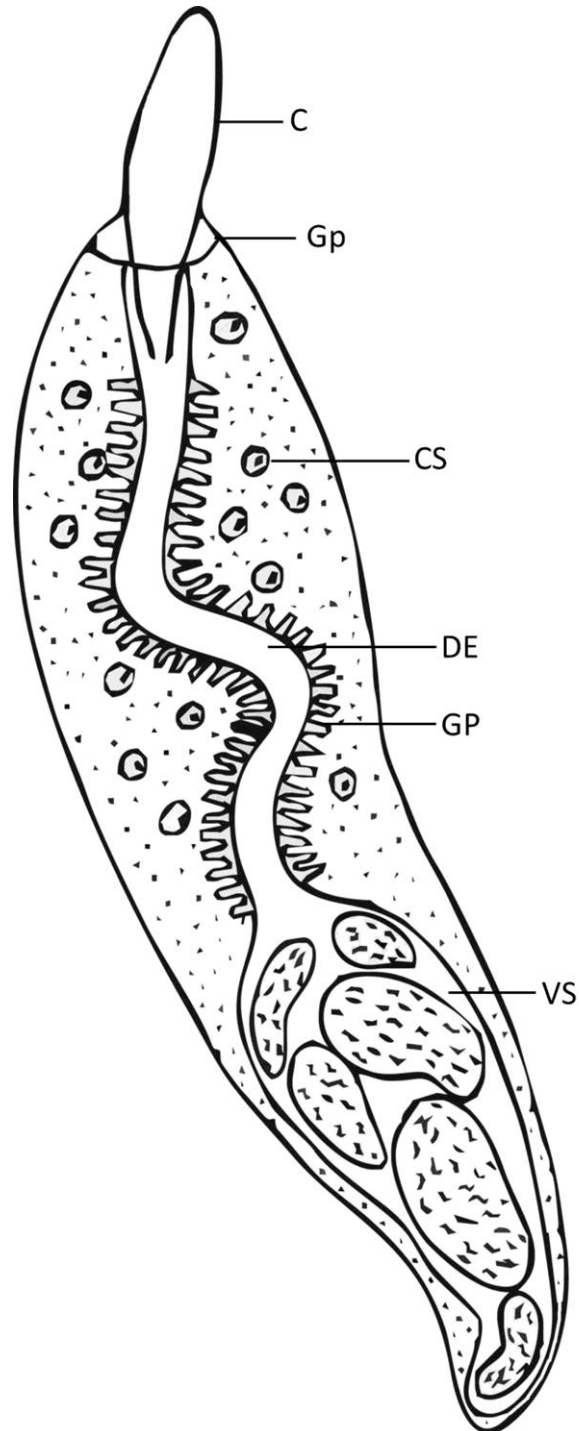
Legenda: A - bolsa do cirro com gonoporo (Gp), ducto ejaculatório (DE) e vesícula seminal (VS) - escala 100 μ m; B- interior da bolsa do cirro mostrando glândula prostática (GP), ducto ejaculatório (DE) e células secretoras (CS) - escala 50 μ m; C - interior da bolsa do cirro mostrando vesícula seminal (VS) enovelada com espermatozoides (Es) - escala 50 μ m; D - Testículo com espermatozoides (Es) e folículos glandulares (FG) -escala 50 μ m.

Figura 9 – Imagens do sistema reprodutor feminino e poro excretor de *Eurytrema coelomaticum* obtidas por microscopia de varredura a laser confocal



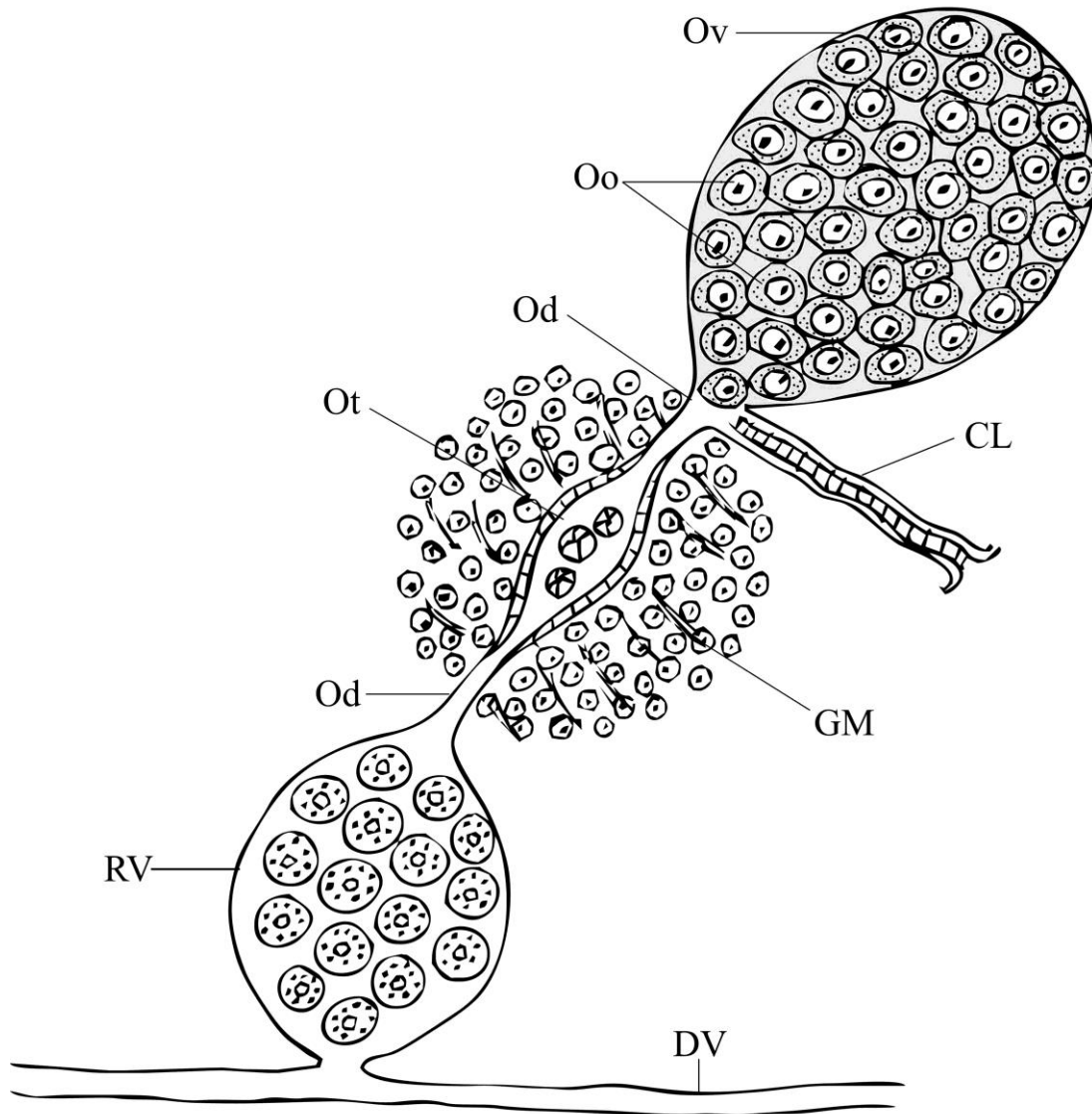
Legenda: A - Ovário (Ov) com oócitos (Oo) – escala 50 μm ; B- canal de Laurer (CL)- escala 50 μm ; C - útero (U) com ovos (O) – escala 20 μm ; D – poro excretor (PE) – escala 100 μm .

