

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde –
Doutorado

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE
Eurytrema coelomaticum (Giard & Billet, 1892) (Digenea,
Dicrocoeliidae) EM REBANHOS BOVINOS PROVENIENTES DA
REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS, BRASIL.

FIDELIS ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR

RIO DE JANEIRO – 2017

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

FIDELIS ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR

Ocorrência e caracterização morfológica de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) em rebanhos bovinos provenientes da região sul de Minas Gerais, Brasil.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biodiversidade e Saúde

Orientadora: Dra. Rosângela Rodrigues e Silva

RIO DE JANEIRO - 2017

Silva-Júnior, Fidelis Antônio da.

Ocorrência e caracterização morfológica de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) em rebanhos bovinos provenientes da região sul de Minas Gerais, Brasil. / Fidelis Antônio da Silva-Júnior. - Rio de Janeiro, 2017.

75 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2017.

Orientadora: Rosângela Rodrigues-Silva.

Bibliografia: f. 66-75

1. Trematoda. 2. Dicrocoeliidae. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Análise digital de imagens. 5. Contagem de ovos. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Mangueiras/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

FIDELIS ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) EM REBANHOS BOVINOS PROVENIENTES DA REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS, BRASIL.

Orientadora: Dr^a. Rosângela Rodrigues e Silva

Aprovada em: 04/12/2017

EXAMINADORES:

- Dra.** Simone Chinicz Cohen - **Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ)
- Dra.** Christiane Leal Corrêa (Faculdade de Ciências Médicas - UERJ)
- Dra.** Renata Heisler Neves (Faculdade de Ciências Médicas - UERJ)
- Dra.** Fernanda Barbosa de Almeida (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ)
- Dr.** Fabiano Matos Vieira (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ)

RIO DE JANEIRO - 2017

Dedico este trabalho aos
meus pais e demais familiares
pelo apoio integral

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por todas as bênçãos dadas e pela minha vida.

À Carolina Monteiro da Silva, minha esposa pelo auxílio nas análises, por seu amor, paciência, companheirismo, incentivo nos momentos difíceis, e sua presença constante em minha vida.

Ao meu pai Fidelis Antônio da Silva, pelo exemplo de homem, caráter e dignidade. Pelos momentos de alegria em sua companhia, por todos os dias de trabalho dedicados à minha família, pelo amor e carinho dedicados.

À minha mãe Maria Aparecida Silva, por todos os ensinamentos, amor, carinho, e pelo exemplo de superação demonstrado diariamente.

À minha família pelo apoio, carinho e contribuição para a formação de um homem melhor.

Aos meus eternos amigos que sempre torcem por mim e estão presentes em minha vida mesmo quando estão distantes.

À Doutora Rosângela Rodrigues e Silva, do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados – LHPV do Instituto Oswaldo Cruz – IOC pela amizade, orientação neste trabalho, sugestões, conselhos, atenção dispensada nos momentos complicados além do exemplo de profissional a ser seguido, com muito profissionalismo e dignidade.

À Professora Christiane Maria Barcellos Magalhães Rocha do Departamento de Medicina Veterinária – DMV da Universidade Federal de Lavras – UFLA pelo auxílio nas análises estatísticas, pelas sugestões e a alegria contagiante demonstrada diariamente.

Ao funcionário do DMV – UFLA Marquinhos pelo auxílio e companhia no Laboratório de Parasitologia no Departamento de Medicina Veterinária/UFLA.

Às servidoras do Laboratório de Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras, Aline Norberto Ferreira e Elisa de Melo Castro pelas imagens capturadas por microscopia eletrônica de varredura.

Ao meu amigo Hugo César Tadeu pela torcida e pelo incentivo em todos os momentos.

A todas as pessoas que de alguma maneira participaram e contribuíram com este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) EM REBANHOS BOVINOS PROVENIENTES DA REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS, BRASIL.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Fidelis Antônio da Silva Júnior

O trematódeo digenético *Eurytrema coelomaticum* é encontrado parasitando o pâncreas e ductos biliares de rebanhos bovinos e incidentalmente pode ser encontrado em seres humanos. O parasito causa sérios danos ao órgão infectado e acarreta perdas econômicas significativas. Este estudo transversal foi realizado com o objetivo de avaliar a ocorrência de *E. coelomaticum* em bovinos provenientes de 25 propriedades, localizadas em 15 municípios atendidos pelo Matadouro Regional localizado na cidade de Campo Belo, no sul do estado de Minas Gerais, Brasil. As amostras foram coletadas durante a inspeção *post-mortem*. Foram coletados 469 pâncreas e registrada uma frequência de ocorrência média global de 20,7% dos órgãos infectados por *E. coelomaticum*. As amostras foram submetidas às técnicas de microscopia de luz (campo claro) e eletrônica de varredura. Na microscopia de luz foram mensurados o comprimento e largura do parasito, distância entre ventosas, comprimento e largura da faringe, testículos e ovários. Foi realizado um cálculo de estimativa do número de ovos presentes em um animal adulto através do software ImageJ adaptando a metodologia usada para contagem de ovos de moscas da família Calliphoridae (Diptera) por área. O estudo detalhado da topografia do parasito por microscopia eletrônica demonstrou ausência de espinhos em sua superfície, presença de estrias concêntricas e transversais além de papilas nas ventosas oral e acetabular. Os resultados deste estudo indicam que a morfometria dos espécimes analisados está de acordo com a literatura para o gênero e que as infecções por *E. coelomaticum* estão distribuídas entre bovinos provenientes de rebanhos de corte na região objeto deste trabalho.

Palavras-chave: Trematoda, Dicrocoeliidae, microscopia eletrônica de varredura, estimativa, contagem de ovos, ImageJ software, análise digital de imagens.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

OCCURRENCE AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF
Eurytrema coelomaticum IN BOVINE HERDS FROM THE SOUTHERN
REGION OF MINAS GERAIS, BRAZIL

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSITY AND HEALTH

Fidelis Antônio da Silva Júnior

The digenetic trematode *Eurytrema coelomaticum* is found parasitizing the pancreas and bile ducts of cattle herds and is occasionally found in humans. The parasite causes serious damage to the infected organ and causes significant economic losses. This cross-sectional study was carried out to evaluate the occurrence of *E. coelomaticum* in cattle from 25 farms located in 15 municipalities served by the Regional Slaughterhouse in the southern of Minas Gerais state, Brazil. The samples were collected during post-mortem inspection. A total of 469 pancreas were collected and an frequency of occurrence of 20.7% of infection was observed. The samples were submitted to light microscopy (bright field) and scanning electron microscopy. The length, width of the parasite, distance between suckers, length and width of the pharynx, testes and ovaries were measured. An estimation of the number of eggs present in an adult animal was performed using the ImageJ software, adapting the methodology used for counting eggs from blow flies (Diptera: Calliphoridae) by area. The detailed study of the topography of the parasite by electron microscopy demonstrated absence of spines on its surface, besides the presence of papillae in the oral sucker and acetabulum. The results of this study indicate that the morphometry of the analyzed specimens are in agreement with the literature for the genus and that the infections by *E. coelomaticum* are widely distributed among cattle herds in the region that was the object of this work.

Keywords: Trematoda, Dicrocoeliidae, scanning electron microscopy, estimating, eggs counting, ImageJ software, digital image analysis.

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE GRÁFICOS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	2
1.2 BREVE HISTÓRICO SOBRE O GÊNERO <i>EURYTREMA</i>	2
1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO	3
1.4 MORFOLOGIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS	5
1.4.1 O tegumento de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	7
1.5 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA	8
1.6 EPIDEMIOLOGIA	9
1.7 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	11
1.8 ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ECC) PARA BOVINOS	13
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 GERAL	17
3.2 ESPECÍFICOS	17
4 METODOLOGIA	18
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS AMOSTRADAS	18
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	20
4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E EXAMES MICROSCÓPICOS	21
4.3.1 Microscopia de luz (campo claro)	21
4.3.1.1 Avaliação dos ovos através de software	22
4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura	26
4.4 SDS- PAGE DE PROTEÍNAS DO TEGUMENTO	27
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
5 RESULTADOS	29

5.1	CONDIÇÕES CLIMÁTICAS	29
5.2	OCORRÊNCIA DE <i>E. COELOMATICUM</i>	31
5.3	MORFOMETRIA	35
5.3.1	Microscopia de luz (campo claro)	35
5.3.2	Avaliação dos ovos de <i>E. coelomaticum</i>	44
5.3.3	Morfologia de <i>E. coelomaticum</i>	50
5.4	SDS PAGE	54
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Eurytrema</i> spp.....	5
Figura 2. Morfologia de <i>Eurytrema coelomaticum</i> . Fonte: (Costa 2004)	6
Figura 3. Distribuição global de <i>Eurytrema</i> spp.....	10
Figura 4. Distribuição de <i>Eurytrema coelomaticum</i> no Brasil.	11
Figura 5. Escore de condição corporal – ECC de bovinos.	15
Figura 6. Mapa com as 12 mesorregiões do estado de Minas Gerais.	19
Figura 7. Mapa do Brasil evidenciando a localização do município de Campo Belo, onde está situado o frigorífico matadouro e as cidades atendidas por este.	21
Figura 8. Demonstração de uma das funcionalidades do software ImageJ (NIH, USA). Barra de escala = 0,03 mm.....	24
Figura 9. Processo de contagem manual de ovos de <i>E. coelomaticum</i> provenientes do sul de Minas Gerais, Brasil.	25
Figura 10. Processo de binarização para calcular tamanho da área do útero de <i>E. coelomaticum</i>	25
Figura 11. Distribuição pluviométrica realizada pelo Instituto Nacional de Meteorologia - INMET da cidade de Lavras, Minas Gerais nos anos de 2012 e 2013 respectivamente, em comparação com a série histórica para a região entre os anos de 1960 e 1990.....	29
Figura 12. Distribuição pluviométrica realizada pelo Instituto Nacional de Meteorologia - INMET na cidade de Lavras, Minas Gerais nos anos de 2014 e 2015 respectivamente, em comparação com a série histórica para a região entre os anos de 1960 e 1990.....	30
Figura 13. Chuva acumulada mensal durante o ano de 2016 no município de Lavras – MG, e curva normal climatológica de chuva esperada para a região de acordo com as médias mensais entre os anos de 1960 e 1990.	30
Figura 14. Microscopia de luz (campo claro) de <i>E. coelomaticum</i> proveniente de bovinos abatidos no sul de Minas Gerais	37

Figura 15. Foto de microscopia de luz (campo claro) apresentado a visão geral das inserções cúbicas no tegumento de <i>E. coelomaticum</i> oriundos de pâncreas bovinos, provenientes do matadouro de Campo Belo, Minas Gerais.....	44
Figura 16. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de adultos de <i>E. coelomaticum</i> . [.....	51
Figura 17. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de adultos de <i>E. coelomaticum</i> . [.....	52
Figura 18. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de ovos de <i>E. coelomaticum</i>	53
Figura 19. SDS-PAGE de extratos protéicos de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	54

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação taxonômica de <i>Eurytrema coelomaticum</i>	2
Tabela 2. Classificação de escore corporal de gado bovino na inspeção <i>ante-mortem</i>	14
Tabela 2. Valores absolutos e percentuais de ocorrência de animais infectados e sadios de acordo com o município de origem.	31
Tabela 3. Percentual de animais positivos e negativos de acordo com a faixa etária	32
Tabela 4. Número de animais positivos e negativos e seus respectivos escores corporais	33
Tabela 5. Valores encontrados de bovinos parasitados de acordo com a raça predominantemente declarada.	33
Tabela 6. Média de comprimento e largura de <i>E. coelomaticum</i> de acordo com a cidade de origem das amostras.....	35
Tabela 7. Média de comprimento e largura de <i>E. coelomaticum</i> de acordo com a cidade de origem das amostras.....	38
Tabela 8. Valores registrados de alguns parâmetros morfométricos de espécimes adultos de <i>E. coelomaticum</i> da região sul do estado de Minas Gerais, Brasil.	39
Tabela 10. Valores registrados para a área total de exemplares de <i>E. coelomaticum</i> , tamanho do útero e taxa proporcional do órgão em relação à área do parasito.....	45

Lista de gráficos

- Gráfico 1. Fêmeas de gado bovino provenientes do matadouro de Campo Belo, Minas Gerais. Comparação do número de animais avaliados de acordo com as localidades de origem e número de indivíduos parasitados e sadios..... 34
- Gráfico 2. Machos de gado bovino provenientes do matadouro de Campo Belo, Minas Gerais. Comparação do número de animais avaliados de acordo com as localidades de origem e número de indivíduos parasitados e sadios..... 34
- Gráfico 3. Comparação do comprimento e da largura de exemplares de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem. 36
- Gráfico 4. Comparação das distâncias médias entre as ventosas oral e ventral de exemplares de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem..... 41
- Gráfico 5. Comparação das distâncias médias entre a ventosa ventral e o poro excretor de exemplares de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem..... 42
- Gráfico 6. Comparação do comprimento e largura da faringe de espécimes de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem. 42
- Gráfico 7. Comparação entre o comprimento e largura dos testículos de *E. coelomaticum* provenientes de rabanhos bovinos do sul do estado de Minas Gerais. 43
- Gráfico 8. Comparação das médias de comprimento e largura do ovário de exemplares de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem da amostra..... 43
- Gráfico 9. Correlação entre tamanho total de espécimes de *E. coelomaticum* (mm²) e o seu útero..... 46
- Gráfico 10. Box plot do número de ovos por área (mm²) contabilizados de forma manual e pelo software ImageJ..... 47
- Gráfico 11. Quantidade estimada de ovos de *E. coelomaticum* albergados no útero do parasito, provenientes de bovinos abatidos no sul de

Minas Gerais. Correlação entre o número de ovos contados manualmente e através do software ImageJ.	48
Gráfico 12. Comparação do número de ovos contabilizados manualmente e o número de ovos previstos pelo software ImageJ e de acordo com o tamanho do órgão em milímetros quadrados.	48
Gráfico 13. Equação da regressão linear simples para prever o número de ovos em útero de <i>E. coelomaticum</i> considerando uma taxa de ocupação de 100% da área da imagem por ovos.	49

Lista de abreviaturas

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ECC	Escore de Condição corporal
DMV	Departamento Medicina Veterinária
UFLA	Universidade Federal de Lavras
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
AFA	Solução de Ácido Acético Glacial, Formalina a 37% e Etanol
BIOPAR	Laboratório de Biologia Parasitária da Universidade Federal de Lavras
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
LME	Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural
PBS	Tampão fosfato-salino
SDS- PAGE	Eletroforese de Gel de Poli(acrilamida Dodecil)Sulfato de Sódio
ANOVA	Análise de Variância
VO-VV	Distância entre as Ventosas oral e ventral
VV-PE	Distância entre a ventosa ventral e o poro excretor
CF	Comprimento da Faringe
LF	Largura da Faringe
DP	Desvio Padrão
CTe	Comprimento do Testículo
LTe	Largura do Testículo
CO	Comprimento do Ovário
LO	Largura do Ovário
OPG	Contagem de Ovos por Gramas de Fezes
DeV	Distância entre Ventosas
Cvo	Comprimento da Ventosa Oral
Lvo	Largura da Ventosa Oral
Covv	Comprimento da Ventosa Ventral
Lavv	Largura da Ventosa Ventral
Meso.	Mesorregiões do estado de Minas Gerais

1 INTRODUÇÃO

Dentro da classe Trematoda, os principais organismos de importância médica e veterinária são: *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Clonorchis sinensis* (Looss, 1907), *Opisthorchis viverrini* (Poirier, 1886), *Paragonimus mexicanus* (Miyazaki & Ishii, 1968), *P. caliensis* (Little, 1968), *P. westermani* (Kerbert, 1878), *Fasciolopsis buski* (Morakote & Yano, 1990), *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758), *F. gigantica* (Cobbold, 1855), *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) e *E. pancreaticum* (Janson, 1889), que acometem milhões de pessoas e animais domésticos por todo o globo (Bassani et al. 2007; Hotez et al. 2008; Marcos et al. 2008; Mas-Coma et al. 2009; Schwertz et al. 2016a). Uma característica das infecções por helmintos parasitos é a sua cronicidade, uma vez que os hospedeiros podem ser parasitados por muitos anos sem sinais clínicos aparentes, tornando-os fontes de infecção para outros indivíduos (Traub et al. 2005, McSorley & Maizels 2012).

O trematódeo digenético *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907 é um parasito dos ductos pancreáticos de ruminantes e é endêmico em várias regiões do mundo, incluindo países da América do Sul, Europa e Ásia (Bassani et al., 2006). A euritrematose bovina é uma doença que pode causar morbidade em seus hospedeiros por comprometer o pâncreas dos mesmos e é endêmica em várias regiões do Brasil (Azevedo et al. 2004).

A doença acomete o pâncreas de bovinos (*Bos taurus taurus* e *B.taurus indicus*) entre outras espécies e é de grande importância econômica e veterinária devido às perdas causadas pela inaptidão do órgão afetado, ocasionando redução da produção de leite e carne, perda de peso, interferência na fertilidade, favorecimento de infecções secundárias e até mesmo morte de animais (Bassani et al. 2007, Ndlovu et al. 2009, Mohanta et al. 2015)

O quadro clínico na maioria das vezes é assintomático, fator este que torna ainda mais difícil o combate frente ao agente patogênico. Recentemente, Quevedo et al. (2013) descreveram achados clínicos e patológicos atribuídos à infecção maciça por estes parasitos em bovinos no sul do Brasil. Algumas das

características clínicas observadas foram: alterações histopatológicas compatíveis com pancreatite intersticial crônica, caquexia e anemia.

A espécie supracitada é considerada, portanto, um parasito de grande importância para as criações de ruminantes, e conseqüentemente possui grande influência na cadeia econômica em decorrência dos prejuízos gerados por estes espécimes (Ilha et al. 2005; Quevedo et al. 2013; Schwertz et al. 2016b).

1.1 Classificação taxonômica

O gênero *Eurytrema* é representado por espécies parasitas de rebanhos bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos e camelídeos (Bassani et al. 2007; Quevedo et al. 2013). A tabela 1 apresenta a classificação taxonômica de *Eurytrema coelomaticum*.