Figura 10 - Desenho esquemático das estruturas que compõem a bolsa do cirro com base nas imagens obtidas por microscopia de campo claro, varredura a laser confocal e eletrônica de varredura



Legenda: cirro (C), gonoporo (Gp), células secretoras (CS), ducto ejaculatório (DE), glândula prostática (GP) e vesícula seminal (VS).

Figura 11 – Desenho esquemático do sistema reprodutor feminino com base nas imagens obtidas por microscopias de campo claro e varredura a laser confocal

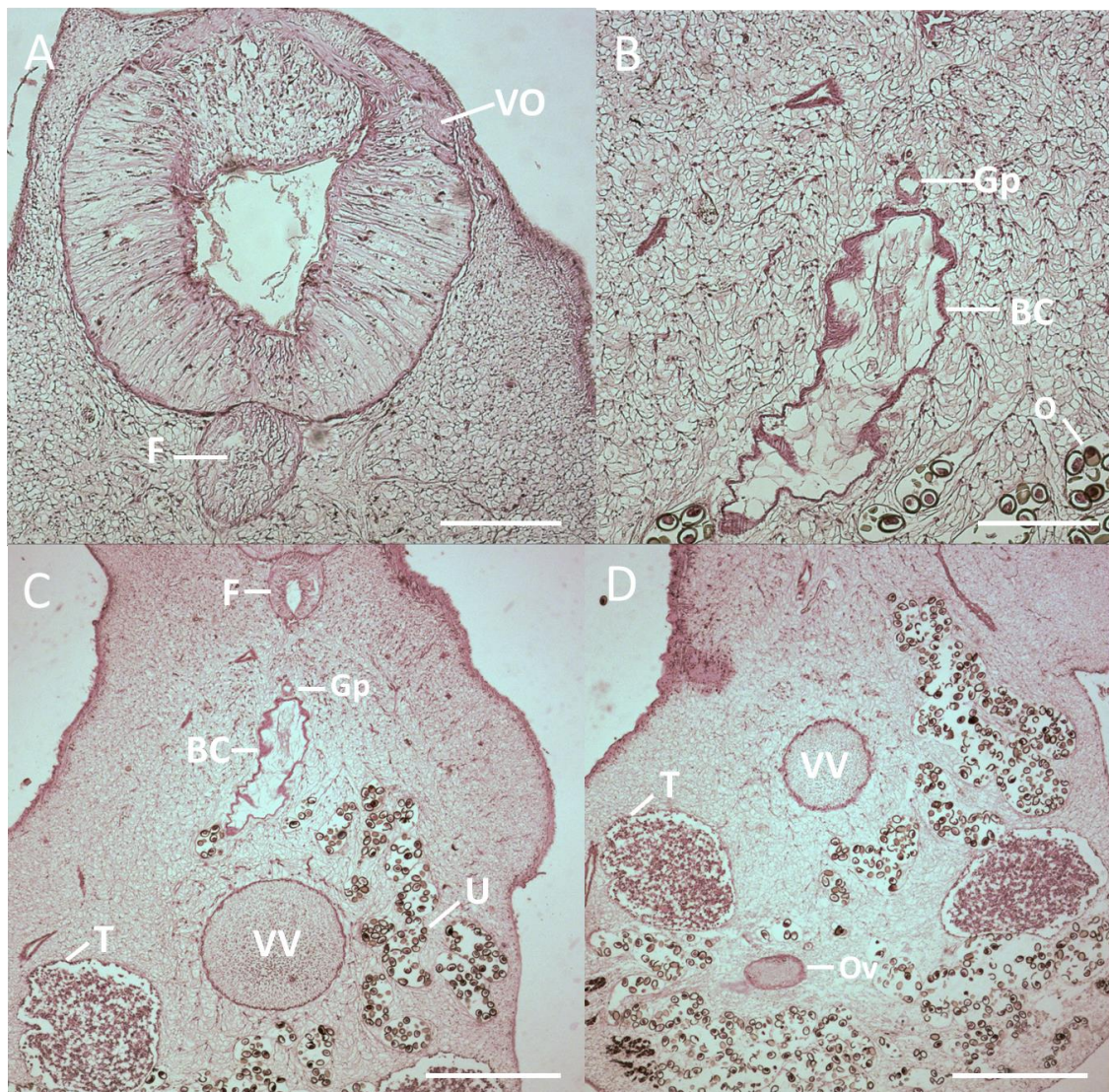


Legenda: Ovário (Ov), oócitos (Oo), oviduto (Od), canal de Laurer (CL), oótipo (Ot), glândulas de Mehlis (GM), reservatório vitelínico (RV) e ducto vitelínico (DV).