Tabela 1. Classificação taxonômica de *Eurytrema coelomaticum*

Classificação Taxonômica	
Reino	Animalia
Filo	Platyhelminthes
Classe	Trematoda
Sub Classe	Digenea
Ordem	Plagiorchida
Familia	Dicrocoeliidae
Gênero	<i>Eurytrema</i>
Espécie	<i>Eurytrema coelomaticum</i>

Fonte: Adaptado de Brandolini & Amato (2001) e Bassani et al. (2007)

1.2 Breve histórico sobre o gênero *Eurytrema*

De acordo com Yamamura (1989) o gênero *Eurytrema* foi descrito por Looss em 1907 e incluíam as espécies *E. coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) e *E. pancreaticum* (Jason, 1889) Looss, 1907. Travassos (1944, apud Yamamura 1989, p. 12) revisando a família Dicrocoeliidae reconheceu nove espécies válidas, divididas em quatro subespécies. Atualmente cerca de doze espécies

de *Eurytrema* são descritas em todo o globo, sendo: *E. pancreaticum* (Jason, 1889) Looss, 1907, *E. coelomaticum* (Giard & Billet, 1892), *E. dajii* (Bhalerao, 1924) , *E. media* (Chertkova, 1957), *E. ovis* (Tubanguí, 1925), *E. parvum* (Senoo, 1907), *E. tonkinense* (Gillard & Ngu, 1941), *E. escudeiroi* (Eduardo, Manuel & Tongson, 1976), *E. cladorchis* (Chin, Li & Wei, 1965), *E. hydropotes* (Tang & Tang, 1975), *E. fukienensi* (Tang & Tang, 1978), *E. sphaeriorchis* (Tang, Lin & Lin, 1978). Entretanto há muita controvérsia acerca da validade da maioria das espécies, sendo as espécies *E. pancreaticum*, *E. coelomaticum* e *E. cladorchis* as únicas avaliadas em nível molecular e as demais identificadas através de classificações morfológicas (Yamamura 1989; Bassani et al. 2007; Zheng et al. 2007, Mohanta et al. 2015; Chang et al. 2016).

Zheng et al. (2007), utilizando ferramentas de biologia molecular, realizaram uma análise das sequências do RNA 18S de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*, chegando a conclusão que se tratam de espécies diferentes por verificarem que estes organismos estão em ramificações distintas de um braço da árvore filogenética. De acordo com Mohanta et al. (2015) a árvore filogenética se ramificou de modo que o ancestral comum se diferenciou em um dos braços na espécie que viria a dar origem à espécie *E. cladorchis*, e no outro braço da árvore estão as espécies *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*. Um trabalho realizado por Figueira et al. (2014), chegou à mesma conclusão que as espécies *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* se diferenciam a níveis de biologia molecular.

1.3 Ciclo biológico do parasito

O ciclo biológico do gênero *Eurytrema* é do tipo heteróxico e a transmissão é condicionada a três grupos de hospedeiros, sendo um molusco, um artrópode e por último um vertebrado. O hospedeiro definitivo é o mamífero que ingere acidentalmente gafanhotos (esperanços) infectados com metacercárias. Estas são por sua vez liberadas no duodeno do hospedeiro definitivo e migram para o pâncreas (Headley 2000; Quevedo et al. 2013).

O hospedeiro intermediário primário é o molusco *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) (Gastropoda, Xanthonychidae) que é infectado ao ingerir ovos do parasito contendo miracídios. O desenvolvimento do helminto no gastrópode

dura em torno de 90 dias (Gomes et al. 2000; Ilha et al. 2005). Os miracídios eclodem no intestino do hospedeiro intermediário e na sequência passam para a forma de esporocisto de primeira geração (mãe) tendo como sítio de localização o tubo digestório do gastrópode. Em seu desenvolvimento, os esporocistos de primeira geração dão origem a vários esporocistos de segunda geração, que em condições ideais de temperatura (média de 26°C) podem completar o seu ciclo mais rapidamente (Bassani et al. 2007). Posteriormente o esporocisto migra da superfície externa do tubo digestório, alcançando o trato respiratório por onde são liberados através da cavidade hemocelomática.

O hospedeiro intermediário secundário é um gafanhoto do gênero *Conocephalus* (Thunberg, 1815) (no Brasil) ou *Oecanthus* (Serville, 1831) (algumas regiões da Ásia) (Ilha et al. 2005). Nestes insetos, as cercárias livres atravessam a parede intestinal e se encistam na cavidade celomática formando assim a metacercária (Brandolini & Amato 2001). É reportado por Itagaki & Chione (1982, apud Bassani et al. 2007, p.305), que o processo de desenvolvimento das cercárias para a forma de metacercárias no hospedeiro intermediário secundário pode ser influenciado pela temperatura, fechando-se o ciclo num prazo de quinze dias, considerando uma temperatura constante de 30°C. Segundo os mesmos autores a partir de um único ovo do parasito podem ser produzidos 100 esporocistos filhos e cada um destes podem conter até 200 cercárias, perfazendo um total de 20.000 formas infectantes. De acordo com Tang & Tang (1977, apud Bassani et al. 2007, p. 305) o número de metacercárias na cavidade celomática do artrópode pode variar entre 1 e 461 formas infectantes.

Encerrando a série de transmissão do parasito os hospedeiros definitivos se infectam ao ingerir os artrópodes infectados com metacercárias fechando assim o ciclo conforme se pode observar na figura 1.

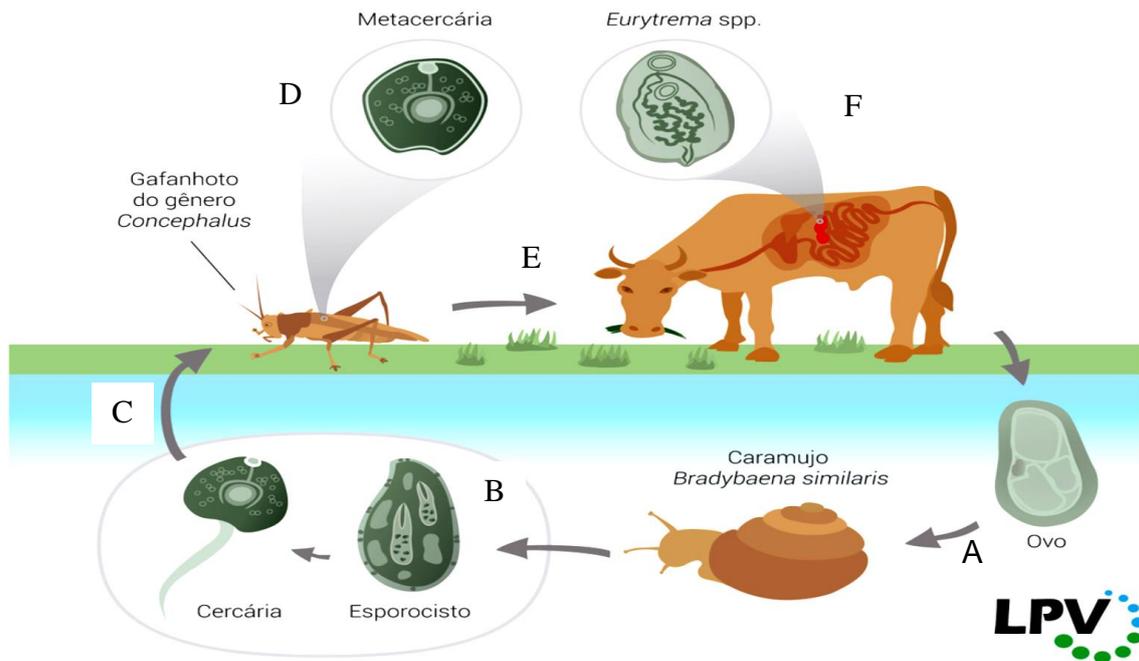


Figura 1: Ciclo biológico de *Eurytrema* spp.

Legenda: A - Ingestão do ovo pelo molusco; B desenvolvimento do parasito em esporocisto contendo cercárias; C – ingestão da forma infectante pelo hospedeiro secundário; D – desenvolvimento da forma infectante para metacercária. E - ingestão acidental de artrópodes infectados pelo hospedeiro definitivo; F – desenvolvimento para a forma adulta de *Eurytrema* spp. Fonte: Tessele et al. 2013.

1.4 Morfologia e características gerais

Inicialmente a classificação dos trematódeos se dava de acordo com seu hospedeiro, localização errática nos órgãos ou até mesmo pela posição do parasito no pâncreas (Yamamura, 1989). Posteriormente a identificação se deu através das características fenotípicas, morfologia das estruturas dos órgãos, análises citológicas e por fim através de perfis moleculares dos parasitos (Bassani et al. 2006; Bassani et al. 2007; Zheng et al. 2007, Mohanta et al. 2015).

As espécies do gênero *Eurytrema* possuem o corpo em formato de folha, achatados dorso-ventralmente. Possuem ventosa oral e ventral e seu tamanho pode variar entre 3-13 mm de comprimento por 2-7 mm de largura. Suas extremidades são cônicas e sem apêndices caudais (Wioreno et al. 1987; Yamamura 1989; Mohanta et al. 2015). A ventosa oral é sub-terminal e

dependendo da espécie é maior ou menor que a ventral. A ventosa ventral está localizada entre a metade a um terço da parte anterior do corpo do animal. A faringe é pequena e o esôfago é curto. O ovário é arredondado ou lobulado (3-10 lobos), submediano para a esquerda ou direita da linha média e pós-testicular. Glândulas vitelinas são longas, dispostas em grupos extracecais e se localizam nas laterais do animal, estendendo-se posteriormente a margem caudal dos testículos, mantendo-se a partir do ponto final do ceco (Wiroreno et al. 1987; Yamamura 1989; Ilha et al. 2005; Bassani et al. 2007; Mohanta et al. 2015).

A espécie *E. coelomaticum* de acordo com Travassos (1944, apud Bassani et al. 2007), possui o corpo achatado dorsoventralmente com comprimento entre 10 e 13 mm e largura de 6 a 7 mm, ventosa oral sub-terminal, com 0,9 a 1 mm de diâmetro e ventosa ventral com dimensão igual a da ventosa oral. Possui ainda a cutícula lisa, faringe e esôfago delgados, cecos intestinais sinuosos e delgados, bolsa do cirro claviforme e grande, poro genital ligeiramente pós bifurcal mediano. Outras estruturas presentes são: testículos pós acetabulares em zonas paralelas, ovários pós-testiculares, vitelinos laterais, ovos com tamanho variando entre 0,042 - 0,050 mm de comprimento por 0,023 - 0,030 mm de largura, glândulas de Mehlis, espermateca e canal de Laurer presentes, além da vesícula excretora simples e poro excretor terminal (figura 2).

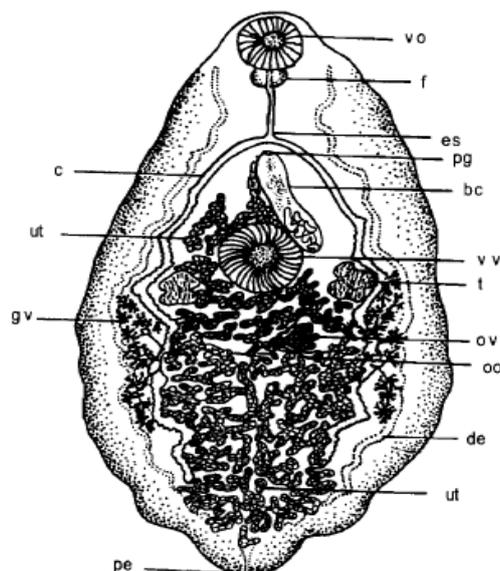


Figura 2. Morfologia de *Eurytrema coelomaticum*. Fonte: (Costa 2004)

Legenda: (vo) ventosa oral; (f) faringe; (es) esôfago; (c) ceco; (pg) poro genital; (bc) bolsa do cirro; (vv) ventosa ventral; (t) testículo; (ov) ovário; (oo) oótipo (circundado pelas glândulas de Mehlis, cuja secreção entra na formação da casca do ovo onde ocorre a fecundação); (de) ducto excretor; (ut) útero; (pe) poro excretor; (gv) glândulas vitelogênicas.

1.4.1 O tegumento de *Eurytrema coelomaticum*

A superfície tegumentar dos helmintos é a região por onde os parasitos interagem com o seu ambiente. A superfície externa é denominada tegumento em trematódeos e cestódeos e cutícula em nematódeos (David & Geary 2003). A superfície externa do tegumento pode apresentar diferentes configurações de moléculas e estruturas, possuindo um caráter de proteção e ao mesmo tempo de interação com o hospedeiro no sentido de auxiliar na evasão do sistema imune, fixação e o aproveitamento de substâncias essenciais para a sua manutenção no organismo do hospedeiro (Brady & O'Neill 1999, Jefferies et al. 2001, David & Geary 2003)

O tegumento de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* é predominantemente liso com dobras e estrias que aumentam a superfície de absorção dos parasitos. Esta topografia do tegumento também é vista em fases anteriores como na forma de esporocistos (Eduardo & Sy 2007, Franco-Acuña et al. 2011)

O tegumento possui ainda papilas sensoriais com formato de cúpula e superfície apical lisa, e estas, estão dispersas pelo corpo do animal, mas predominantemente concentradas nas ventosas. É possível identificar essas estruturas nas fases anteriores ao animal adulto (Pinheiro et al. 2012). Outros trematódeos apresentam estruturas semelhantes como é o caso de *Paramphistomum microbothrium* (Fischoeder, 1901) (Trematoda: Paramphistomatidae) que apresenta o arranjo das papilas concêntrico com agregações em forma de cúpula densamente dispostas em direção à extremidade oral, além do tegumento possuir dobras próximas a extremidade anterior do animal (Shalaby et al. 2010). Já a espécie *Lecithochirium musculus* (Looss, 1907) (Trematoda: Hemiuridae) tem a superfície do

tegumento lisa e coberta por cristas citoplasmáticas. Segundo Filippi et al. (2012) foram observadas no tegumento unidades semelhantes com uma “calçada portuguesa” (cobblestone-like unit of the tegument), além de invaginações, evaginações e dobras tegumentares.

Observações ultraestruturais demonstraram que a espécie *Concinnum epomopis* (Sandground, 1973) (Trematoda: Dicrocoeliidae) apresenta o tegumento predominantemente liso, com ausência de espinhos. No entanto, o tegumento é complexo, exibindo diminutas ondulações laterais, predominantemente na parte ventral. Possuem ainda um padrão de estrias e de lamelas tegumentares em diferentes regiões do corpo. Há dois tipos de papilas sensoriais e estas exibem um padrão de distribuição uniforme e distinto na superfície do parasito (Otubanjo, 1985).

Além das papilas, Sakamoto & Oikawa (2007) observaram corpúsculos cúbicos no tegumento de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* provenientes do continente Americano e da Ásia. Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura é possível observar que o tegumento apresenta estrias semelhantes a digitais humanas ao longo do corpo do animal.

1.5 Sinais clínicos e patogenia

A euritrematose bovina na maioria das vezes se apresenta de maneira subclínica e somente durante o procedimento de abate ou necropsia os parasitos são detectados (Bassani et al. 2006, 2007). O ducto pancreático pode inflamar e dilatar o órgão acometido. Durante infecções maciças o ducto pode ser ocluído e os tecidos pancreáticos podem ser danificados. Isto acarreta distúrbios gastrointestinais mais ou menos graves como vômitos, flatulência, diarreia, constipação, além de o animal apresentar letargia, perda de peso, fraqueza e anorexia (Ilha et al. 2005; Bassani et al. 2007; Schwertz et al. 2016a; Grosskopf et al. 2016)

Animais com boas condições de saúde geralmente não apresentam sinais clínicos mais graves, entretanto, podem exibir altas concentrações plasmáticas de amilase, glicose e cetonúria (Ilha et al. 2005). Quevedo et al. (2013) observaram em um animal da raça Jersey um acentuado emagrecimento progressivo e retardo de crescimento durante 12 meses, mesmo realizando

sucessivos tratamentos anti-helmínticos e suplementação nutricional. Observaram ainda três padrões morfológicos de lesões sendo o primeiro caracterizado por infiltrado inflamatório com muitos macrófagos, linfócitos e eosinófilos; segundo - múltiplos focos inflamatórios ao redor de coleções de ovos com uma camada de fibroblastos; terceiro - confluência das lesões observadas no estágio dois com evidente destruição de tecido pancreático e substituição por tecido conjuntivo fibroso.

Assim como os autores supracitados Headley et al. (2009) caracterizaram as lesões no pâncreas em cinco grupos distintos: 1º - pâncreas sem alteração; 2º- reações proliferativas iniciais nos ductos pancreáticos; 3º - alterações proliferativas severas; 4º - pancreatite intersticial multifocal crônica e finalmente o 5º - que corresponde à pancreatite intersticial crônica difusa.

1.6 Epidemiologia

Os parasitos da classe Trematoda são vastamente distribuídos no globo e a ampla disseminação se deve, em parte, à movimentação de animais provenientes de regiões enzoóticas para regiões indenes. Outro fator a ser considerado é o fato de estarem presentes nos países considerados “pobres” ou em “desenvolvimento”, o que propicia um fator adicional para a manutenção no ambiente dos espécimes (Keiser & Utzinger 2009; Fernández et al. 2012; Farjallah et al. 2013).

Um grande problema encontrado ao se combater as parasitoses é o fato de que algumas regiões são mais propícias à manutenção destes organismos em decorrência de características intrínsecas ou por terem sofrido modificações que contribuem para a manutenção dos parasitos no ambiente como, por exemplo, a construção de reservatórios para as usinas hidrelétricas ou sistemas de irrigação (Keiser & Utzinger 2009). Outro fator que contribui para a manutenção de helmintos parasitos no ambiente é que as doenças resultantes das infecções por estes organismos são negligenciadas, não sendo, portanto, percebidas pela indústria farmacêutica como um bom mercado para se investir (Vial et al. 1999; Trouiller et al. 2002)

De acordo com vários autores as espécies de *Eurytrema* são amplamente distribuídas pelo globo (Figura 3). A euritrematose bovina ocorre

principalmente na América do Sul, Ásia e Europa e é uma doença endêmica em várias regiões do Brasil, conforme se pode observar na Figura 4. Um estudo realizado no estado do Paraná observou uma prevalência de quase 50% dos animais parasitados por *E. coelomaticum* (Bassani et al. 2006). Entretanto, a prevalência desta doença está relacionada as condições do ambiente no entorno dos rebanhos, ocorrendo variações nas taxas de infecção pelo parasito (Belém et al. 1992). Um dos aspectos que mais chamam a atenção na epidemiologia de *E. coelomaticum* são os altos índices de animais infectados em abatedouros de diferentes estados brasileiros (Ilha et al. 2005; Bassani et al. 2007).