10.2.3 Análise histológica por microscopia de campo claro

Como uma forma alternativa para adquirir mais informações sobre a morfologia de *Eurytrema coelomaticum* foram realizados cortes histológicos do helminto. Desses cortes foram obtidas imagens que mostram a musculatura das ventosas e faringe, o contorno da bolsa do cirro, os testículos arredondados com grande quantidade de espermatozoides em seu interior, e o ovário preenchido pelos oócitos (Figura 12).

Figura 12 - Imagens de cortes histológicos de *Eurytrema coelomaticum* obtidas por microscopia de campo claro

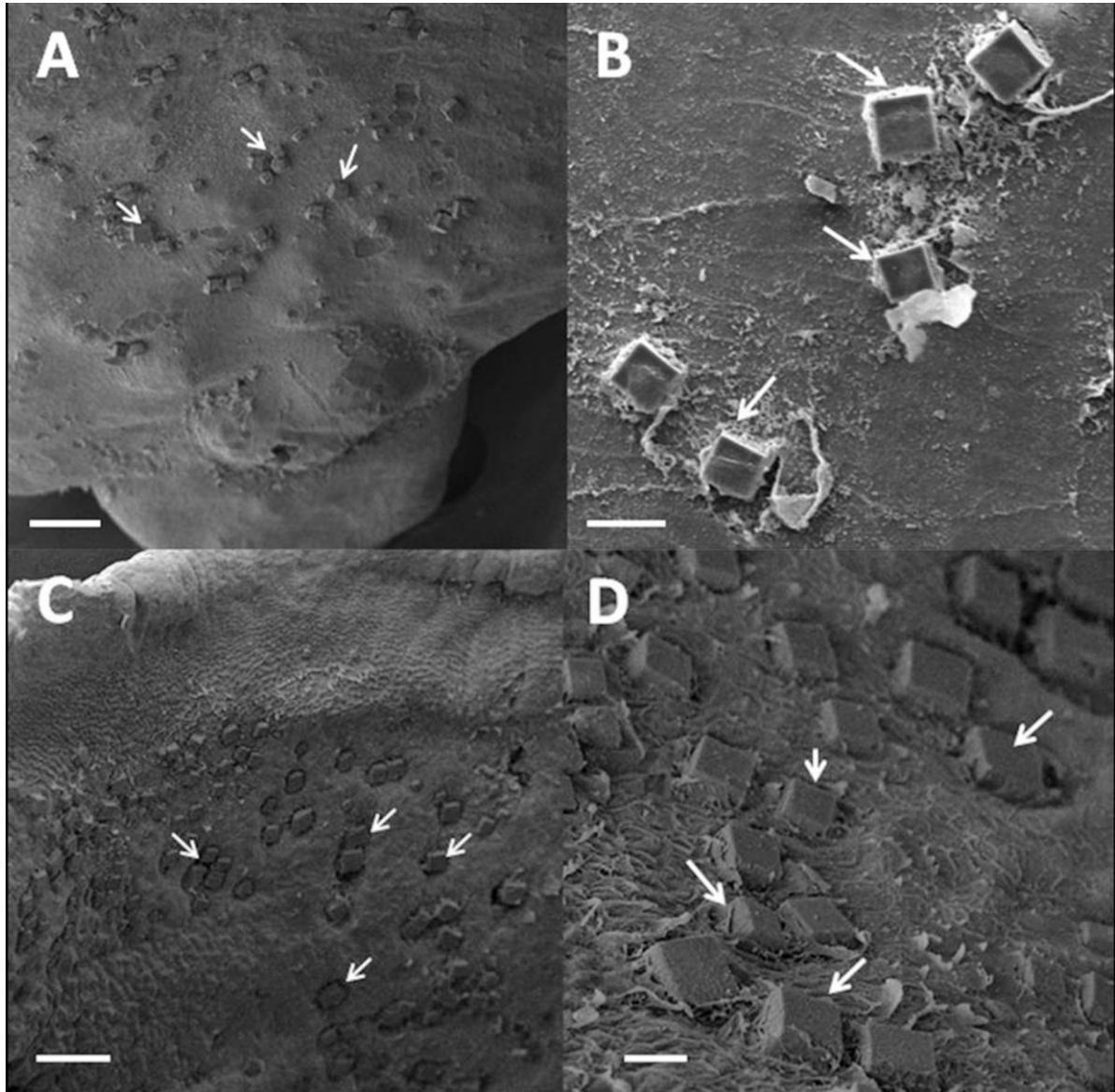


Legenda: A- ventosa oral (VO), podendo perceber a presença dos feixes musculares e faringe (F) – escala 200 μm ; B – contorno do gonoporo (Gp), bolsa do cirro (BC) e ovos (O) no interior do útero – escala 200 μm ; C – faringe (F), ventosa ventral (VV), testículo (T) – escala 500 μm ; D – Ovário (Ov) – escala 500 μm .