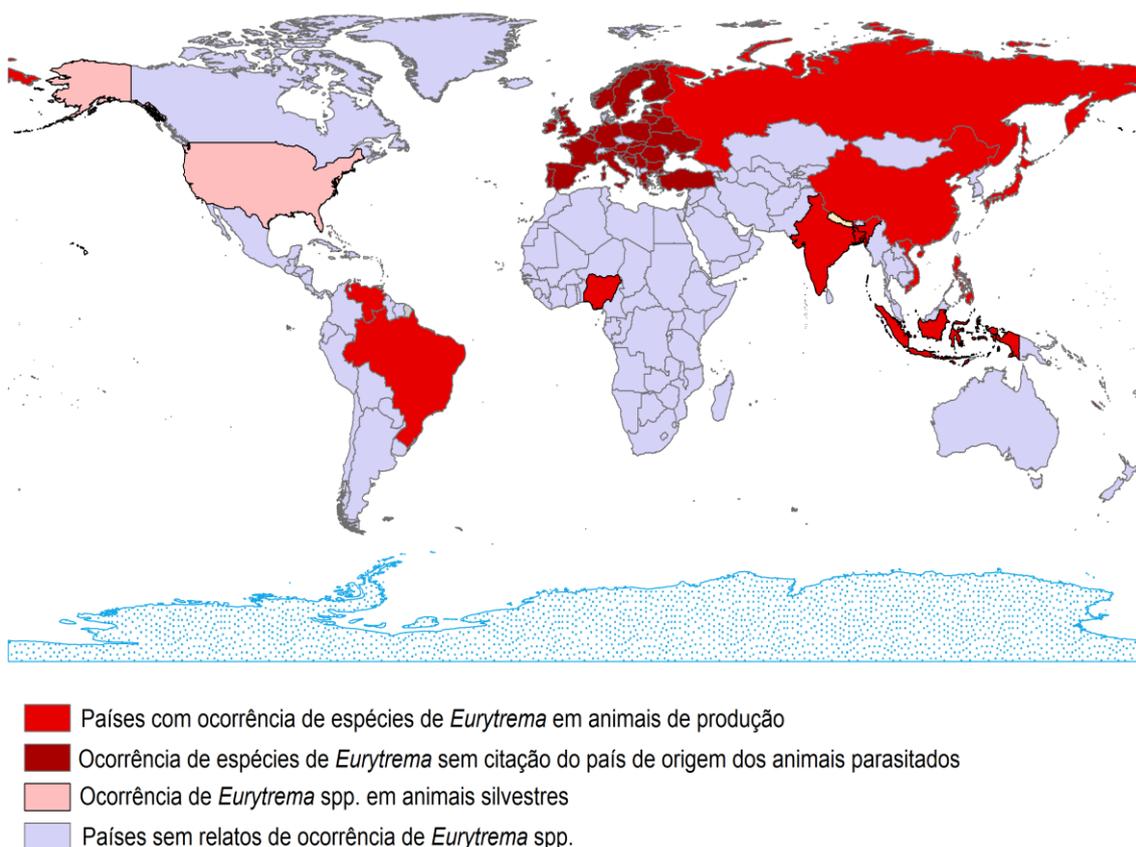


Figura 3. Distribuição global de *Eurytrema* spp.

Ilustração: Fidelis Antônio da Silva Júnior.

Fonte: adaptado de Wiroreno et al. (1987), Wade et al. (1989), Bassani et al. (2006), Cai et al. (2012), Mohanta et al. (2015), Karshima et al. (2016), Okajima et al. (2016).

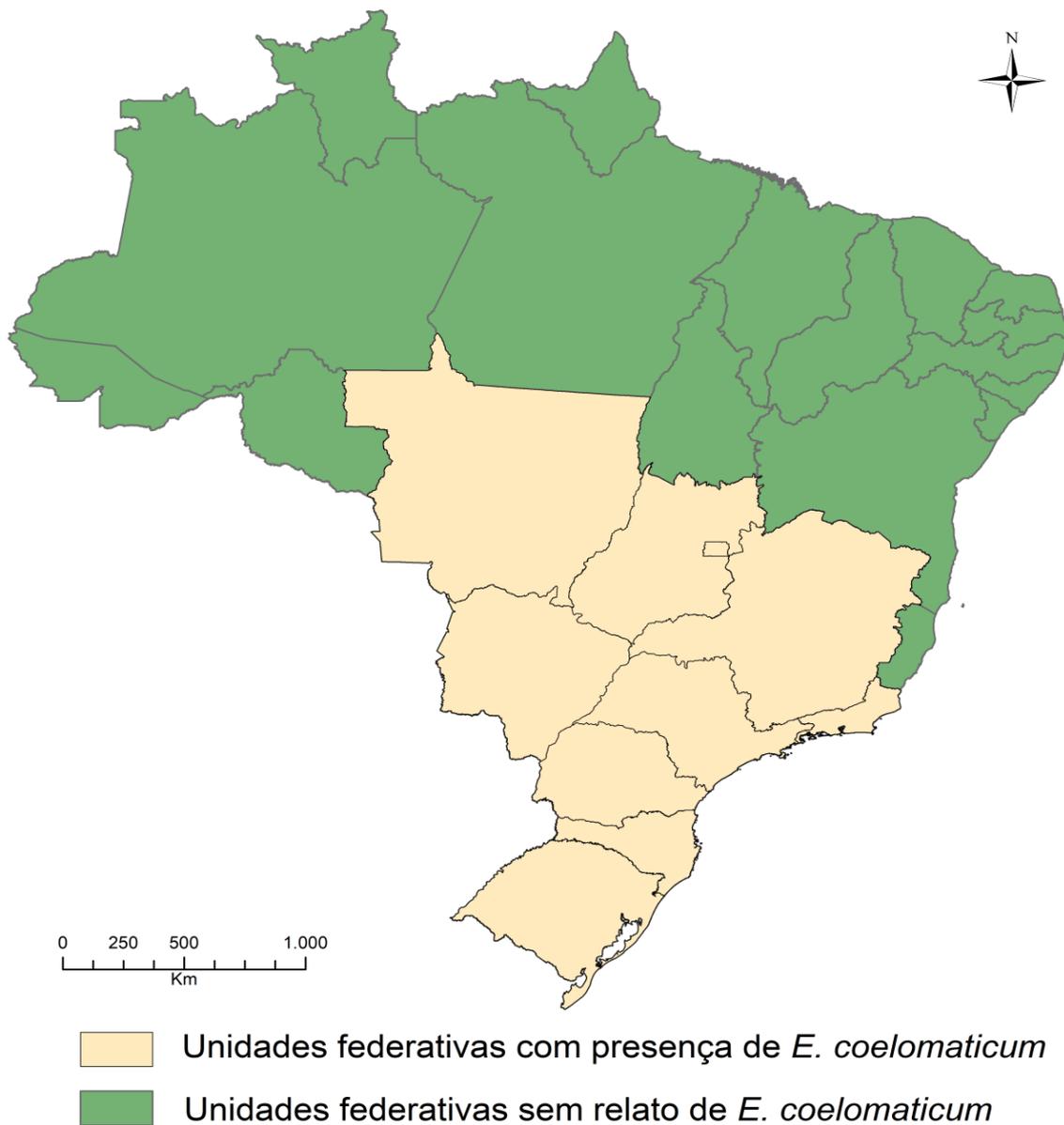


Figura 4. Distribuição de *Eurytrema coelomaticum* no Brasil.

Ilustração: Fidelis Antônio da Silva Júnior.

Fonte: Adaptado de Belém et al. (1992, 1994), Bassani et al. (2006, 2007), Rachid et al. (2011), Tessele et al. (2013), Grosskopf et al. (2017).

1.7 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico básico é feito pelo método coproparasitológico, entretanto, a visualização dos ovos requer profissionais treinados para a correta

identificação do parasito. O procedimento coproparasitológico para identificação de ovos de *E. coelomaticum* é uma técnica pouco usual na prática clínica. A parasitose muitas vezes só é diagnosticada no exame *post-mortem*, principalmente pela dificuldade de diagnóstico em animais pouco parasitados ou naqueles que eliminam poucos ovos (Ilha et al. 2005; Ribeiro et al. 2013).

Na procura por testes diagnósticos mais efetivos, Correa & Correa (1984, apud Figueira et al. 2014) buscaram a padronização de uma reação intradérmica usando como antígenos imunogênicos uma suspensão de parasitos com a titulação de 1:500. Essa intradermoreação apresentou uma eficácia relativamente boa, entretanto 29% das amostras se apresentaram como falso-negativas (Bassani et al. 2007, Figueira et al. 2014)

De acordo com Belém et al. (1992), a adaptação por eles realizada da técnica Dennis, Stone & Swanson para diagnóstico de *Fasciola* e *Paramphistomum* possui 94,2% de probabilidade de diagnosticar os casos de infecção por *Eurytrema* sp. independentemente da carga parasitária. Entretanto, os resultados deste mesmo estudo observaram 87,2% dos animais parasitados.

Apesar das técnicas de diagnóstico como o exame coproparasitológico e a intradermoreação serem importantes ferramentas para detecção de animais positivos, é necessário incluir um rol ainda maior de exames, além de aperfeiçoar os testes existentes para que possa estabelecer medidas efetivas de controle ao parasito (Ribeiro et al. 2013)

O combate frente aos parasitos do gênero *Eurytrema* tem se demonstrado ineficaz na maioria das vezes, pois existem poucos anti-helmínticos capazes de atuar no controle da parasitose. Adicionalmente existem discordâncias sobre a efetividade dos medicamentos utilizados no tratamento da doença, havendo um predomínio no consenso de que as drogas utilizadas não possuem efeitos deletérios para os parasitos. Sakamoto et al. (1980) descreveram o nitroxinil e praziquantel como uma forma de controle efetivo da parasitose, pois, observaram em seu estudo uma redução no número de ovos eliminados nas fezes bem como a deformação das formas adultas do parasito. Outro ponto positivo observado pelos autores foi a verificação de regeneração de células de tecidos glandulares.

Uma importante forma de evitar a ocorrência do parasito está associada com a prevenção, e isto pode ser feito através da diminuição da população de moluscos. Os caracóis são hospedeiros intermediários de *Eurytrema sp* e o fato de se manter níveis baixos destes espécimes contribui para a não propagação da doença (Jiménez & Maya-Rendon 2007, Bassani et al. 2007).

1.8 Escore de condição corporal (ECC) para bovinos

A observação do escore nos bovinos é uma importante ferramenta para a tomada de decisão no que se refere ao envio ou não de animais para o frigorífico, uma vez a comercialização da carne é baseada além do peso vivo do animal e feita também através da avaliação visual e aparência da carcaça (Pires, 2000). Portanto a condição ideal do escore corporal é aquele que apresenta uma musculatura robusta com um mínimo de gordura de cobertura.

A avaliação do escore de condição corporal (ECC) se tornou uma ferramenta importante em criações bovinas, suínas, entre outras por ser relativamente fácil e extremamente interessante para ser aplicada em programas de manejo de animais.

O ECC permite determinar com uma precisão aceitável o estado nutricional de animais, apesar de ser uma avaliação subjetiva. Esta avaliação está desvinculada do “peso vivo” e do tamanho do animal, sendo considerada como o melhor indicador de gordura corporal “in vivo”.

O escore de condição corporal possui uma classificação que varia entre 1 e 9. Os valores 8 e 9 significam que os animais estão com um alto índice de obesidade, enquanto os valores 1 e 2 indicam animais extremamente magros e debilitados, conforme se pode observar na tabela 2 e Figura 5.

Tabela 2. Classificação de escore corporal de gado bovino na inspeção *ante-mortem*

ESCORE	DESCRIÇÃO
1	Debilitado - Extremamente raquítica, próxima da morte por inanição. A vaca está extremamente magra, sem nenhuma gordura detectável. Costela, espinha dorsal e anca muito proeminentes. Nenhum tecido gorduroso visual.
2	Pobre . Um pouco definhada. A vaca ainda está muito magra, mas se nota alguma cobertura sobre a coluna vertebral. Costelas, espinha dorsal e anca proeminente.
3	Magro . Costelas visualizadas individualmente, mas não tão salientes.
4	Limite . Costelas individuais pouco ou não evidentes. Os processos espinhosos podem ser verificados com um toque, entretanto menos evidentes.
5	Moderado . Gordura palpável sobre as costelas e qualquer lugar de garupa. Possui boa aparência geral.
6	Moderado bom . Necessita de pressão para apalpar espinhas.
7	Boa . A vaca tem aparência gorda e boa quantidade de gordura sobre as costelas. Acúmulo de gordura na região da garupa.
8	Gordo . Peito repleto e grande depósito de gordura sobre as costelas, garupa, inserção da camada e vulva.
9	Extremamente Gordo . A vaca está muito gorda. Estruturas ósseas não visíveis e não palpáveis.

Fonte: Adaptado de Machado (2008).

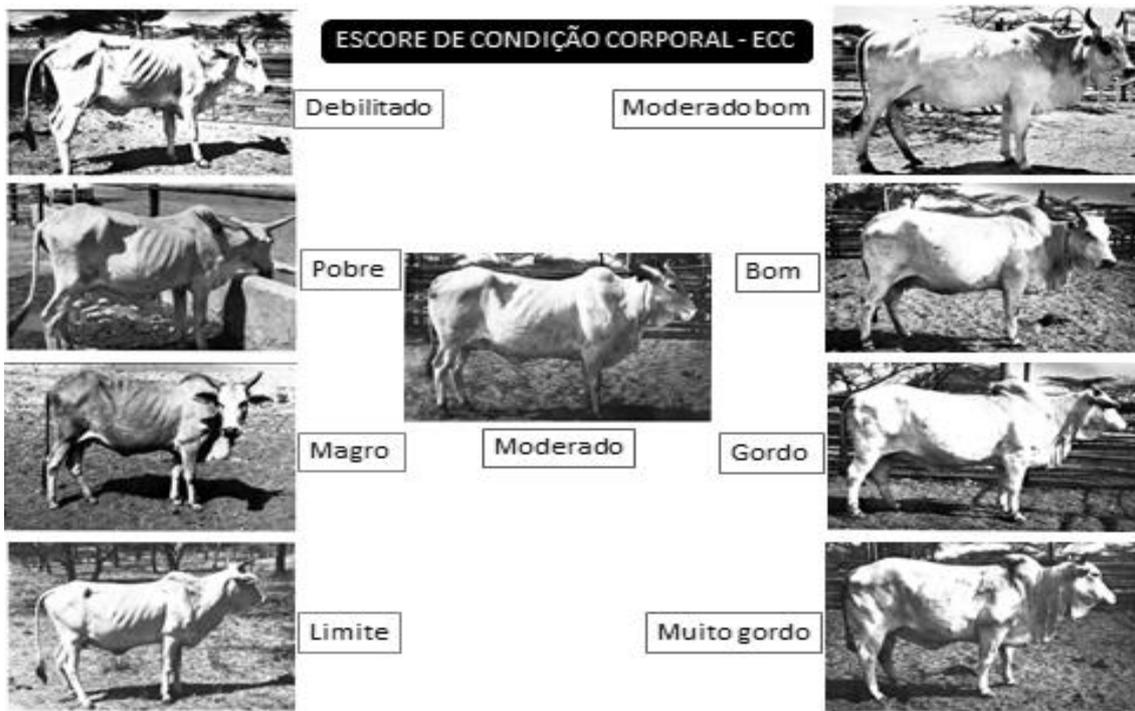


Figura 5. Escore de condição corporal – ECC de bovinos.

Fonte: Adaptado de Machado (2008)

2 JUSTIFICATIVA

Estudos envolvendo o levantamento de trematódeos em rebanhos bovinos são basicamente voltados para a pesquisa de *Fasciola hepatica*, sendo, portanto, essencial à busca por dados relacionados a outras famílias e gêneros dentro da classe Trematoda. Pesquisas epidemiológicas sobre *Eurytrema coelomaticum* favorecem o conhecimento sobre a sua ocorrência, facilitando a atuação na sua prevenção.

As perdas ocasionadas pelo parasitismo por *E. coelomaticum* em bovinos afetam a economia de forma direta, uma vez que, geram perdas aos seus criadores. Como a maioria dos animais infectados são assintomáticos, o conhecimento mais aprofundado sobre a sua morfologia, comportamento e principalmente sua distribuição é de suma importância para que medidas sejam tomadas.

O conhecimento acerca da euritrematose bovina possibilita que mais estudos sejam feitos, e com isso, o controle parasitário se torne mais eficaz, garantindo a saúde do rebanho e seu aproveitamento como um todo.

O uso de técnicas como a microscopia eletrônica de varredura possibilita a visualização de estruturas existentes no tegumento dos helmintos parasitos e agrega informações sobre a morfologia destes. Com este intuito foi realizado o levantamento da ocorrência de *E. coelomaticum* em rebanhos provenientes de 15 cidades do sul de Minas Gerais bem como a caracterização morfométrica e morfológicas destes organismos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Determinar a distribuição geográfica e a prevalência de *Eurytrema coelomaticum* em rebanhos bovinos advindos de 15 municípios do sul do estado de Minas Gerais abatidos no frigorífico matadouro regional de Campo Belo.

3.2 Específicos

- Caracterizar os espécimes de *E. coelomaticum* encontrados na região sul de Minas Gerais através da morfologia, utilizando para isso a microscopia de luz (campo claro) e microscopia eletrônica de varredura;
- Verificar se existe predominância de infecção de *E. coelomaticum* de acordo com os parâmetros qualitativos sexo, idade, raça ou escores de condição corporais.
- Calcular o tamanho médio do útero e a proporção do órgão em relação ao tamanho total do animal para avaliar a correlação entre os dois parâmetros avaliados;
- Estimar o número de ovos através de um software e comparar os resultados com contagens manuais para verificar a acurácia do programa;

4 METODOLOGIA

Foi realizado um cálculo para obter um número mínimo amostral para que este fosse representativo quanto ao total do efetivo bovino na área de estudo. Para isso foi utilizada a ferramenta Population Survey do software Epi Info 7.0 (Centers for Disease Control and Prevention, USA), considerando um nível de significância estatística de 5%, dentro de um nível de confiança de 95% e frequência da infecção estimada em 50%. O efetivo bovino considerado (população na região) foi de acordo com o censo agropecuário do ano de 2015 (IBGE, 2015) que registrou um rebanho de 23.768.959 cabeças de gado no estado de Minas Gerais, sendo 353.705 animais nos municípios atendidos pelo abatedouro. O presente estudo foi pautado pela ética na pesquisa e as atividades foram realizadas de acordo com as legislações vigentes (Decreto nº 30.691/1952, Instrução Normativa nº 154/2007 e Lei 11794/2008).