10.2.4 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura

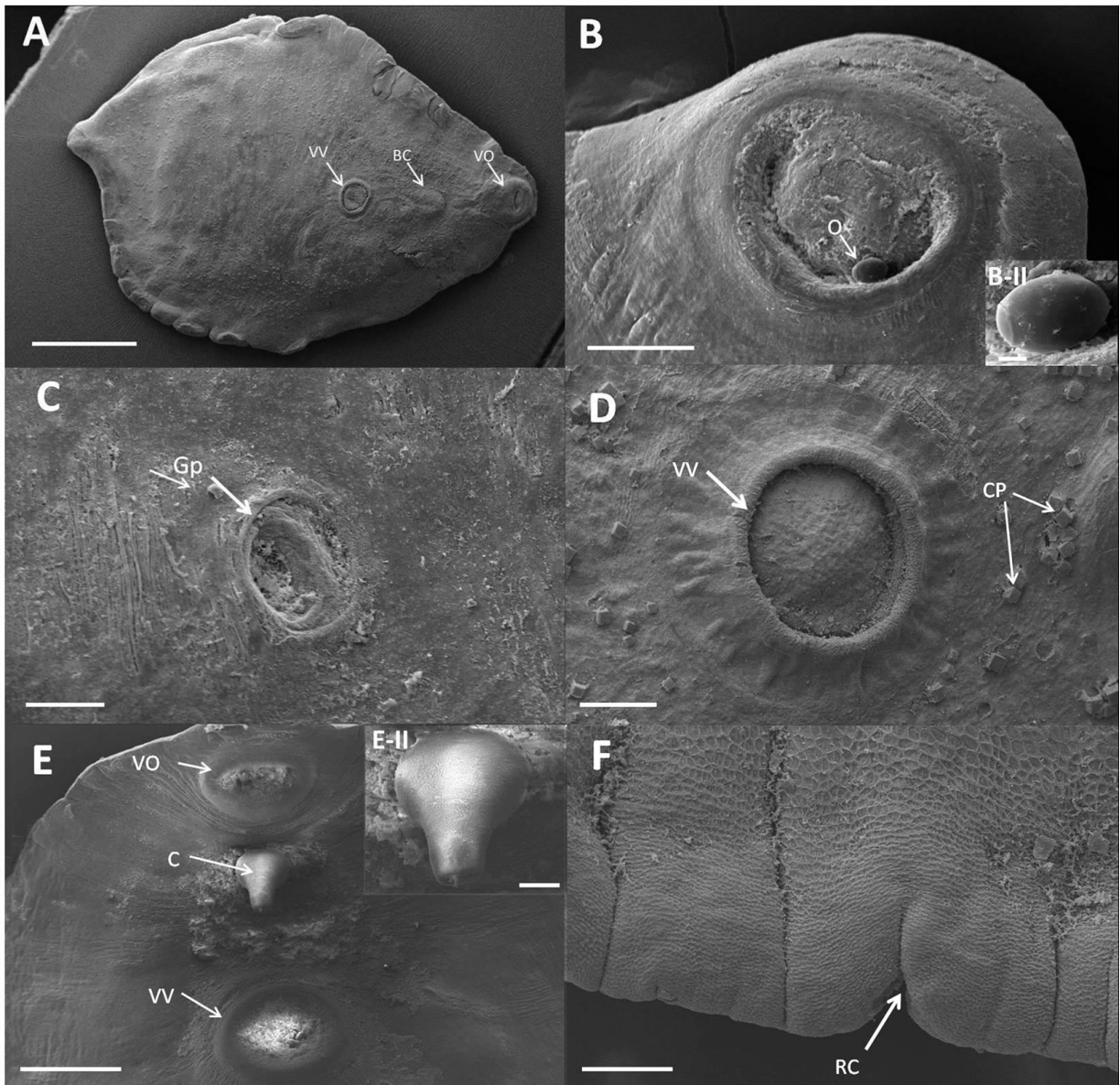
O corpo do helminto apresenta o formato de folha, achatado dorsoventralmente. Não observamos a presença de papilas ou espinhos, porém identificamos inclusões cúbicas de cristais de proteínas distribuídas ao longo do tegumento, estando ausentes nas ventosas. Os espécimes de Santa Cruz apresentam maior concentração de cristais de proteínas quando comparados com os provenientes de Barra Mansa (Figura 13). A margem do corpo apresenta várias reentrâncias e as ventosas apresentam a superfície tegumentar lisa, desprovida de espinhos. Foi possível identificar o poro genital se abrindo na região entre as ventosas e também observamos o cirro extrovertido em algumas amostras, esta estrutura apresenta a superfície lisa e faz uma leve curvatura (em forma de gancho) em direção à extremidade posterior. Na superfície do tegumento também identificamos a presença de ovos, destacamos um aderido na região da ventosa oral (Figura 14 B) e em detalhe foi possível identificar o opérculo em um dos polos do ovo (Figura 14 B, detalhe).

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície do tegumento de espécimes adultos de *Eurytrema coelomaticum* mostrando as inclusões cúbicas de cristais de proteína



Legenda: A- Face ventral, região posterior do corpo, com inúmeras inclusões cúbicas de cristais de proteínas (setas) – escala 100 μm ; B – Detalhe dos cristais (seta) na região posterior do corpo – escala 20 μm ; C - Face dorsal da região anterior do corpo mostrando inúmeros cristais de proteína (seta) – escala 100 μm ; D - Detalhe dos cristais (seta) na face dorsal do parasito - escala 20 μm .

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura da face ventral de *Eurytrema coelomaticum*



Legenda: A- Visão geral mostrando o formato do corpo, a localização das ventosas oral (VO) e ventral (VV) e bolsa do cirro (BC) - escala 1mm; B - ventosa oral e um ovo aderido (O) – escala 100 μ m, B-II - detalhe do ovo mostrando o tubérculo 5 μ m; C- abertura do poro genital, gonoporo (Gp) - escala 50 μ m; D- ventosa ventral (VV) e cristais de proteínas (CP) – escala 100 μ m; E- ventosas (VO) e (VV) e o cirro extrovertido (C) - escala 250 μ m, E-II – detalhe do cirro - 20 μ m F- margem do corpo, mostrando as reentrâncias do tegumento na lateral do corpo (RC) - escala 50 μ m .