4.1 Caracterização das áreas amostradas

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o estado de Minas Gerais é dividido em 12 mesorregiões conforme se pode observar na Figura 6. O presente trabalho incluiu cidades pertencentes a três mesorregiões denominadas: Campo das Vertentes, Oeste de Minas e a região Sul e Sudoeste de Minas. O Campo das Vertentes é composto por 36 municípios divididos em três microrregiões: Lavras, São João Del Rei e Barbacena. A mesorregião Oeste de Minas é constituída por 44 cidades sendo divididas em cinco microrregiões: Campo Belo, Divinópolis, Formiga, Oliveira e Piumhi. Finalmente a mesorregião Sul e Sudoeste de Minas possui 146 cidades, constituindo dez microrregiões: Alfenas, Andrelândia, Itajubá, Passos,

Poços de Caldas, Pouso Alegre, Santa Rita do Sapucaí, São Lourenço, São Sebastião do Paraíso e Varginha.

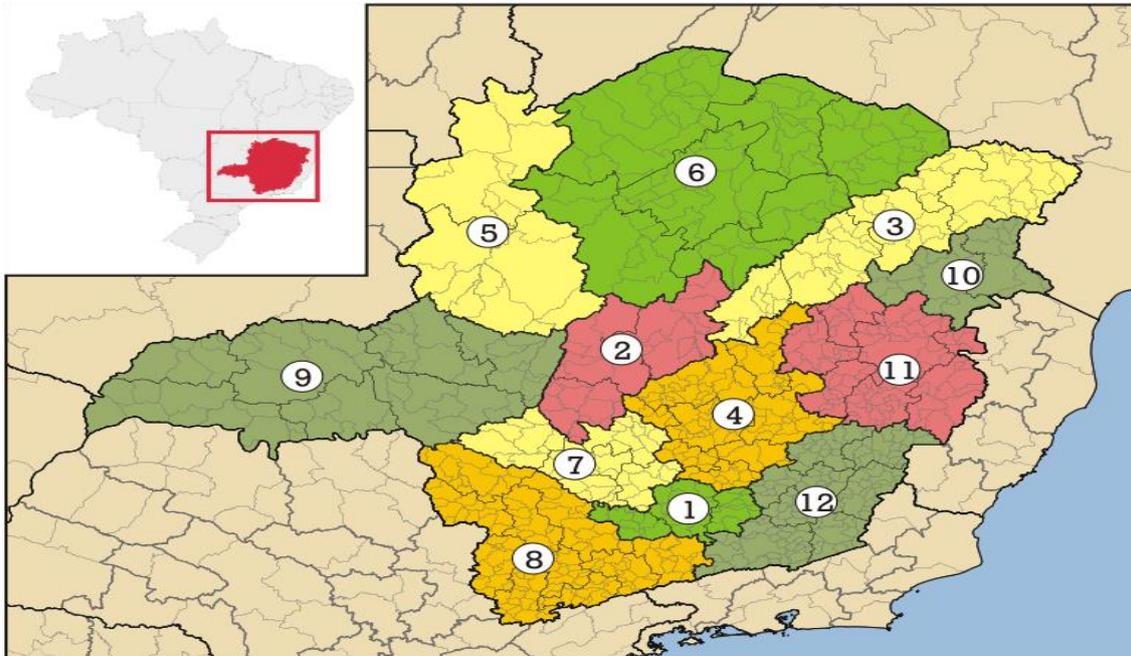


Figura 6. Mapa com as 12 mesorregiões do estado de Minas Gerais.

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Campo das Vertentes | 7. Oeste de Minas |
| 2. Central Mineira | 8. Sul e Sudoeste de Minas |
| 3. Jequitinhonha | 9. Triângulo Mineiro e Paranaíba |
| 4. Metropolitana de Belo Horizonte | 10. Vale do Mucuri |
| 5. Noroeste de Minas | 11. Vale do Rio Doce |
| 6. Norte de Minas | 12. Zona da Mata |

Fonte: Wikipédia (disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Lista_de_mesorregiões_de_Minas_Gerais)

Segundo a classificação de Koppen, estas mesorregiões possuem o clima do tipo Cwa (subtropical / tropical de altitude) e Cwb (temperado marítimo/ tropical de altitude), com as estações do ano bem definidas. A estação denominada “seca” compreende os meses de abril a setembro, onde os meses de junho e julho correspondem aos períodos de menores temperaturas e menores índices de umidade relativa do ar. Por sua vez a estação denominada “chuvosa” compreende os meses de outubro a março, com os maiores índices pluviométricos nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro. Foram obtidas as médias pluviométricas dos últimos cinco anos para verificar o comportamento das chuvas na região do estudo, uma vez que a umidade pode ser um fator limitante na transmissão da doença por atuar no comportamento das taxas de hospedeiros intermediários disponíveis no meio ambiente. Os dados pluviométricos foram obtidos da estação pluviométrica situada no município de Lavras, estação esta que corresponde às localidades do presente estudo, uma vez que o instituto nacional de meteorologia – INMET não dispõe de estações de monitoramento em todos os municípios.

4.2 Obtenção das amostras

As amostras de *E. coelomaticum* foram obtidas a partir de bovinos abatidos e devidamente inspecionados no frigorífico matadouro regional situado no município de Campo Belo – MG. O abatedouro regional de Campo Belo é responsável pelo sacrifício e inspeção de bovinos provenientes de diferentes municípios da região sul de Minas Gerais, dentre eles as cidades objeto deste estudo conforme se pode observar na Figura 7. Foram coletadas formas adultas junto ao pâncreas durante a inspeção *post-mortem*. Os pâncreas foram acondicionados em sacos plásticos individuais, onde cada animal foi identificado. Foi registrado em uma planilha a idade, cidade de origem, nome da propriedade, sexo, escore de condição corporal, raça e o dia da coleta. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (DMV-UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram coletadas no segundo semestre do ano de 2016.

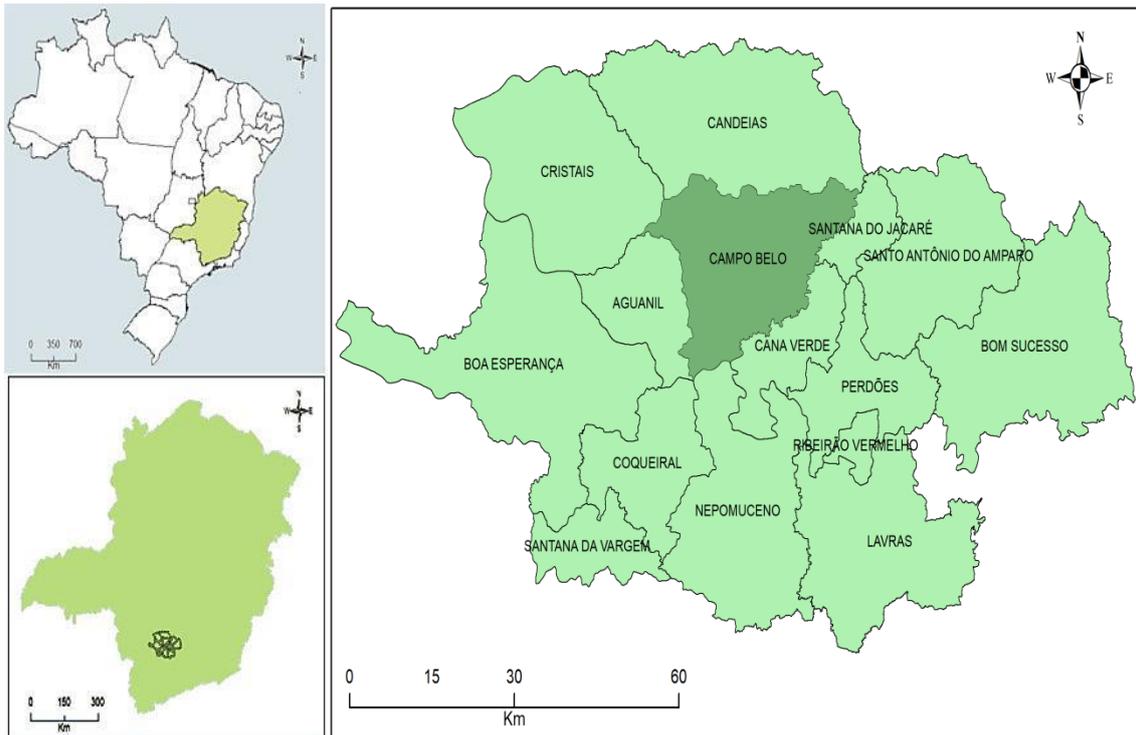


Figura 7. Mapa do Brasil evidenciando a localização do município de Campo Belo, onde está situado o frigorífico matadouro e as cidades atendidas por este.

Ilustração: Fidelis Antônio da Silva Júnior

4.3 Preparação das amostras e exames microscópicos

O primeiro procedimento para avaliação das amostras de *E. coelomaticum* foi a análise macroscópica dos órgãos bovinos. Os pâncreas foram lavados individualmente dentro de uma bacia com solução salina a 0,9%, para que os exemplares de *E. coelomaticum* soltos pudessem ser recuperados após a passagem da solução retida no recipiente por peneiras de nylon com malha de 150 μm . Posteriormente, foram realizados cortes transversais e longitudinais nos pâncreas bovinos com o objetivo de averiguar a presença ou ausência dos parasitos.

4.3.1 Microscopia de luz (campo claro)

Para os estudos de microscopia de luz (campo claro) os espécimes foram lavados em solução fisiológica (0,9%), colocados entre duas lâminas e

foram levemente pressionados para a manutenção de sua forma original. Posteriormente fixados em AFA (solução de Etanol a 70%, Formalina a 37% e Ácido Acético Glacial, na proporção de 95:3:2) e logo após a fixação foram corados com carmim e observados em microscópio de luz no Laboratório de Biologia Parasitária da Universidade Federal de Lavras (BIOPAR - UFLA). A coloração foi realizada conforme Amato et al. (1991). Em resumo a técnica consiste em colocar a amostra em álcool 70% por 15 minutos antes de corar com o carmim clorídrico (10 minutos). Após este processo as amostras foram desidratadas em série crescente por etanol (70, 80, 90 e 100% ambas por 10 minutos), clarificados com cresoto de Faia e finalmente montados em lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá.

Procedeu-se a mensuração dos seguintes parâmetros (n= 291 exemplares): comprimento e largura totais, tamanho da faringe, ovário e testículo, distância entre as ventosas oral e ventral e a distância entre a ventosa ventral e a porção final posterior (poro excretor). Essas medições foram realizadas por meio do estereomicroscópio trinocular Motic SMZ 168 e do microscópio Motic BA 310 ambos acoplados a câmera Moticom 5.0 MP integrados ao software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group Co LTD). As demais amostras não utilizadas para microscopia foram depositadas no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA em frascos contendo álcool 70%.

4.3.1.1 Avaliação dos ovos através de software

Para avaliação e contagem de ovos utilizou-se o software ImageJ (National Institutes of Health, USA), o qual usa um conjunto de imagens obtidas através de qualquer tipo de microscopia (por exemplo, microscopia de luz, de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura, transmissão, etc). Uma das vantagens do processamento de imagens digitais é a obtenção de informações e parâmetros que possibilitam a descrição, análise e interpretação das imagens ou entendimento da cena pelo computador.

Em resumo, o programa trabalha da seguinte maneira: primeiramente, o plugin determina os objetos de interesse na imagem e cria uma figura binária. Plugins são programas de computador usados para adicionar funções a outros

programas maiores, provendo alguma funcionalidade especial ou muito específica. Com o plugin deste software foi mensurada a área total de cada ovo. Os objetos de interesse foram marcados na imagem com pixels pretos em um fundo branco. Dentro do programa o usuário pode selecionar uma das opções pré-definidas e escolher quais análises serão realizadas, como por exemplo, a medição da área total da figura, a criação de mapas com as distâncias entre as estruturas, entre outras análises (Figura 8).

Para separar o útero do animal nas imagens foi utilizada uma ferramenta de criação de vetores no software Gimp 2.8 (GNU Image Manipulation Program Open Source), e desta forma foi possível calcular o tamanho do órgão através de criação de uma imagem secundária com as mesmas quantidades de pixels da imagem original.

A partir deste dado foi possível estimar o número de ovos por mm^2 , adaptando as metodologias utilizadas por Mains et al. (2008), Mandarim de Lacerda (2010) e Rosati et al., (2015), criando assim uma estimativa do número total de ovos presentes em um indivíduo adulto. Para tal cálculo foi considerada a área total do parasito, a área total correspondente ao útero e a quantidade média de ovos por mm^2 . Para mensurar o tamanho médio total da área de indivíduos adultos, dos seus respectivos úteros e do tamanho médio dos ovos, foi realizada uma média aritmética com base em 10 imagens.

Foram realizadas contagens manuais do número de ovos com intuito de averiguar a acurácia do programa utilizado neste estudo. As imagens possuíam uma mesma área (em micrômetros) e os valores foram extrapolados para mm^2 , através de uma regra de três simples. A área usada para contagem dos ovos pelo software ImageJ possuía $230 \times 170 \mu\text{m}$ (totalizando $0,0391 \text{ mm}^2$) e as imagens usadas para contagem manual possuíam uma área de $790 \times 593 \mu\text{m}$ (perfazendo $0,468 \text{ mm}^2$). Para facilitar a contagem de ovos manualmente as imagens selecionadas foram divididas em grids e estes foram numerados de 1 a 7 nas colunas e de “A” a “E” nas linhas (Figura 9).

No programa ImageJ, todas as imagens capturadas através do microscópio e medidas com o software Images Plus 2.0 foram convertidas em imagens de escala de cinza. Posteriormente, a função “limiar” foi utilizada para melhorar o contraste das estruturas a serem analisadas em relação ao plano

de fundo. Após o uso da função “limiar”, se houvesse algum “ruído” residual na imagem (material que não estava sendo avaliado), este foi removido usando o software Gimp 2.8. Para a delimitação entre um objeto e outro, utilizou-se a ferramenta watershed. A área total do parasita, útero e ovos foi medida usando as ferramentas: Medir ou Analisar Partículas. O processo de binarização, medição e contagem dos itens avaliados neste trabalho podem ser visualizados nas figuras 8 e 10.

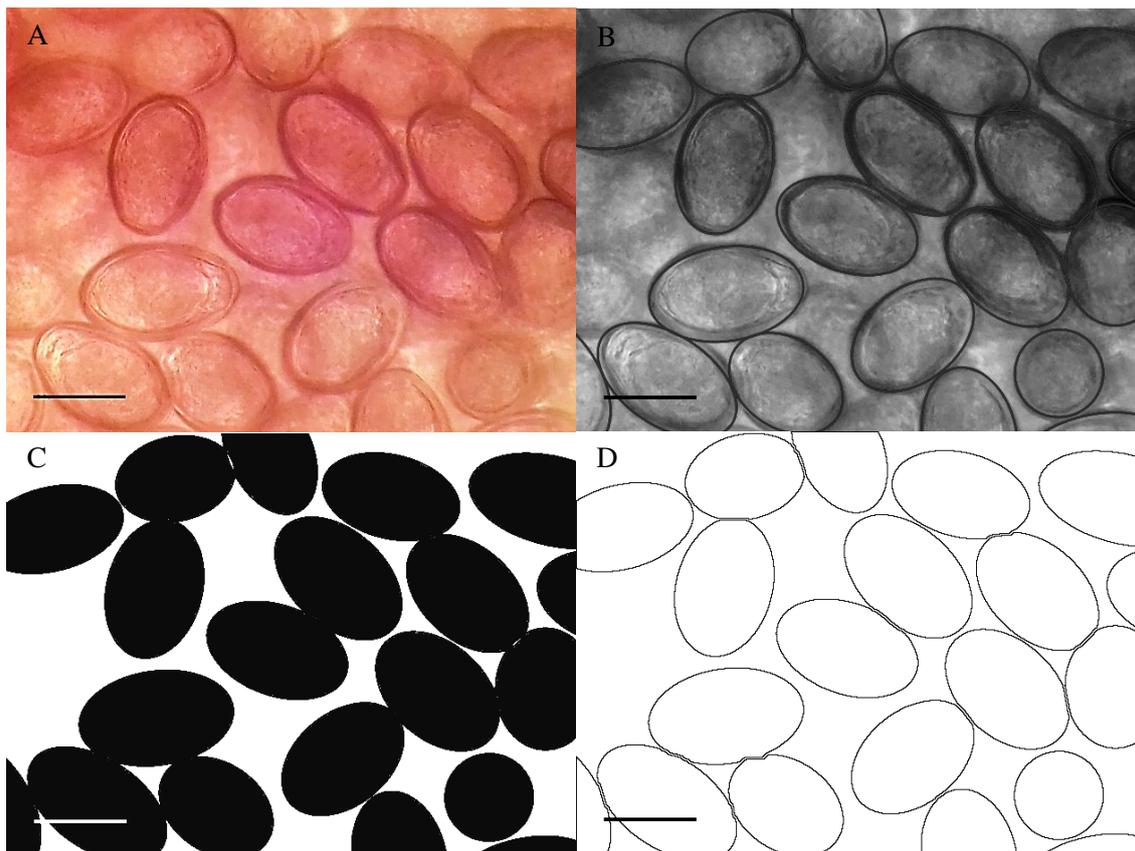


Figura 8. Demonstração de uma das funcionalidades do software ImageJ (NIH, USA). Barra de escala = 0,03 mm.

Legenda: [A] Imagem original. Consta de uma foto de microscopia de luz (campo claro) de ovos de *E. coelomaticum*. [B] Fase “2” da análise de área e contagem de estruturas. Nesta etapa existe o “reconhecimento” das estruturas por parte do software. Representa o processo de binarização da imagem. [C] Terceira etapa da análise: corresponde à “segmentação”, ou seja, é a criação de uma segunda imagem binária. [D] Processo de análise de imagens, corresponde a transformação da imagem binária artificial para segmentos de

linha com a capacidade de contagem da área total da amostra, bem como a área específica de uma das estruturas ou de todas ao mesmo tempo.