11 DISCUSSÃO

A morfometria de *Eurytrema coelomaticum* já foi caracterizada por Giard & Billet (1892), Railliet & Marotel (1898), Looss & Cuffey (1907) e Travassos (1944). Comparando nossos resultados com os apresentados por estes autores, percebemos poucas diferenças, porém os espécimes tanto do presente estudo quanto da literatura mostram que existe uma variação frequente no tamanho de algumas estruturas. Um dos exemplos é em relação ao tamanho do corpo que apresenta um comprimento mínimo de 3,85 mm e máximo de 12,58mm. As medidas apresentadas em nossos resultados são contempladas nesta amplitude. Na descrição da espécie, Giard & Billet (1892) relataram o tamanho médio de 15 mm, maior que a média apresentada em nossos resultados. Esta variação na dimensão pode estar relacionada a fatores ambientais, como: distribuição geográfica, número de parasitos por hospedeiro, característica nutricional do hospedeiro e idade variada dos helmintos (POULIN et al., 2003). A largura do corpo seguiu o mesmo padrão. Nossas amostras apresentaram média de 4,91 mm, próximo aos 5,0 mm apresentados por Giard & Billet (1892), no entanto Travassos (1944) apresentou o valor mínimo de 6 mm, mostrando que esta medida pode apresentar uma variação significativa.

A relação entre ventosas e o diâmetro da faringe só haviam sido analisados anteriormente por Travassos (1944) e está de acordo com o presente estudo. O diâmetro dos testículos foi à única característica morfométrica que apresentou diferença entre a literatura e este trabalho, tendo sido relatada unicamente por Travassos (1944) apresentou uma média maior que a desta pesquisa. Essa diferença é uma incógnita, mas podemos supor que possa ser uma alteração devido à condição de conservação do material antes da sua análise. Os espécimes deste estudo foram fixados em AFA e conservados em AFA ou álcool 70%, o que pode ter ocasionado a redução do tamanho de algumas estruturas. Porém, essa diferença não foi evidente nas demais estruturas. O diâmetro do ovário que também só fora analisado por Travassos (1944) está dentro dos valores mínimo e máximo analisados nesse estudo. O comprimento da bolsa do cirro só analisado anteriormente por Railliet & Marotel (1898) e Travassos (1944) também se encontra de acordo com o presente estudo se relacionando ao tamanho dos espécimes. A distância entre ventosas e o comprimento e largura dos ovos podem ser características utilizadas para ajudar na identificação desta espécie.

Independente do tamanho do corpo do helminto, a distância entre ventosas dificilmente ultrapassa 1/3 do tamanho do corpo e os ovos uterinos apresentaram

comprimento e largura relativos aos descritos por Railliet & Marotel, (1898), Looss & Cuffey (1907) e Travassos (1944).

Os espécimes provenientes de Santa Cruz foram os que apresentaram menores medidas morfométricas. Este fato pode estar associado à alta carga parasitária, visto que todos os parasitos foram coletados do mesmo hospedeiro, provavelmente devido a uma competição intra-específica que provoca um impacto sobre o crescimento dos helmintos (POULIN et al., 2003). Porém, a relação entre ventosas (VO/VV), à distância entre ventosas (VO-VV) e o comprimento e a largura dos ovos (O), mostram que estes helmintos são da espécie *E. coelomaticum*.

Já os espécimes provenientes de Barra Mansa apresentaram o tamanho do corpo e das demais estruturas maior, levando em conta que estes helmintos foram coletados de mais de um hospedeiro, não se tratando provavelmente de elevada carga parasitária, podendo ser um fator que contribuiu para o crescimento destes. Contudo a variação de comprimento das estruturas é frequente.

Por outro lado, os dados morfométricos das cinco lâminas provenientes da Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) foram maiores que nos demais espécimes analisados neste estudo. Essa diferença pode estar relacionada à procedência do material, que não estava restrita ao Estado do Rio de Janeiro. Mas, o tamanho das estruturas acompanha o tamanho do corpo do helminto como acontece em todos os grupos aqui analisados.

Sabendo da dificuldade de identificação e diferenciação das espécies *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* em sua fase adulta, podemos destacar para identificação destas espécies o tamanho das ventosas, onde em *E. pancreaticum* a ventosa oral é nitidamente maior que a ventosa ventral, já em *E. coelomaticum* a ventosa oral tem diâmetro similar ao da ventosa ventral e por vezes a ventosa ventral chega a ser um pouco maior que a ventosa oral, porém com pouca diferença de tamanho, sendo estas consideradas subiguais. A distância entre ventosas é uma importante característica, pois, em *E. coelomaticum* equivalente a 1/3 do tamanho do corpo do helminto e o tamanho dos ovos são menores, atingindo no máximo 0,030 mm. Essas informações já haviam sido ressaltadas por autores como Looss & Cuffey (1907) e Travassos (1944). Entretanto estamos propondo corroborar com esses dados e acrescentar informações morfométricas de outras estruturas, tais como: comprimento e largura das glândulas vitelínicas (GV), relação entre comprimento e largura do corpo (CC/LC), distâncias entre região anterior do corpo e ventosa ventral (A-VV), distância entre ventosa ventral e região posterior do corpo (VV-P) e distância entre ceco e região posterior do corpo

(Ce-P). Estas medidas apresentaram um padrão preservado entre os espécimes e ao comparar as amostras provenientes das diferentes coletas elas acompanharam o tamanho do corpo de helminto.

Existe variação no tamanho de diversas estruturas mesmo em espécimes recuperados de um único hospedeiro. Estas estruturas podem variar de acordo com a metodologia de fixação, preservação e montagem. Neste trabalho todos os espécimes analisados foram recuperados do pâncreas de bovinos. Observamos estas variações, destacamos a amplitude observada no comprimento do corpo destes helmintos, o que pode dificultar no diagnóstico, pois a diferença significativa no tamanho dos parasitos pode influenciar o pesquisador ou o veterinário a considera-las sendo de espécies diferentes.

Com relação à morfologia das estruturas internas, muitas delas podem ser observadas e detalhadas com o uso da microscopia de luz de campo claro, e mesmo alguns detalhes que são visualizados com dificuldade, já foram descritos em trabalhos anteriores, por exemplo os canais eferentes e deferentes do sistema reprodutor masculino que já foram representados em esquema por Travassos (1944) e o canal de Laurer do sistema reprodutor feminino também já fora esquematizado por Looss & Cuffey (1907). Com o uso da microscopia de varredura a laser confocal não foram visualizados os canais eferentes e deferentes do sistema reprodutor masculino, nem o reservatório vitelínico e as glândulas vitelínicas do sistema reprodutor feminino, que apesar de serem visíveis na microscopia de campo claro não produziram imagens nesta microscopia. Isso pode ter ocorrido pelo fato destas estruturas não se corarem em tons de rosa pelo carmim, permanecendo com uma coloração marrom, por vezes avermelhado que não fluorescem.

A histologia foi realizada como teste e se mostrou um método eficiente e aplicável, que pode ser utilizado para reconstrução “tridimensional” do helminto para um estudo futuro.

Associando as técnicas de microscopia de luz, confocal e eletrônica de varredura em nossos experimentos, pretendemos contribuir na caracterização desta espécie, inserindo dados detalhados sobre a morfologia de estruturas internas e de superfície. Mesmo o *E. coelomaticum* não ser caracterizado por possuir uma cobertura tegumentar rica em ornamentações, o detalhamento das ventosas e da topografia de superfície mostrou que estes parasitos possuem estruturas que o difere de outros trematódeos, que comumente apresentam estruturas na superfície tegumentar como *Schistosoma mansoni*, que apresenta tubérculos com espinhos no tegumento dos machos (FREZZA et al. 2013), *Gordofarina festoni* que apresenta ventosa ventral festonada e papilas distribuídas pelo corpo (DOS SANTOS, 2008), *Hirudinella ventricosa* que apresenta superfície corporal fortemente marcada com dobras

transversais, rugas e papilas (FELIZARDO et al., 2013). Pinheiro et al. (2012) mostraram, com o uso da MEV, que as cercárias de *E. coelomaticum* apresentam as ventosas oral e ventral providas de diversas papilas, entretanto em nossos resultados mostramos que as ventosas do helminto adulto não apresentam espinhos ou papilas em sua cobertura tegumentar. Além disso, observamos sobre o tegumento estruturas cúbicas que já haviam sido descritas por outros autores, esta são inclusões cúbicas de cristais de proteínas caracterizadas por microscopia eletrônica e microanálise por Sakamoto & Oikawa (2007). Estes autores descreveram a constituição química destas estruturas e mostraram que são cristais que se originam da região subtegumental do helminto, e são formados por proteínas e enxofre, estando presentes tanto em *E. coelomaticum* quanto em *E. pancreaticum*.

A microscopia eletrônica de varredura também nos permitiu visualizar e fotografar o cirro extrovertido, esta é uma estrutura de cúpula e possui a superfície lisa. Nos espécimes que apresentaram o cirro introvertido, foi possível detalhar o gonoporo, orifício por onde o cirro se projeta para o meio exterior, não observamos a presença de estruturas na superfície. Nos espécimes que apresentaram o cirro introvertido, foi possível detalhar o gonoporo, orifício por onde o cirro se projeta para o meio exterior. Não observamos a presença de papilas, espinhos ou escamas.

O *Eurytrema coelomaticum* é a espécie endêmica no Brasil, Travassos (1944) já havia afirmado isso e o conjunto de trabalhos mais recentes mostram que esta é a espécie descrita e caracterizada nos trabalhos realizados com bovinos coletados em diferentes Estados do Brasil. A análise morfológica detalhada das duas, principais, espécies deste gênero, *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*, poderia nos fornecer dados para diferenciá-las, assim como já foi feito com o uso da biologia molecular. Além disso, seria importante analisar espécimes coletados em diferentes países, para avaliar quais caracteres morfológicos podem ser conservados e quais podem se diferenciar de acordo com a distribuição geográfica. Neste trabalho propomos contribuir com o detalhamento morfológico da espécie *E. coelomaticum*, mas também propomos algumas novas medidas que podem ser utilizadas como critério de diferenciação dentro deste gênero e em outros grupos de trematódeos digenéticos.

CONCLUSÃO

- a) Os dados morfométricos obtidos em nossos resultados corroboraram com os encontrados em trabalhos precedentes;
- b) Nossas análises permitiram concluir que esta espécie apresenta grandes variações morfológicas, principalmente em relação ao tamanho e forma do corpo, prevalecendo determinadas características em relação a outras para facilitar a identificação desta espécie;
- c) As principais características desta espécie são: a presença de ventosas subiguais, a medida da distância entre ventosas, a relação do comprimento do corpo pela largura e o comprimento e largura dos ovos;
- d) A microscopia de varredura a laser confocal possibilitou a visualização mais detalhada das estruturas que formam o sistema reprodutor, contribuindo para a elaboração de esquemas dos órgãos reprodutores feminino e masculino, assim como mostrou a disposição dos feixes musculares do corpo do helminto;
- e) A observação de cortes histológicos corroborou os dados obtidos por microscopia de campo claro e de varredura a laser confocal;
- f) A microscopia eletrônica de varredura confirmou a ausência de estruturas no tegumento, ventosas e cirro, destacando unicamente a presença de inclusões cúbicas de cristais de proteínas na superfície do corpo e juntamente com a microscopia confocal comprova a existência de reentrâncias no tegumento na lateral do corpo do helminto.