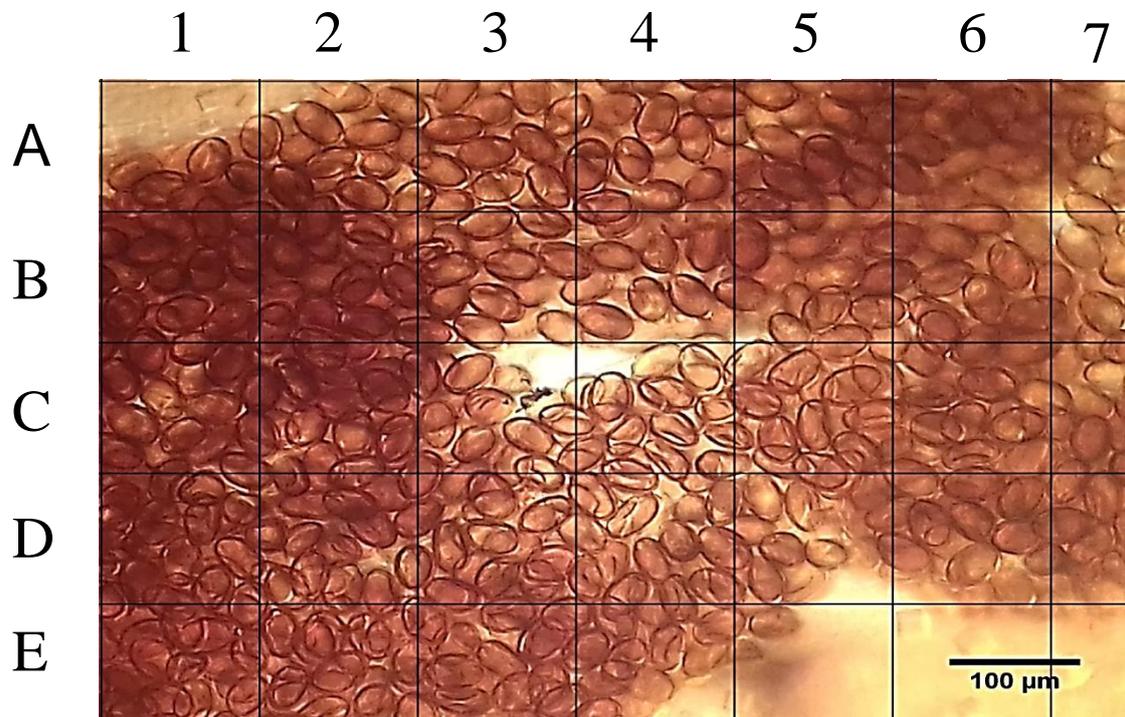


Figura 9. Processo de contagem manual de ovos de *E. coelomaticum* provenientes do sul de Minas Gerais, Brasil. Consta de uma foto de microscopia de luz (campo claro) de ovos de *E. coelomaticum*. Foram estabelecidos grids para facilitar a contagem através de quadrantes.

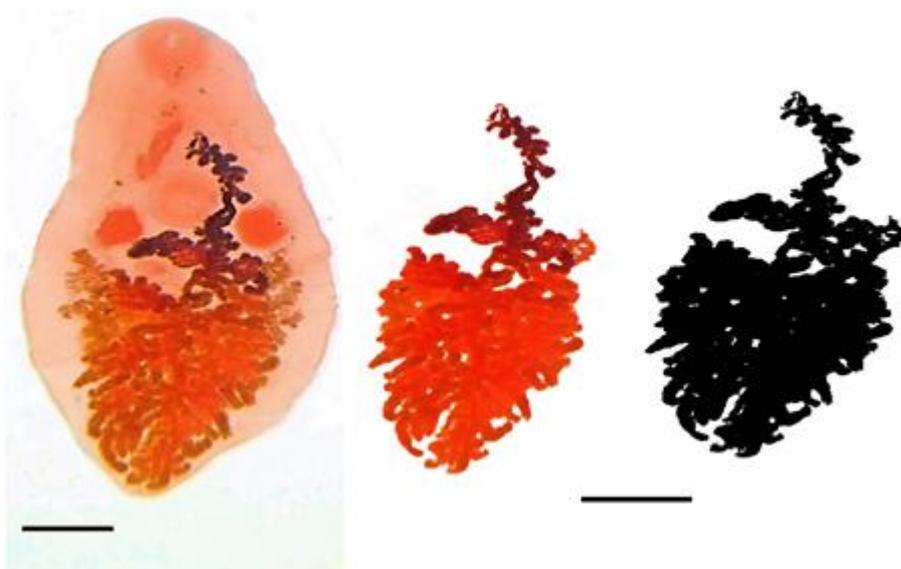


Figura 10. Processo de binarização para calcular tamanho da área do útero de *E. coelomaticum*. Barra de escala = 1mm.

Para realizar a estimativa do número mínimo de ovos presentes em úteros de indivíduos adultos foram usadas três metodologias, sendo a primeira pela contagem de ovos inteiros visualizados no campo. No segundo processo para estimar o número de ovos, foram consideradas as áreas de todas as estruturas visíveis e com delimitação clara. Posteriormente foi realizada a divisão da área do útero pela área de ocupação dos ovos na luz do órgão, e finalmente a terceira metodologia foi uma extrapolação da área de ocupação dos ovos na luz do útero considerando uma taxa de ocupação integral (100%).

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura conforme descrito anteriormente por Lopes-Torres et al. (2013). Para obtenção dos ovos foram realizados cortes longitudinais nos parasitos entre a ventosa ventral e o poro excretor. Posteriormente os espécimes foram colocados em uma placa de petri com solução salina e em seguida colocadas em um agitador. A solução foi recuperada e centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos.

Em relação ao processo de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os trematódeos e os ovos foram fixados em solução de Karnovsky (que consiste de paraformaldeído a 4%, hidróxido de sódio a 1 M, glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio a 0,1M pH 7,2) pelo período mínimo de 24 horas. Depois de retirados do fixador os exemplares foram lavados três vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), com intervalos regulares de 10 minutos entre as lavagens. Posteriormente as amostras foram desidratadas em série crescente com acetona (25, 50, 75, 90 e 100%); sendo a última série realizada por mais duas vezes, totalizando sete. Em seguida foram secadas em ponto crítico com CO₂ (CPD 030 - Bal-Tec). Posteriormente as amostras foram montadas em “stub” e revestidas com ouro usando o evaporador de ouro SDC 050 (Bal-Tec), e examinadas usando o microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP (Carl Zeiss).

A preparação das amostras para microscopia eletrônica foi realizada no laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da UFLA. As imagens foram geradas e capturadas digitalmente,

nas condições de trabalho de 20 kV. Foi utilizado o Software GIMP 2.8 no preparo e tratamento das imagens apresentadas neste estudo.

4.4 SDS- PAGE de proteínas do tegumento

Foi realizado um procedimento para estimar o peso molecular das proteínas mais abundantes no tegumento dos parasitos. Para tanto os exemplares foram colocados em tampão salino (PBS) com inibidores de proteases em tubos do tipo Falcon e submetidos a agitação no vórtex por cinco minutos. A solução de PBS + inibidores estava fria (4°C) para evitar a expressão e liberação de produtos excretórios/secretórios do animal. Os trematódeos foram retirados do tubo e a solução contendo o extrato proteico foi mantida a -20°C por uma hora conforme metodologia proposta por Morales & Espino (2012). Após retirada do congelador a amostra foi centrifugada por cinco minutos a 3500 rpm. Os elementos celulares foram separados por densidade de gradiente de centrifugação. O extrato proteico foi analisado por eletroforese SDS-PAGE conforme Laemmli (1970), em gel a 15% de concentração. Posteriormente foram corados por Coomassie brilliant blue R- 250. A utilização dessa metodologia se aplica para a construção de um eletroforetograma proteico onde é possível verificar as proteínas com diferentes massas molares. Nas corridas eletroforéticas, foram aplicados 5, 10 e 15 µL do extrato proteico das amostras na concentração de 2,63 µg/µL. Os marcadores de baixa massa molar (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) usados foram (em KDa): 97 fosforilase b, 66 albumina, 45 ovoalbumina, 30 anidrase carbônica), 20,1 inibidor de tripsina e 14,4 α- lactoalbumina.

4.5 Análises estatísticas

Realizou-se análise descritiva das variáveis do estudo para verificação se a distribuição dos dados possuía caráter normal. A prevalência de parasitos foi calculada de acordo com Bush et al. (1997). Posteriormente foram realizados testes de associação entre a variável dependente, presença de *E. coelomaticum* em pâncreas bovinos, que foi categorizada dicotomicamente como positivo ou negativo, comparando-as com as demais variáveis do estudo

(sexo, idade, raça predominante e escore de condição corporal). Para isso foi realizado o teste qui-quadrado ou Exato de Fisher e aquelas variáveis que demonstraram associação ($p < 0,05$) passaram pela análise de variância – ANOVA (variáveis paramétricas) e Kruskal Wallis (para as não paramétricas). Foi aplicado o teste T pareado para comparar o número de ovos observados através de contagem manual e pelo software. Foram realizadas correlações (correlação de Pearson) entre a área do útero e a área corpórea total, e entre o número de ovos observados pela contagem manual e pelo software. O patamar de significância de 5% foi utilizado para ambos os casos.

5 RESULTADOS

5.1 Condições climáticas

Foram observadas variações nos volumes das chuvas nos dois anos antecedentes a este estudo, bem como no ano das coletas conforme se pode observar nas figuras 11, 12 e 13.

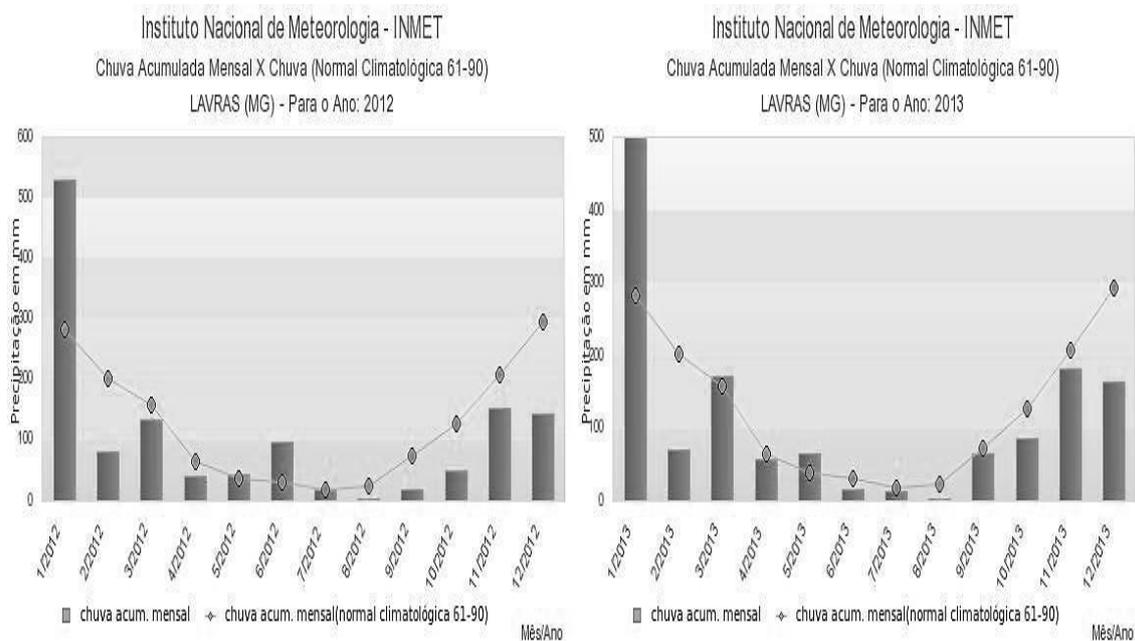


Figura 11. Distribuição pluviométrica realizada pelo Instituto Nacional de Meteorologia - INMET da cidade de Lavras, Minas Gerais nos anos de 2012 e 2013 respectivamente, em comparação com a série histórica para a região entre os anos de 1960 e 1990.

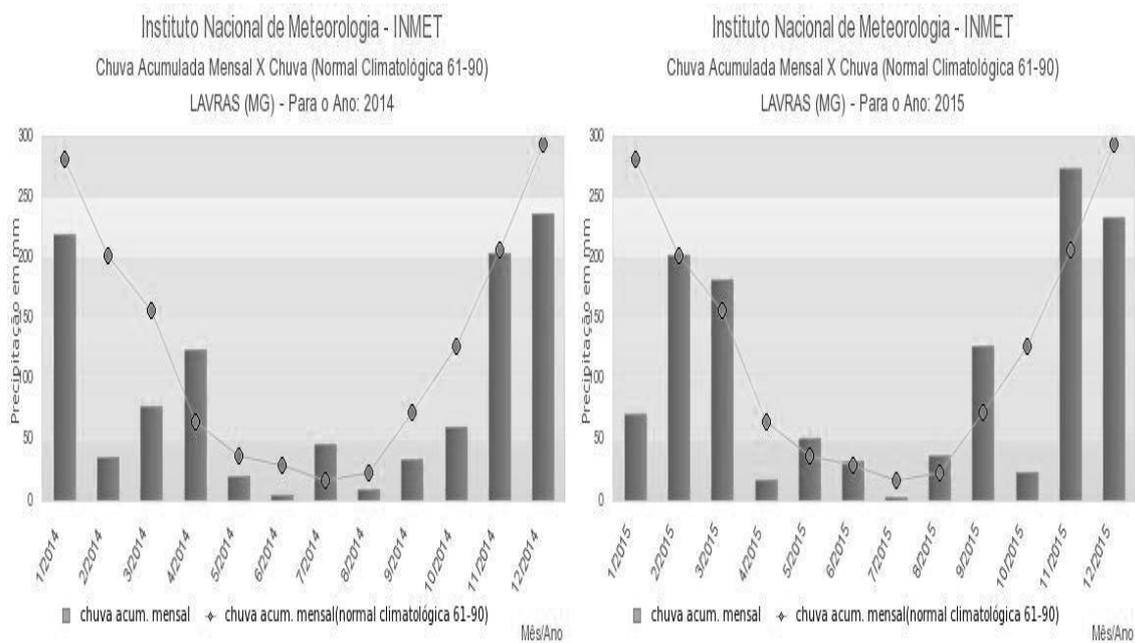


Figura 12. Distribuição pluviométrica realizada pelo Instituto Nacional de Meteorologia - INMET na cidade de Lavras, Minas Gerais nos anos de 2014 e 2015 respectivamente, em comparação com a série histórica para a região entre os anos de 1960 e 1990.

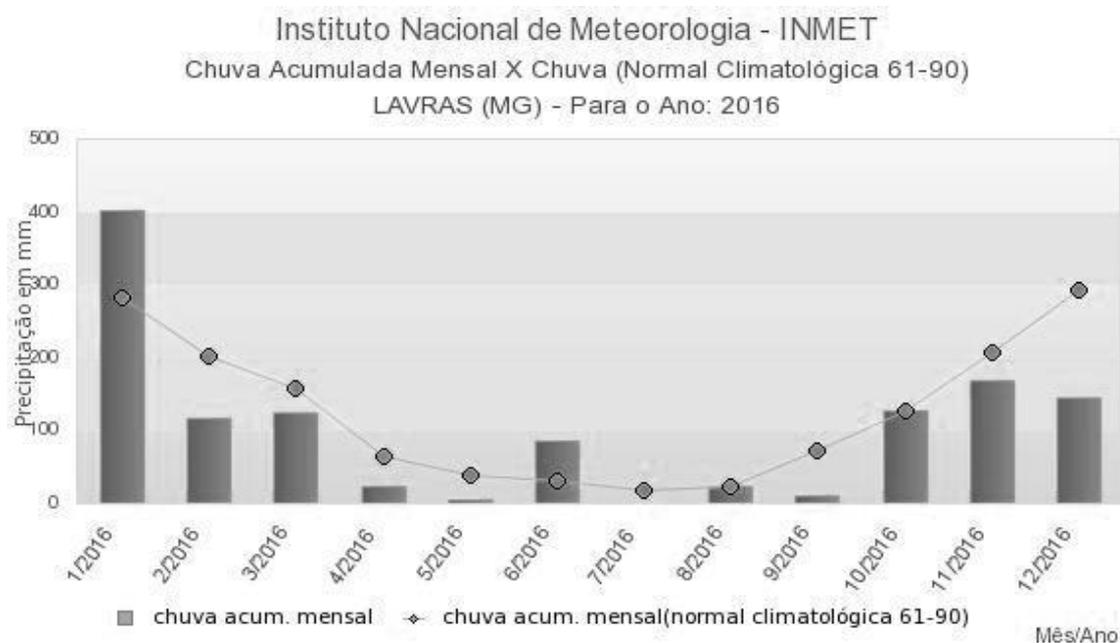


Figura 13. Chuva acumulada mensal durante o ano de 2016 no município de Lavras – MG, e curva normal climatológica de chuva esperada para a região de acordo com as médias mensais entre os anos de 1960 e 1990.

5.2 Ocorrência de *E. coelomaticum*

No total foram coletados 469 pâncreas bovinos. A quantidade de órgãos parasitados ou não e os respectivos municípios de origem estão descritos na tabela 3. É possível verificar ainda na tabela o percentual que cada município representa considerando o número amostral total estudado.

Tabela 3. Valores absolutos e percentuais de ocorrência de animais infectados e sadios de acordo com o município de origem.

Cidade	Meso.	Negativo	Positivo	Prevalência	
				(%)	PR*(%)
Aguanil	7	18	4	18,2	4,7
Boa Esperança	8	28	7	20,0	7,5
Bom Sucesso	7	34	4	10,5	8,1
Campo Belo	7	57	7	10,9	13,6
Cana Verde	7	15	8	34,8	4,9
Candeias	7	16	9	36,0	5,3
Coqueiral	8	14	5	26,3	4,1
Cristais	7	18	3	14,3	4,5
Lavras	1	60	24	28,6	17,9
Nepomuceno	1	11	24	68,6	7,5
Perdões	7	14	0	0,0	3,0
Ribeirão Vermelho	1	23	0	0,0	4,9
Santana da Vargem	8	25	0	0,0	5,3
Santana do Jacaré	7	21	2	8,7	4,9
Santo Antônio do Amparo	8	18	0	0,0	3,8
Total	NA	372	97	20,7	100,0

Meso. = corresponde às mesorregiões descritas na Figura 6. PR= Percentual representativo do município em relação ao número total de animais avaliados (n=469) independentemente se foram positivos ou negativos. NA = não se aplica

A prevalência total de animais parasitados por *E. coelomaticum* foi de 20,7% (97 de 469 amostras). Considerando cada cidade isoladamente, Nepomuceno foi a que apresentou o maior número de animais infectados em relação ao número total de espécimes avaliados por localidade, correspondendo a 68,6% (24 de 35 pâncreas), seguido por Candeias com 36%, Cana Verde com 34,8% e Lavras com 28,6% de positividade. A menor taxa de animais parasitados se deu no município de Santana do Jacaré com 8,7%. É

importante destacar que na cidade de Nepomuceno houve uma propriedade que apresentou 100% dos seus animais infectados (n= 23). Por outro lado deve se ressaltar que quatro dos quinze municípios estudados não apresentaram animais infectados.

A média de idade das 469 amostras analisadas foi de 3,21 anos com desvio padrão de 1,18 anos. A média de idade dos animais negativos foi de 3,13 anos (desvio padrão 1,13) e dos animais positivos foi de 3,54 (desvio padrão 1,29). Na tabela 4 é possível verificar o percentual de animais positivos e negativos para *E. coelomaticum* de acordo com a faixa etária dos bovinos. É possível verificar que a proporção de animais infectados em relação aos animais sadios é menor entre os mais jovens (com dois e três anos) variando entre 14,37% e 17,21%. Já a partir do quarto ano de vida estes valores sobem para 31,32%, 29,41% e 32,35% respectivamente (tabela 4). De acordo com o teste de variância ANOVA ($p = 0,0020$) é possível inferir que a proporção de animais doentes aumenta após 3,54 anos.

Tabela 4. Percentual de animais positivos e negativos de acordo com a faixa etária

Status do animal (%)	Idade*				
	2	3	4	5	6 ou +
Positivos	17,21 ^a	14,37 ^a	31,32 ^b	29,41 ^b	32,35 ^b
Negativos	82,79 ^a	85,63 ^a	68,68 ^b	70,59 ^b	67,65 ^b
Total	100	100	100	100	100

*Correspondem a anos de vida. Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

Para facilitar as análises estatísticas os diferentes escores de condição corporal foram agrupados em três categorias. Sendo a categoria A correspondente aos escores 2,3 e 4 que englobam os animais debilitados até o limite onde os animais são considerados magros, categoria B, escores 5, 6 e 7, que correspondem aos animais com quantidade de carne variando entre moderada e boa e baixa quantidade de gordura, sendo animais ideais para o abate. E finalmente a categoria C com os escores 8 e 9, onde os animais possuem grande quantidade de gordura sendo classificados como gordos ou

extremamente gordos. Uma vez agrupados foi possível verificar que existe associação entre os escores mais baixos (categoria A) e a presença de *E. coelomaticum* com o valor de $p < 0,05$.

Pode-se observar na tabela 5 os percentuais de animais positivos e negativos bem como a classificação dos mesmos quanto aos escores de condição corporal.

Tabela 5. Número de animais positivos e negativos e seus respectivos escores corporais

Status do animal (%)	Escore de condição corporal							
	2	3	4	5	6	7	8	9
Positivos	88,5	87,5	100,0	13,0	1,1	0,0	12,4	6,3
Negativos	11,5	12,5	0,0	87,0	98,9	100	87,6	93,8
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

Considerando cada escore isoladamente o que apresentou a maior taxa de animais positivos foi o escore quatro com 100%, seguido pelo escore dois com 88,5%, e pelo escore três com 87,5% de seus animais infectados.

Na tabela 6 são descritos os valores de parasitismo encontrados nos rebanhos bovinos avaliados de acordo com a raça predominante.

Tabela 6. Valores encontrados de bovinos parasitados de acordo com a raça predominantemente declarada.

Status do animal (%)	Raça predominante		
	Europeia	Indiana	Mestiça
Positivos	9,5 ^a	20,1 ^b	25,3 ^b
Negativos	90,5 ^a	79,9 ^b	75,5 ^b
Total	100	100	100

Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

Foi observado que de acordo com a análise estatística aplicada, existe associação entre o número de animais infectados e a raça predominante ($p < 0,05$). É possível verificar uma tendência dos animais mestiços e de origem indiana apresentarem taxas proporcionais de infecção maiores dos que os animais de origem europeia.

Não houve associação entre o sexo dos animais e a ocorrência de *E. coelomaticum* com nível de significância de 5%. Nos gráficos 1 e 2 é possível ver a comparação do número de animais positivos e negativos de acordo com o gênero e cidade de origem.

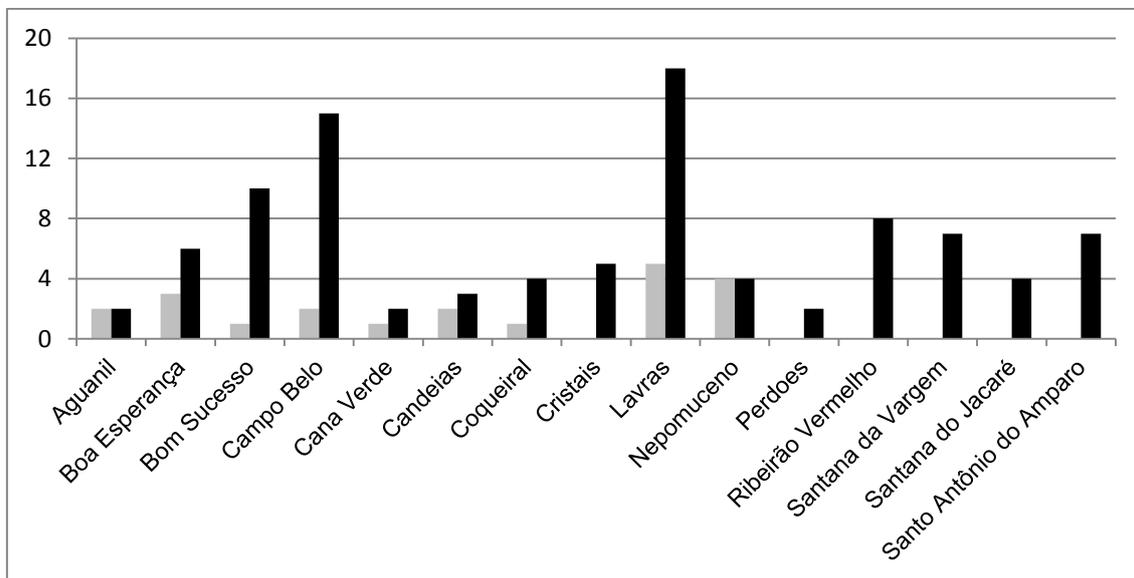


Gráfico 1. Fêmeas de gado bovino provenientes do matadouro de Campo Belo, Minas Gerais. Comparação do número de animais avaliados de acordo com as localidades de origem e número de indivíduos parasitados e sadios. Barras em preto são animais negativos e barras em cinza são animais positivos.

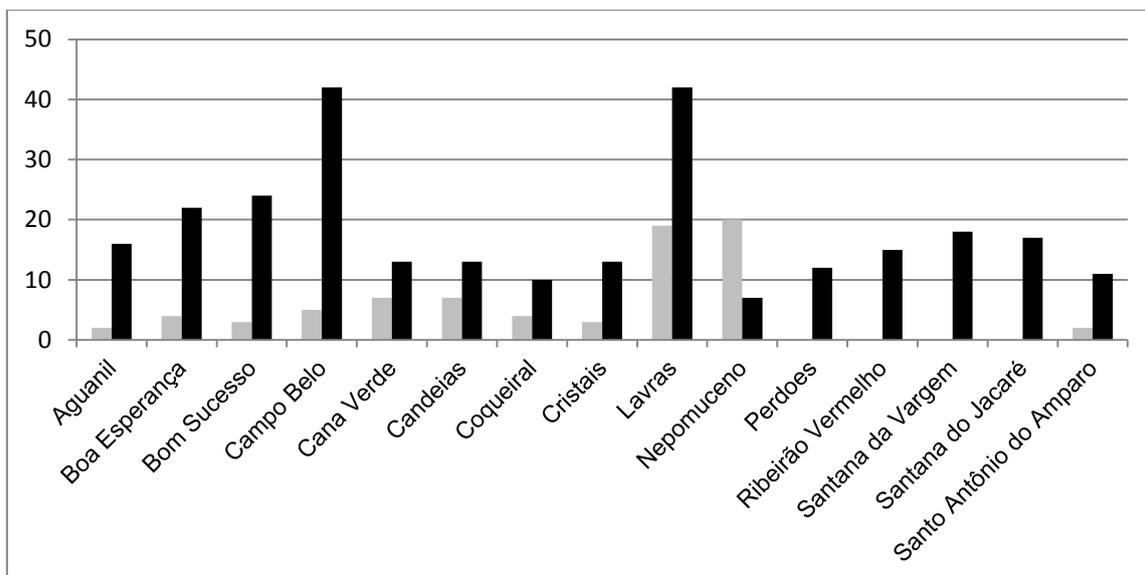


Gráfico 2. Machos de gado bovino provenientes do matadouro de Campo Belo, Minas Gerais. Comparação do número de animais avaliados de acordo com as

localidades de origem e número de indivíduos parasitados e sadios. Barras em preto são animais negativos e barras em cinza são animais positivos.

5.3 Morfometria

5.3.1 Microscopia de luz (campo claro)

A morfometria foi baseada em 291 exemplares coletados nos ductos pancreáticos provenientes de no mínimo de dois animais por localidade, totalizando 26 bovinos. Os espécimes apresentaram corpo achatado, fusiforme ou oval, sem estruturas como ganchos ou espinhos. O tegumento do corpo apresentou-se predominantemente liso, e os animais apresentaram comprimento médio de 8,79 mm ($\pm 0,98$) e largura média 4,39 ($\pm 0,69$), conforme a tabela 7.

Tabela 7. Média de comprimento e largura de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem das amostras.

Cidade	Nº	Compr.	DP	Min-Max	Larg.	DP	Min-Max
Aguanil	27	8,65	0,98	7,3-10,1	4,14	0,46	3,5-4,8
Boa Esperança	26	8,90	0,94	7,3-10,3	4,26	0,44	3,5-4,8
Bom Sucesso	22	8,81	0,83	7,3-10,0	4,34	0,37	3,5-4,8
Campo Belo	28	8,99	0,88	7,3-10,4	4,57	0,45	3,7-5,1
Cana Verde	22	8,82	0,91	7,3-10,1	4,51	0,45	3,7-5,1
Candeias	24	9,08	0,81	7,3-10,5	5,07	0,46	4,1-5,6
Coqueiral	25	8,80	1,11	7,3-10,0	4,93	0,63	4,1-5,6
Cristais	27	8,70	1,20	7,0-10,0	5,01	0,80	3,9-5,7
Lavras	34	8,60	0,97	7,0-10,0	4,36	0,87	3,2-6,2
Nepomuceno	34	8,82	1,08	7,0-10,2	4,01	0,50	3,2-4,6
Santana do Jacaré	22	8,52	0,99	7,0-10,0	3,83	0,43	3,2-4,5
Valores médios	26	8,79	0,98	7,0-10,5	4,39	0,69	3,2-6,2

Compr. = comprimento total. Larg. = largura total. DP = desvio padrão; Min. e Máx. = valores mínimo e máximo da medida. Nº = número de espécimes de *E. coelomaticum* avaliados. Todas as medidas são em milímetros.

A relação entre o comprimento e largura corporal variou entre 1,74 e 2,22 mm, possuindo uma média de 1,99 mm. O gráfico 3 ilustra a comparação destes parâmetros de acordo com a cidade de origem da amostra.

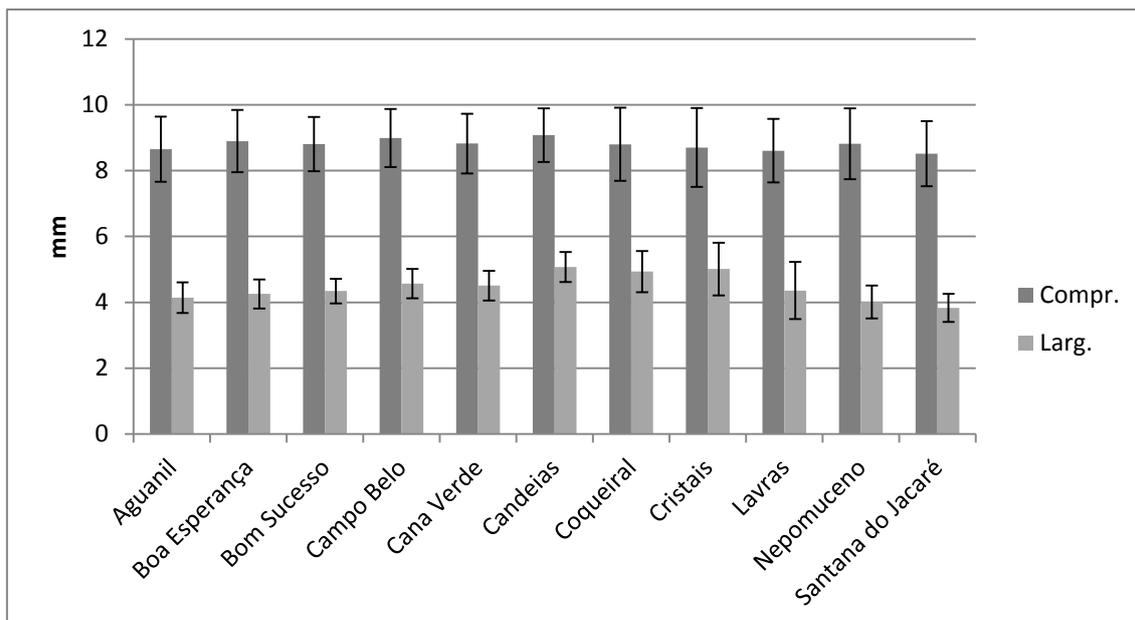


Gráfico 3. Comparação do comprimento e da largura de exemplares de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem.

Legenda: Compr.= comprimento; Larg.= largura.

Os animais apresentaram duas ventosas, sendo a oral localizada na região anterior do corpo, sub-terminal, e a ventral situada na região mediana do corpo. Os testículos estavam localizados posteriormente à ventosa ventral e situados praticamente paralelos. O ovário apresentou-se submediano logo abaixo dos testículos e finalmente, o útero e vitelinos são sinuosos, conforme se pode observar na Figura 14.

A ventosa oral é muscular, com comprimento entre 0,50 – 0,95 mm (média de 0,74 mm) por 0,51 – 0,96 mm de largura (média de 0,75 mm). A ventosa ventral apresentou comprimento entre 0,51 – 0,97 mm (média de 0,76 mm) por 0,52 – 0,98 mm (média de 0,76 mm de largura), conforme se pode averiguar na tabela 8. A relação entre as ventosas foi de 1:1,02 em média. Os cecos intestinais são bifurcados, delgados e sinuosos com terminação a 0,5 mm do final da parte posterior do animal. Bolsa do cirro disposta entre o início da bifurcação do ceco e a ventosa ventral. Faringe curta, com formato arredondado com comprimento médio de 0,25 mm (variação entre 0,20 e 0,29 mm) e largura média de 0,22 mm (variação entre 0,18 e 0,26 mm). Folículos vitelínicos distribuídos nas laterais próximos a região mediana do corpo. Ovário em formato arredondado, alongado pós-testicular com dimensão média de

comprimento de 0,32 mm (variação entre 0,14 e 0,39 mm) e largura de 0,37 mm (variação entre 0,16 e 0,45 mm), conforme se pode observar na tabela 9. Testículo na mesma linha horizontal da ventosa ventral ou pós acetabular com tamanho médio de 0,72 mm por 0,66 mm de comprimento e largura, respectivamente.

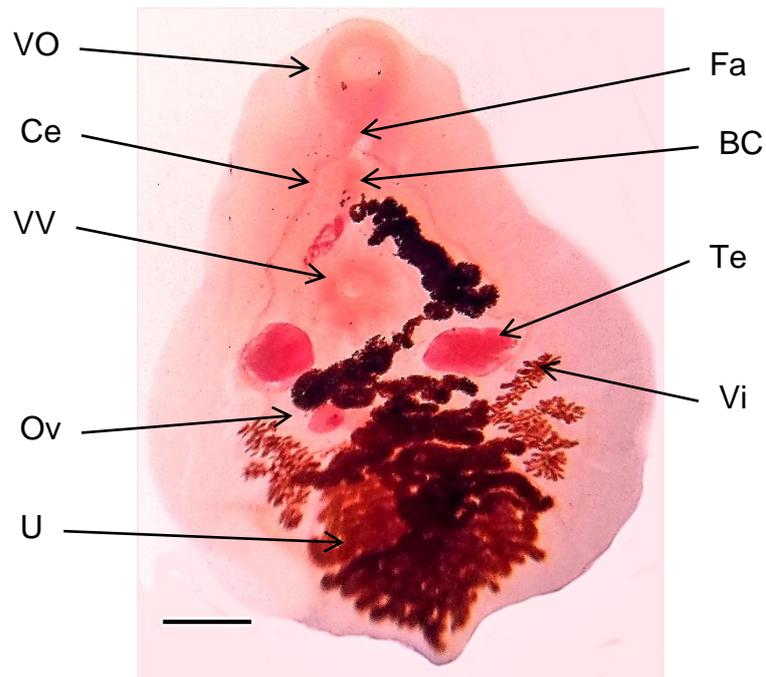


Figura 14. Microscopia de luz (campo claro) de *E. coelomaticum* proveniente de bovinos abatidos no sul de Minas Gerais, indicando a ventosa oral (VO), ceco (Ce), ventosa ventral (VV), ovário (Ov), útero (U), faringe (Fa), bolsa do cirro (BC), testículos (Te) e vitelinos (Vi); barra de escala: 0,5 mm.

Tabela 8. Média de comprimento e largura de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem das amostras.

Cidade	Nº	Cvo	Min-Máx	Lvo	Min-Máx	Covv	Min-Max	Lavv	Min-Máx
Aguanil	27	0,78± 0,09	0,62-0,91	0,81± 0,08	0,63-0,92	0,81± 0,09	0,63-0,93	0,83± 0,08	0,64-0,94
Boa Esperança	26	0,73± 0,08	0,61-0,93	0,74± 0,08	0,62-0,94	0,75± 0,08	0,63-0,95	0,76± 0,08	0,63-0,96
Bom Sucesso	22	0,80± 0,08	0,62-0,92	0,81± 0,09	0,63-0,93	0,82± 0,09	0,63-0,94	0,83± 0,09	0,64-0,95
Campo Belo	28	0,74± 0,10	0,60-0,93	0,76± 0,10	0,61-0,94	0,76± 0,10	0,61-0,95	0,77± 0,10	0,62-0,96
Cana Verde	22	0,77± 0,10	0,57-0,95	0,79± 0,10	0,58-0,96	0,79± 0,11	0,58-0,97	0,80± 0,11	0,59-0,98
Candeias	24	0,73± 0,12	0,50-0,92	0,74± 0,12	0,51-0,93	0,75± 0,13	0,51-0,94	0,76± 0,13	0,52-0,95
Coqueiral	25	0,73± 0,15	0,51-0,92	0,74± 0,15	0,52-0,93	0,75± 0,16	0,52-0,94	0,76± 0,16	0,53-0,95
Cristais	27	0,74± 0,14	0,54-0,92	0,75± 0,15	0,55-0,93	0,76± 0,15	0,55-0,94	0,77± 0,15	0,56-0,95
Lavras	34	0,74± 0,13	0,50-0,95	0,75± 0,13	0,51-0,96	0,76± 0,13	0,51-0,97	0,77± 0,14	0,52-0,99
Nepomuceno	34	0,70± 0,13	0,50-0,95	0,72± 0,13	0,51-0,96	0,72± 0,14	0,51-0,97	0,73± 0,14	0,52-0,98
Santana do Jacaré	22	0,69± 0,18	0,54-0,93	0,70± 0,18	0,55-0,94	0,71± 0,19	0,55-0,95	0,72± 0,19	0,56-0,96
Valores médios	26	0,74± 0,12	0,50-0,95	0,75± 0,12	0,51-0,96	0,76± 0,12	0,51-0,97	0,76± 0,12	0,52-0,99

Nº = número de espécimes de *E. coelomaticum* avaliados. Cvo = comprimento da ventosa oral. Lvo = largura da ventosa oral. Covv = comprimento da ventosa ventral. Lavv = largura da ventosa ventral. Min = valor mínimo encontrado para o parâmetro avaliado. Máx = valor máximo encontrado para o parâmetro avaliado. Todas as medidas são em milímetros.