REFERÊNCIAS

- AMATO, J. F. R.; BOEGER, W. A. P.; AMATO, S. B. **Protocolo para Laboratório – coleta e processamento de parasitos de pescado.** Imprensa universitária, UFRRJ. Seropédica, RJ, Brasil. P.181., 1991.
- BASCH, P. F. **Patterns of transmission of trematode *Eurytrema pancreaticum* in Malaysia.** American Journal of Veterinary Research, Chicago, v.27, n.116, p.234-240, 1966.
- BASSANI, C. A.; SANGIONI, L. A.; SAUT, J. P. E.; HEADLEY, S. A.; YAMAMURA, M. H. **Euritrematose bovina.** Reviews. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, n. 2, p. 299-316, abr./jun. 2007
- BHALERAO, G. D. **Studies on the helminths of India. Trematoda I.** Journal of Helminthology,14: 163-180, 1936.
- BRAY, R. A., GIBSON, D. I; JONES, A. **Keys to the Trematoda.** CAB International and Natural History museum, London v.3, 2008.
- BUSETTI, E. T.; PASKE, A.; RUIS, M. C. E.; TOMAZ, V.; GOLINELLI, A. **Helmintos parasitos de Bubalus bubalis no Estado do Paraná.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.35, n.3, p.399-404, 1983.
- CAI Z.; ZHANG Y.; YE X. **Phylogenetic relationships of the genus Eurytrema from domestic and wild animal based on 18S rRNA sequences.** Parasitology Research, China, 111:1637–1644, July 2012.
- CAMPOS, M. S.; RAGUSA, A. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M. M. **Correlação entre o número de parasitas e peso de pâncreas em bovinos naturalmente infestados por *Eurytrema pancreaticum*, Janson 1889 (Trematoda, Dicrocoeliidae); diferença de peso entre pâncreas parasitados e não parasitados.** Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, v.11, p.295-299, 1974.
- CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. de B.; MANSO, P. P de A. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais e laboratório de saúde. Técnicas histológicas.** Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro v.2. Cap. 3, 290p, 2009.
- CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M.; FERREIRA, A. C.; PAES, A. C. ***Eurytrema pancreaticum*: clínica e diagnóstico em bovinos.** A Hora Veterinária, Porto Alegre, v.4, n.19, p.31-34, 1984.
- COORDENADAS geográficas do Bairro de Santa Cruz, Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Disponível em:
<[http://tools.wmflabs.org/geohack/geohack.php?language=pt&pagename=Santa_Cruz_\(bairro_do_Rio_de_Janeiro\)¶ms=22_55_13_S_43_41_6_W_](http://tools.wmflabs.org/geohack/geohack.php?language=pt&pagename=Santa_Cruz_(bairro_do_Rio_de_Janeiro)¶ms=22_55_13_S_43_41_6_W_)>. Acesso em 19 mar.2015.
- COORDENADAS geográficas do Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Disponível em:

<<http://www.agencia1.com.br/pmbm/site/page/aspectosgeograficos.asp>>. Acesso em: 19 mar.2015.

DA FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S. **Classificação e morfologia de Platelintos em Medicina Veterinária: Trematódeos**. Coleção Parasitologia Veterinária. Seropédica, 2002.

DE SOUZA, W. **Técnicas Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 420p, 2011.

DOS SANTOS, V. G. T. **Helmintos parasitos de *Rhinella fernandezae* (Gallardo, 1957) (Anura, Bufonidae) do Município de Imbé, Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

DOLLFUS, R. P. **Variations dans la form du corps, la position et la form des testicules chez *Dicrocoelium lanceolatum* (Rudolphi)**. Bull. Soc. Zool. France. 312-342, 1922.

EDUARDO, S. L.; MANUEL, M. F.; TONGSON, M. S. ***Eurytrema escuderoi*, a new species and two other previously known species of the genus *Eurytrema***. Philippine Journal of Science, Manila, v.15, n.1-2, p.104-116, 1976.

FELIZARDO, N. N.; KNOFF, M.; TORRES, E. J. L.; GOMES, E. P.; AMORIN, A. F.; GOMES, D. C. ***Hirudinella ventricosa* (trematoda) parasitizing *Makaira nigricans* and *Acanthocybium solandri* from neotropical region, brazil**. Neotropical Helminthology, 7(1), 2013.

FIGUEIREDO, C. B. **Sobre as lesões do pâncreas de boi produzidos pelo *Eurytrema pancreaticum***. Rio de Janeiro: Memorial Instituto Oswaldo Cruz, 1928. Supl.

FIGUEIRA, G. F.; De OLIVEIRA V. H. S.; TARODA, A; ALFIERI, A. A.; HEADLEY, S. A. **Caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos do estado do Paraná, Brasil**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. vol.23 no.3 Jaboticabal July/Sept. 2014.

FREIRE, J. J. **Fauna parasitária riograndense. I – Introdução, boi, ovelha e cabra**. Revista de Medicina Veterinária, São Paulo, v.3, n.1, p.40-55, 1967.

FREZZA, T. F.; OLIVEIRA, C. N. F.; BANIN, T. M.; REHDER, V. L. G., BOAVENTURA, S. Jr. ALLEGRETTI, S. M. **Tegumentary changes in two different Strains of *Schistosoma mansoni* treated with Artemisinin and artesunic acid**. Revista de Patologia Tropical Vol. 42 (3): 309-321. jul.-set. 2013.

GIARD, A.; BILLET, A. **Sur quelques trematodes parasites dès boeufs du Tonkin**. C.R. Social Biology, Madison, v.4, p.613-615, 1892.

HORTA, P. P. **Distomatose pancreática e glicosúria em bovinos**. A lavoura, Rio de Janeiro, v.22, n.3-4, p.157-158, 1918.

ITAGAKI, H; CHINONE, S. **Histories of rumen flukes and pancreas of ruminants**. In: Japan-Brazil Symposium on Science and Technology. 3., 1982, Tokyo. Proceeding Tokyo: Agency of Industrial Science and Technology, out. p.25-27, 1982.

JANSON, J. **Note explicative dès objets exposés par l'Ecole Agricole et Forestière de Komaba.** Paris, 1889.

JUBB, K. V. F. **The pancreas**, p. 407 - 424. In: JUBB K.V.F., KENNEDY P.C.; PALMER P.C. (eds) **Pathology of Domestic Animals**. Vol.2. 4th ed. Academic Press, San Diego, 1993.

LA RUE, G. R. **The classification of digenetic Trematoda: a review and a new system.** *Exper. Parasit.*, 6:306-349, 1957.

LAPAGE, G. **Monning's veterinary helminthology and entomology.** 4. ed. London: Baillière-Tindall & Cox, Covent Garden, 1956.

LOOSS, A. **Weitere beitraige zur kenntniss der Trematoden-Fauna Aegyptens, Zugleich versuch einer natuerlichen Gliederung: des genus Distomum Retzius.** *Zool. Jb., Syst.*, 12:521-884, Taf. 24-32, 1899.

LOOSS, A.; CUFFEY, E. **On some parasites in the museum of the school of Tropical Medicine, Liverpool with a contribution on the case of distomasis of the liver and rectum.** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, London, v.1, p.123-154, 1907.

MANNINGER, R.; MÓCSY, J. **Patologia y terapêutica especiales de los animales domésticos.** 3. ed.v.2. Barcelona: Labor, 1973.

MAPA da localização do Bairro Santa Cruz, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://portalgeo.rio.rj.gov.br/bairros Cariocas/imagens/bairros.gif>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

MAPA da localização do Município de Barra Mansa, Rio de Janeiro B. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Riodejaneiro_estado.gif>. Acesso em: 25 fev.2015.

MATTOS JÚNIOR, D. G. ***Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892), alguns aspectos do seu relacionamento com hospedeiros intermediários e definitivos sob condições experimentais.** 1987. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1987.

MATTOS JÚNIOR, D. G.; VIANNA, S. S., **O *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae) no Brasil.** *Arquivos Fluminenses de Medicina Veterinaria*, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.3-7, 1987.

MAYAUDON, T. H. ***Eurytrema pancreaticum* (Giard & Billet, 1892). Su presencia em bovinos (*Bos taurus*) de Venezuela.** *Revista de Medicina Veterinaria y Parasitologia*, Caracas, v.13, p.175-176, 1954.

NIEBERLE, K.; COHRS, P. **Anatomia patológica especial dos animais domésticos.** Lisboa: Fund. Calous. Gulbenkian, 1970.

PINHEIRO, J.; ACUNA, D. O. F.; MENEZES, A. O.; BRANDOLINI, S. V. P. B.; DA MATTA, R. A.; SOUZA, W. **New insight into the morphology of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae) cercariae by light, scanning, and transmission electron microscopies.** *Parasitology Research* 111:1437-1445, 2012.

POULIN, R.; GIARI, L.; SIMONI, E.; DEZFULI, B. S. **Effects of conspecifics and heterospecifics on individual worm mass in four helminth species parasitic in fish.**” *Parassitology Research* 90:143-147, 2003.

PURVIS, G. B. **The species of *Eurytrema* in domestic ruminants.** *Vet. Rec.* 121(1): 283-584, 1931.

RAGUSA, A. L.; CAMPOS, M. S. **Identificação de hospedeiro intermediário de *Eurytrema coelomaticum* (Giard e Billet, 1882) LOOSS: 1907, (Trematoda – Dicrocoeliidae) em fazendas de criação de bovinos no estado de São Paulo – Brasil.** *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo*, v.13, n.1, p.269-287, 1976.

RAILLIET, A.; MAROTEL, G. **La douve pancréatique parasite des boeufs et des buffles em Cochinchine**, in *Arch. Paras.*, V.I, 30-38, 1898.

RIBEIRO, O. C.; BIANCHIN, I.; MELO, H. J. H.; GOMES, A.; PEREIRA, A. S. **Lesões anátomo-patológicas observadas em infecções por *Eurytrema pancreaticum* em bovinos.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, 1980, Fortaleza. *Anais.*, Fortaleza, 1980.

RUDOLPHI, C. A. **Entozoorum, sive vermium intestinalum: Historia Naturalis.** Museum of Comparative Zoology – Biodiversity Heritage Library digitization Project Amstelaedami, 1808.

SAKAMOTO, T.; OIKAWA, T. **Cubic crystal protein inclusions in the neodermis of the pancreatic fluke, *Eurytrema pancreaticum*, and *Eurytrema coelomaticum*.** *Parasitology Research, Japan.* 101(5):1393-9. 2007.

TANG, Z.; TANG, C. **The biology and epidemiology of *Eurytrema coelomaticum* (GIARD; BILLET, 1892) and *Eurytrema pancreaticum* (JANSON, 1889) in cattle and sheep in China.** *Acta Zoologica, Stockholm*, v.23, p.267-282, 1977.

TESSELE, B.; BRUM, J. S.; Barros C. S.L. **Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* vol.33 no.7 Rio de Janeiro Julho de 2013.

TRAVASSOS, L. **Contribuição para a sistemática dos Dicrocoeliidae Looss, 1899.** *Arch. Eac. Sup. Agric. Med. Vet.*, 3(1/2): 7-24, 1919.

TRAVASSOS, L. **Revisão da família Dicrocoeliidae, Odhner, 1910.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional (Monografia do Instituto Oswaldo Cruz, n. 2), 1944.

TRAVASSOS, L. **Introdução ao estudo da helmintologia. Cap. 8 – Trematoda.** *Revista Brasileira de Biologia.* Rio de Janeiro, 1950.

TRAVASSOS, L., TEIXEIRA DE FREITAS, J.F.; KOHN, A. **Trematodeos do Brasil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 67: 1-886, 1969.

VAN BENDEN, P. J. **Mémoire sur les vers intestinaux.** Universidade Complutense de Madri. J-B Baillière et Fils. 376 pgs., 1858.

WARE, F. **Some members of the family Dicrocoelidae affecting domestic animals.** Journal of Comparative Pathology and Therapeutics. Volume 36, 33-39, 1923.

YAMAGUTI, S. **A Synoptical review of life histories of digenetic of vertebrates.** Tokyo: Keikan Publish Co. Japan, 1975.

ZHENG Y.; LUO X.; JING Z.; HU Z.; CAI X. **Comparison of 18S ribosomal RNA gene sequences of *Eurytrema coelmaticum* and *Eurytrema pancreaticum*.** Parasitology Research, China, 100:645–646, 2007.