Tabela 9. Valores registrados de alguns parâmetros morfométricos de espécimes adultos de *E. coelomaticum* da região sul do estado de Minas Gerais, Brasil.

Cidade	Nº	VO-VV	Min-Máx	VV-PE	Min-Máx	CF	Min-Máx	LF	Min-Máx
Aguanil	27	2,18± 0,27	1,81-2,55	6,52± 0,73	5,52-7,52	0,24± 0,029	0,20-0,29	0,22± 0,027	0,18-0,26
Boa Esperança	26	2,23± 0,25	1,80-2,54	6,69± 0,69	5,53-7,54	0,25± 0,023	0,21-0,29	0,22± 0,028	0,18-0,26
Bom Sucesso	22	2,22± 0,24	1,83-2,51	6,64± 0,62	5,54-7,53	0,23± 0,023	0,20-0,27	0,22± 0,027	0,18-0,26
Campo Belo	28	2,23± 0,24	1,80-2,53	6,76± 0,64	5,51-7,51	0,25± 0,026	0,20-0,29	0,22± 0,027	0,18-0,26
Cana Verde	22	2,22± 0,25	1,84-2,52	6,65± 0,68	5,51-7,52	0,25± 0,024	0,21-0,29	0,21± 0,027	0,18-0,26
Candeias	24	2,28± 0,21	1,83-2,52	6,83± 0,58	5,55-7,55	0,24± 0,028	0,20-0,29	0,23± 0,022	0,18-0,26
Coqueiral	25	2,21± 0,30	1,85-2,52	6,63± 0,83	5,52-7,54	0,23± 0,025	0,20-0,29	0,22± 0,030	0,18-0,26
Cristais	27	2,27± 0,36	1,81-2,67	6,76± 1,06	5,32-7,72	0,23± 0,015	0,21-0,25	0,22± 0,026	0,18-0,25
Lavras	34	2,22± 0,29	1,82-2,66	6,61± 0,87	5,31-7,74	0,25± 0,028	0,20-0,29	0,22± 0,024	0,18-0,26
Nepomuceno	34	2,24± 0,28	1,84-2,63	6,68± 0,84	5,32-7,73	0,25± 0,026	0,20-0,29	0,22± 0,024	0,18-0,26
Santana do Jacaré	22	2,15± 0,23	1,81-2,52	6,38± 0,72	5,33-7,75	0,23± 0,029	0,20-0,28	0,23± 0,021	0,20-0,26
Valores médios	26	2,23± 0,27	1,82-2,61	6,67± 0,78	5,32-7,74	0,25± 0,026	0,20-0,29	0,22± 0,025	0,18-0,26

Continua...

Nº = número de espécimes de *E. coelomaticum* avaliados. VO-VV= distância entre ventosa oral e ventral. VV-PE = distância entre a ventosa ventral e o poro excretor; CF= comprimento da faringe. LF = largura da faringe. Todas as medidas são em milímetros.

Continuação...

Cidade	Nº	CTe	Min-Máx	LTe	Min-Máx	CO	Min-Máx	LO	Min-Máx
Aguanil	27	0,71± 0,127	0,54-0,91	0,62± 0,090	0,50-0,79	0,33± 0,03	0,28-0,36	0,38± 0,034	0,32-0,45
Boa Esperança	26	0,74± 0,148	0,52-0,95	0,64± 0,085	0,52-0,78	0,31± 0,06	0,15-0,39	0,36± 0,075	0,18-0,45
Bom Sucesso	22	0,65± 0,134	0,51-0,88	0,67± 0,101	0,52-0,79	0,32± 0,03	0,28-0,36	0,37± 0,029	0,33-0,45
Campo Belo	28	0,69± 0,142	0,50-0,92	0,66± 0,095	0,53-0,80	0,24± 0,07	0,14-0,36	0,27± 0,083	0,16-0,42
Cana Verde	22	0,73± 0,131	0,50-0,95	0,67± 0,096	0,50-0,79	0,34± 0,03	0,29-0,39	0,39± 0,029	0,34-0,45
Candeias	24	0,76± 0,139	0,52-0,95	0,67± 0,091	0,50-0,80	0,33± 0,02	0,28-0,36	0,38± 0,026	0,33-0,42
Coqueiral	25	0,69± 0,105	0,52-0,88	0,66± 0,084	0,50-0,76	0,32± 0,03	0,28-0,36	0,38± 0,027	0,33-0,42
Cristais	27	0,73± 0,173	0,53-0,93	0,63± 0,096	0,51-0,75	0,32± 0,01	0,29-0,33	0,37± 0,015	0,34-0,39
Lavras	34	0,74± 0,132	0,51-0,95	0,65± 0,090	0,50-0,79	0,34± 0,03	0,28-0,39	0,39± 0,033	0,33-0,45
Nepomuceno	34	0,69± 0,134	0,50-0,94	0,65± 0,093	0,50-0,80	0,34± 0,03	0,28-0,39	0,39± 0,031	0,33-0,45
Santana do Jacaré	22	0,68± 0,139	0,52-0,88	0,72± 0,077	0,58-0,79	0,32± 0,04	0,28-0,39	0,37± 0,044	0,33-0,45
Valores médios	26	0,72± 0,136	0,50-0,95	0,66± 0,091	0,50-0,80	0,32± 0,045	0,14-0,39	0,37± 0,039	0,16-0,45

Nº = número de espécimes de *E. coelomaticum* avaliados. CTe = comprimento do testículo. LTe = largura do testículo. CO = comprimento do ovário. LO = largura do ovário. Todas as medidas são em milímetros.

A variação das médias entre as distâncias das ventosas não apresentou diferença significativa no teste de análise de variância. Os valores médios apresentaram se de forma relativamente homogênea conforme se pode observar no gráfico 4.

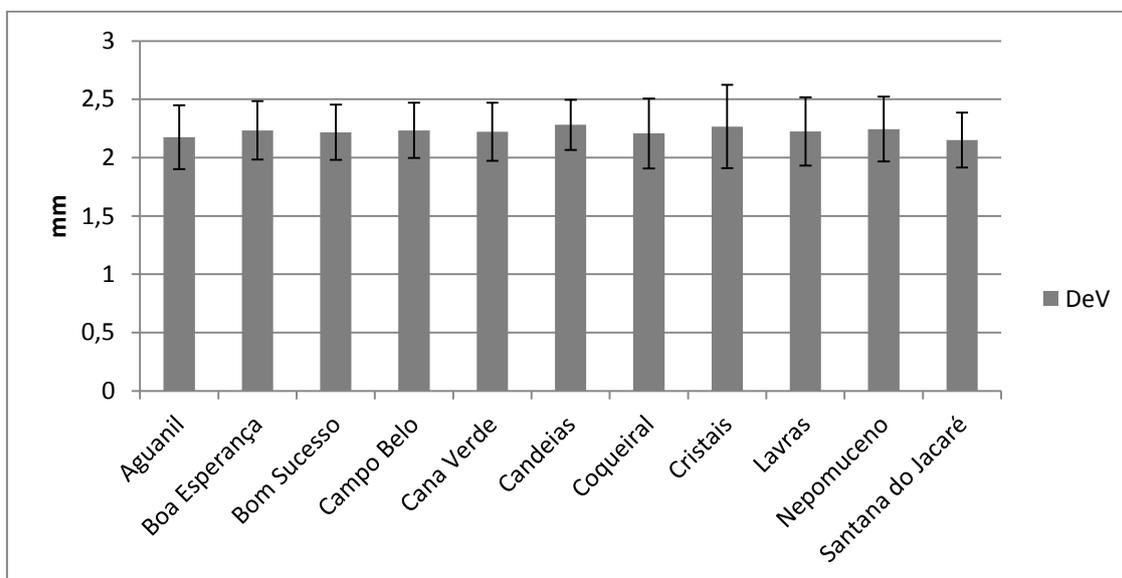


Gráfico 4. Comparação das distâncias médias entre as ventosas oral e ventral de exemplares de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem.

Legenda: DeV = distância entre ventosas

Do mesmo modo que a diferença entre as distâncias das ventosas não demonstrou grande variação, o parâmetro distância entre a ventosa ventral e a porção final (poro excretor) dos animais não apresentou diferença significativa no teste de variância. O gráfico 5 ilustra a comparação entre as médias encontradas do parâmetro analisado.

O comprimento da faringe não demonstrou diferença significativa entre os rebanhos bovinos provenientes de diferentes municípios. É possível observar o mesmo padrão de distribuição entre as medidas analisadas, conforme gráfico 6.

De acordo com teste de variância o tamanho médio dos testículos não apresentou variação significativa entre as diferentes localidades estudadas. No gráfico 7 é possível verificar a comparação das médias de acordo com a localidade de origem das amostras e seus respectivos desvios padrões.

A análise de variância demonstrou diferença significativa do tamanho médio dos ovários dos espécimes avaliados. O gráfico 8 ilustra a comparação entre os valores médios observados de acordo com a cidade de origem da amostra analisada. É importante destacar que no município de Campo Belo as médias observadas foram menores que nas demais localidades.

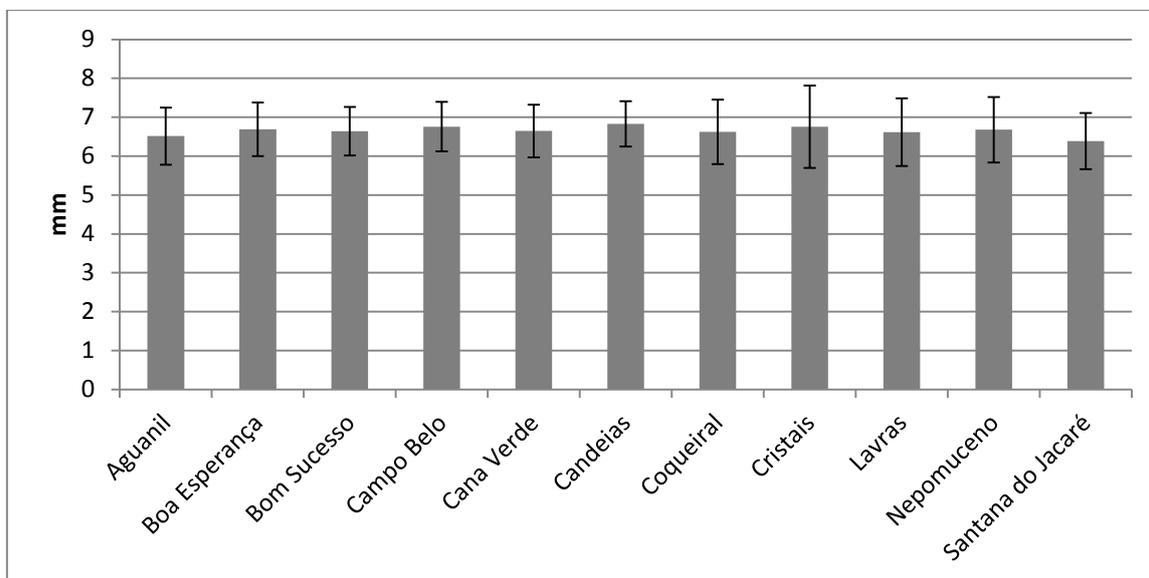


Gráfico 5. Comparação das distâncias médias entre a ventosa ventral e o poro excretor de exemplares de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem.

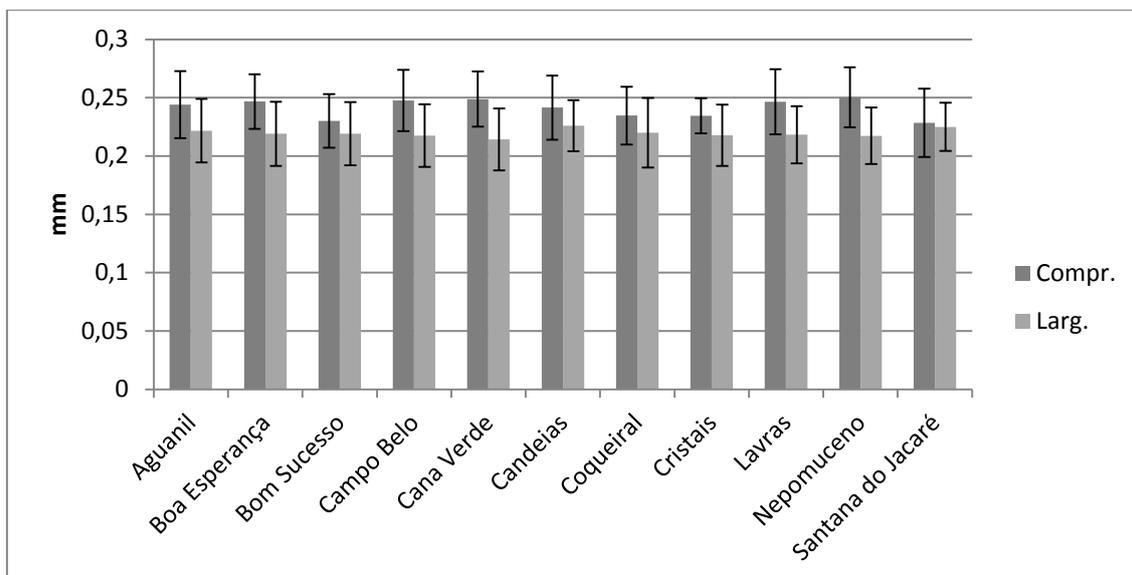


Gráfico 6. Comparação do comprimento e largura da faringe de espécimes de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem.

Legenda: Compr.= comprimento; Larg.= largura.

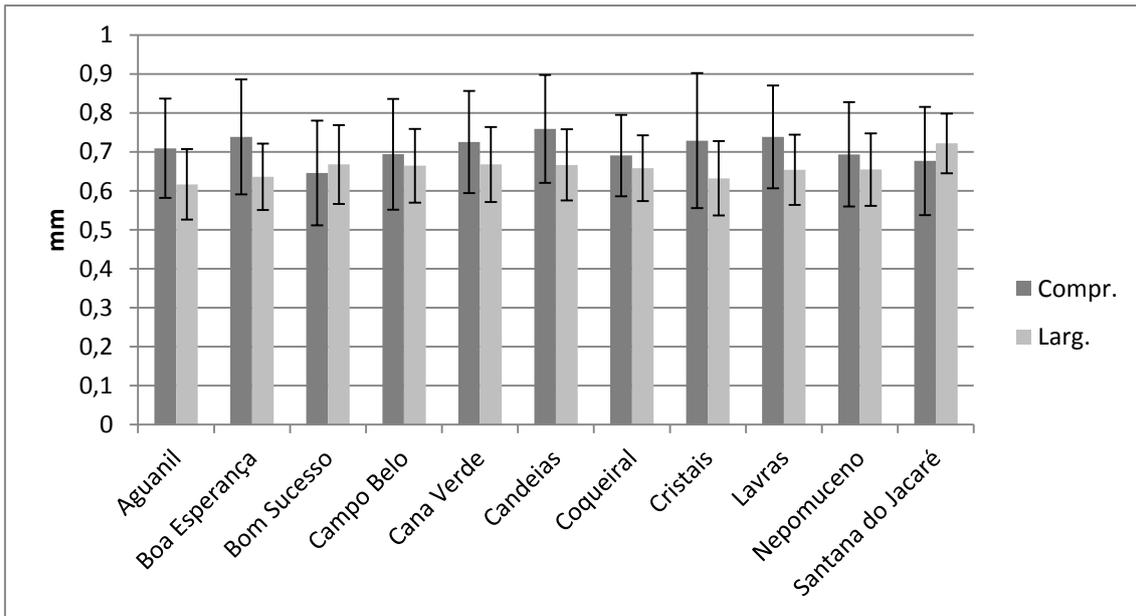


Gráfico 7. Comparação entre o comprimento e largura dos testículos de *E. coelomaticum* provenientes de rabanhos bovinos do sul do estado de Minas Gerais.

Legenda: Compr.= comprimento; Larg.= largura.

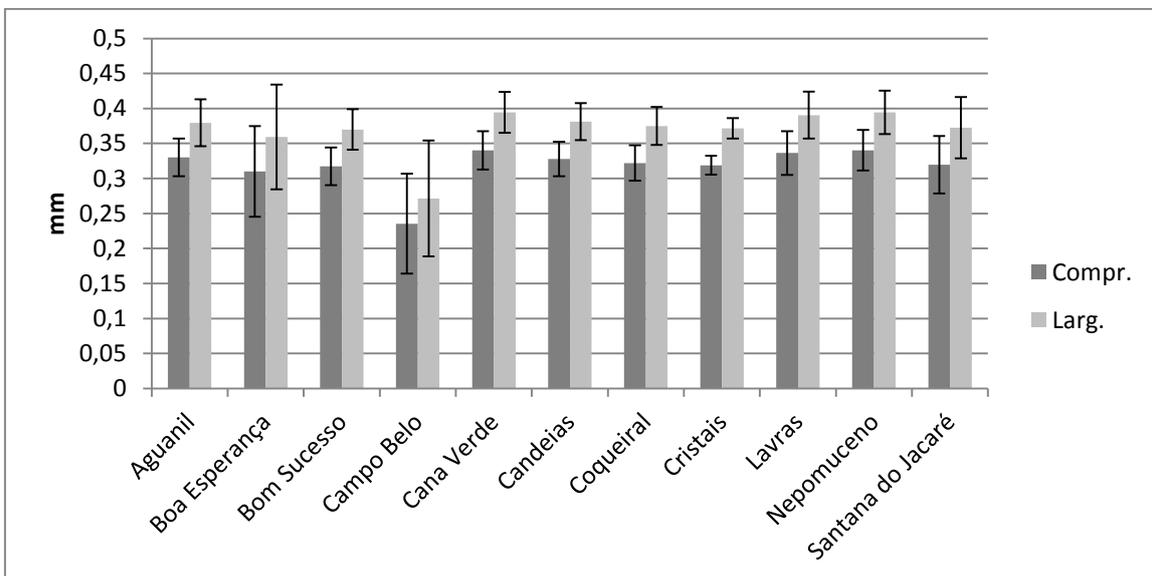


Gráfico 8. Comparação das médias de comprimento e largura do ovário de exemplares de *E. coelomaticum* de acordo com a cidade de origem da amostra.

Legenda: Compr.= comprimento; Larg.= largura.

Durante as observações dos exemplares pela microscopia de luz, foi possível identificar inserções cúbicas no tegumento do parasito, conforme se pode observar na Figura 15. A face superficial destas estruturas apresentou tamanho médio de 20 μm ($n= 50$) e estas estruturas estavam dispersas em várias regiões do corpo do animal.

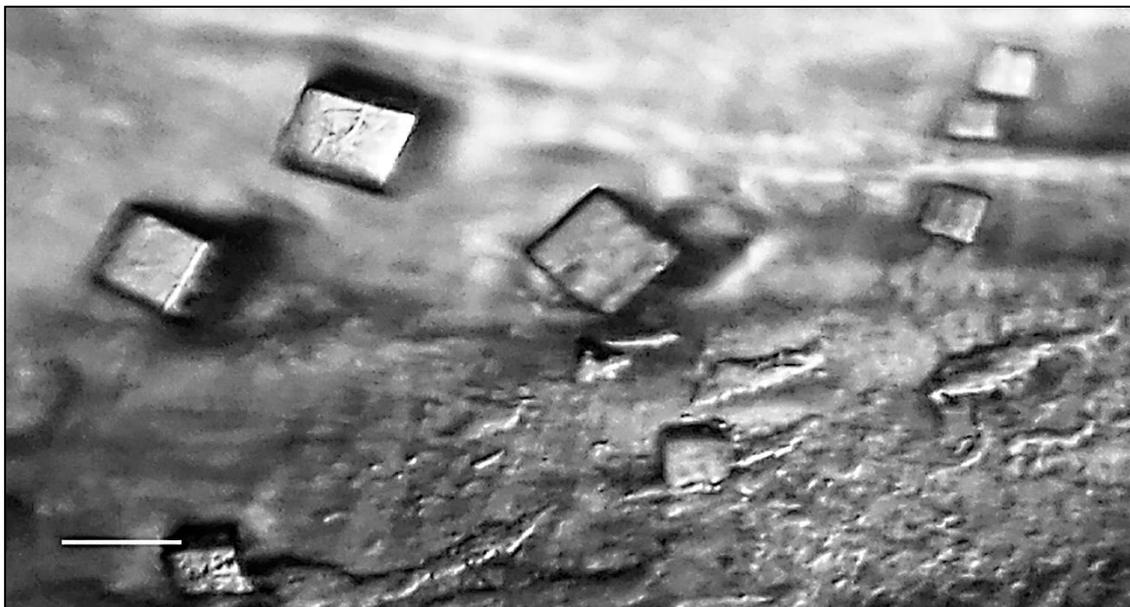


Figura 15. Foto de microscopia de luz (campo claro) apresentado a visão geral das inserções cúbicas no tegumento de *E. coelomaticum* oriundos de pâncreas bovinos, provenientes do matadouro de Campo Belo, Minas Gerais. Barra de escala 20 μm .

5.3.2 Avaliação dos ovos de *E. coelomaticum*

Para mensurar o tamanho da área de cada ovo bem como a área total ocupada no útero foi realizada uma média aritmética de 10 imagens, contendo ovos na luz do útero, utilizando a ferramenta ImageJ (NIH – USA). A área total das imagens analisadas possuía 230 x 170 μm (totalizando 0,0391 mm^2), sendo possível visualizar em média 15 ovos inteiros e dez metades (totalizando 25 estruturas). A área preenchida pelos ovos (ovos inteiros e as metades) representou 0,024 mm^2 . Deste modo foi realizado o cálculo do percentual da área ocupada pelos ovos na luz do útero, sendo este, portanto, igual a 61,38%

da área total da luz do útero dos parasitos. Os ovos apresentaram valores médios de área de 0,000980 mm² e perímetro médio de 119 µm (n = 250)

Os espécimes utilizados para realizar a estimativa do número de ovos apresentaram corpo achatado, fusiforme ou oval com comprimento médio de 7,67 mm (±0,34) e largura média de 3,66 (±0,41). A área média dos indivíduos adultos correspondeu a 29,4 mm² (±4,26), enquanto que a área média do útero representou 15,5 mm² (±3,18). A área total de *E. coelomaticum* variou entre 21 e 36 mm² e a área total do órgão correspondeu entre 9,5 e 20,6 mm², conforme tabela 10. A equação da regressão linear para o tamanho do útero de acordo com a área total do animal (mm²) calculada foi $y = 0,6196x - 2,7614$ e $R^2 = 0,6875$ a qual foi significativa com $p < 0,05$ (gráfico 9).

Tabela 10. Valores registrados para a área total de exemplares de *E. coelomaticum*, tamanho do útero e taxa proporcional do órgão em relação à área do parasito.

Amostra	Área total (mm ²)		Útero/Animal (%)
	<i>E. coelomaticum</i>	Útero	
1	27,3	14,3	51,98
2	29,2	14,2	47,98
3	30,8	16,9	55,00
4	36	18,3	50,00
5	21	9,5	45,00
6	28,4	18,2	63,98
7	32,2	14,5	45,00
8	28	15,4	55,00
9	26,8	12,7	45,00
10	34,4	20,6	60,00
Média	29,4	15,5	51,9
Desvio padrão	4,26	3,2	6,60
Mínimo	21	9,5	45,0
Máximo	36	20,6	64,0

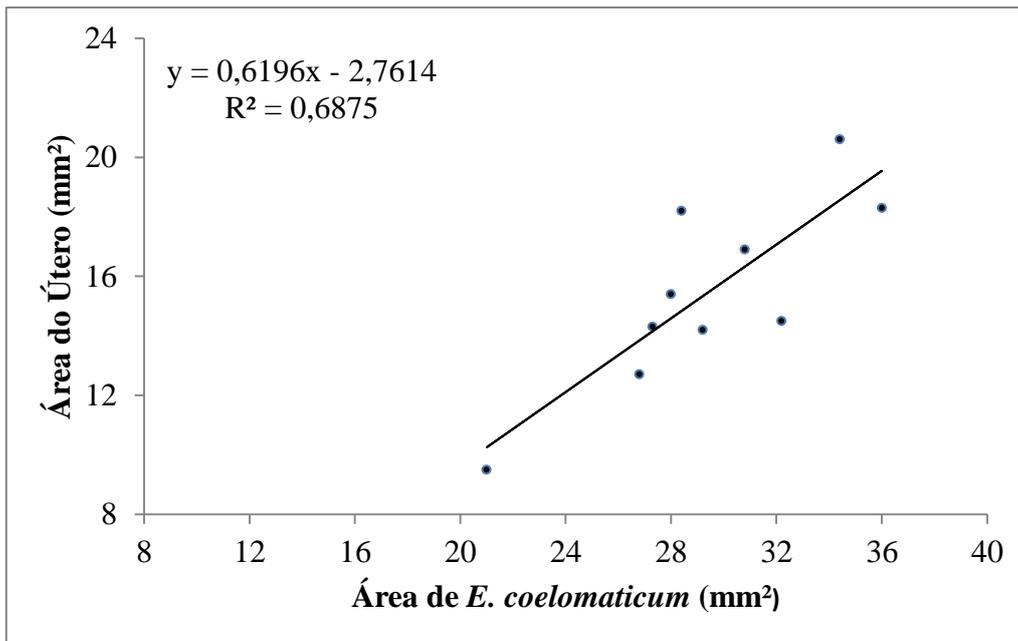


Gráfico 9. Correlação entre tamanho total de espécimes de *E. coelomaticum* (mm²) e o seu útero. Legenda: Regressão linear $y = 0,6196x - 2,7614$, onde y é o tamanho previsto do órgão e x a variável independente tamanho total do corpo; $R^2 = 0,6875$, $p < 0,05$.

Considerando somente os ovos vistos por inteiro nas imagens (15 ovos em 0,0391 mm²) e usando uma regra de três simples chega-se ao número estimado de 383,63 ovos por mm². Empregando a estimativa de ovos inteiros visíveis por mm² e considerando a área média dos úteros de exemplares de *E. coelomaticum* (15,5 mm²), foi possível estimar que um exemplar adulto possui cerca de 5.946,3 ovos em seu útero.

No segundo panorama foi considerada a área média de ocupação dos ovos na luz do útero, ou seja, ovos inteiros e porções que pudessem ser delimitadas que correspondessem a ovos. A área preenchida pelos ovos representou uma média de 0,024 mm². O percentual médio da área ocupada pelos dos ovos na luz do útero foi de 61,38 % (com variação entre 55% e 85%). Multiplicando o percentual médio de ocupação dos ovos na luz do útero pela área média do órgão (15,5 mm²) e dividindo o resultado por 100, se chegou ao número de 9,51 mm² (que corresponde a área realmente utilizada pelos ovos). Considerando que um ovo possui uma área média de 0,000980 mm², para se chegar a segunda estimativa foi dividida a área de ocupação dos ovos (9,51 mm²) pela área média de um ovo, chegando ao número estimado de 9.704,08

ovos. Dividindo o número estimado de ovos pela área média do órgão ($15,5\text{mm}^2$) chegou-se ao valor de 626,07 ovos por mm^2 . Já a média de ovos contados manualmente foi de 9.366,48, com 604,28 ovos por mm^2 . As distribuições do número de ovos e os respectivos outliers podem ser observados no gráfico 10. De acordo com o teste T não houve diferença significativa considerando uma distribuição equivalente para as variâncias dos números de ovos contabilizados manualmente e estimados pelo software, com valor de $p > 0,05$. ($p=0,756$). Realizou-se ainda uma regressão linear com intervalo de predição de 95% para o número de ovos contabilizados de forma manual e pelo software, conforme gráfico 11, com $R^2=0,9745$ e $y= 1,0424x-4,3418$, sendo y o número de ovos estimados pelo software e x o número de ovos contados manualmente.

A variação do número de ovos está diretamente ligada ao tamanho do útero bem como a taxa de ocupação na luz do órgão pelos ovos, conforme se pode observar no gráfico 12.

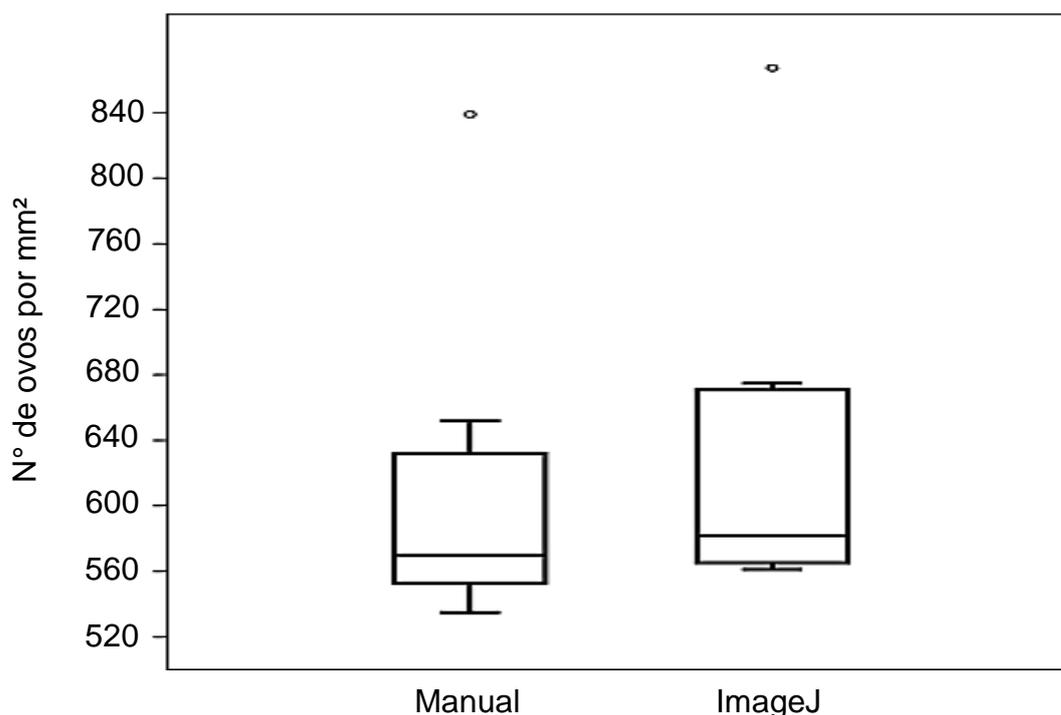


Gráfico 10. Box plot do número de ovos por área (mm^2) contabilizados de forma manual e pelo software ImageJ. Não houve diferença estatística significativa para ambos os métodos com $p > 0,05$.

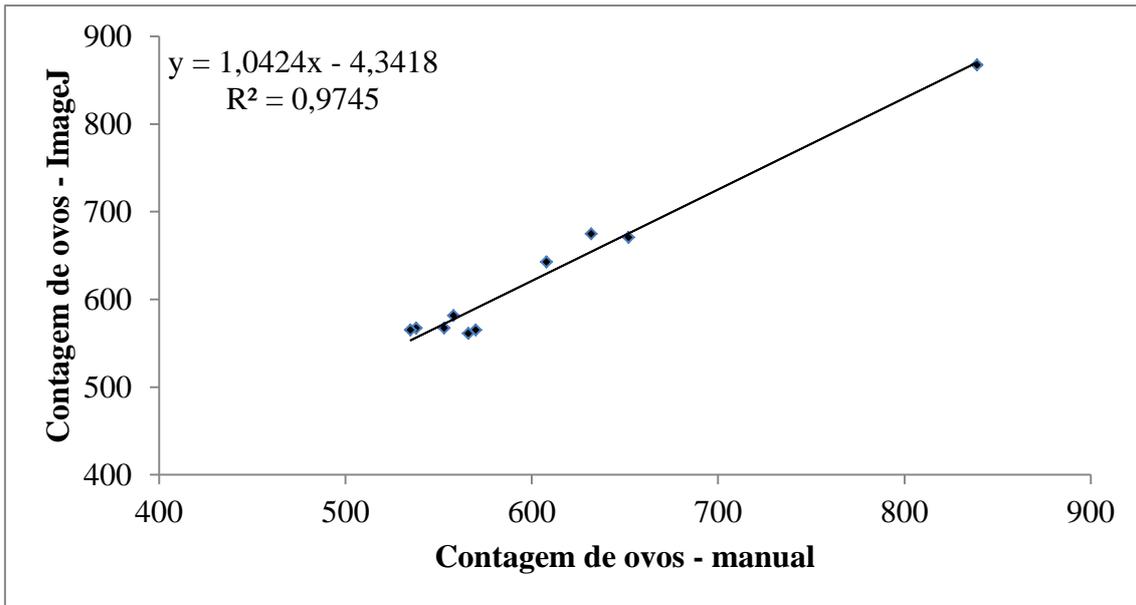


Gráfico 11. Quantidade estimada de ovos de *E. coelomaticum* albergados no útero do parasito, provenientes de bovinos abatidos no sul de Minas Gerais. Correlação entre o número de ovos contados manualmente e através do software ImageJ. Legenda: Regressão linear $y = 1,0424x - 4,3418$, onde y é o número previsto de ovos estimados pelo software e x a variável independente contagem manual; $R^2 = 0,9745$, $p < 0,05$.

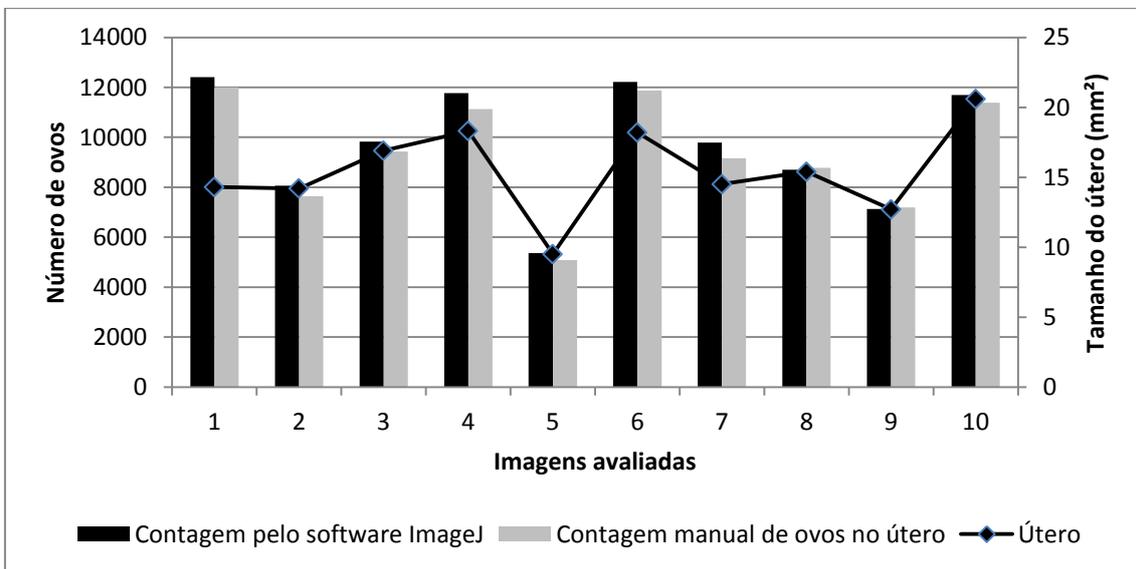


Gráfico 12. Comparação do número de ovos contabilizados manualmente e o número de ovos previstos pelo software ImageJ e de acordo com o tamanho do órgão em milímetros quadrados.

No terceiro cenário foi considerada a taxa de ocupação de 100% da imagem por ovos. Sendo assim foi estimado que em 0,0391 mm² temos 39,89 ovos (0,0391÷0,000980) e por consequência chegamos ao valor de 1.020,20 ovos por mm². Portanto ao se levar em conta o tamanho médio do útero de um animal adulto chegou-se a estimativa de 15.813,10 ovos em um espécime de *E. coelomaticum* adulto. Foi realizada uma regressão linear e definida a equação para estimar o número de ovos presentes em indivíduos adultos de acordo com a área do útero (mm²), conforme gráfico 13.

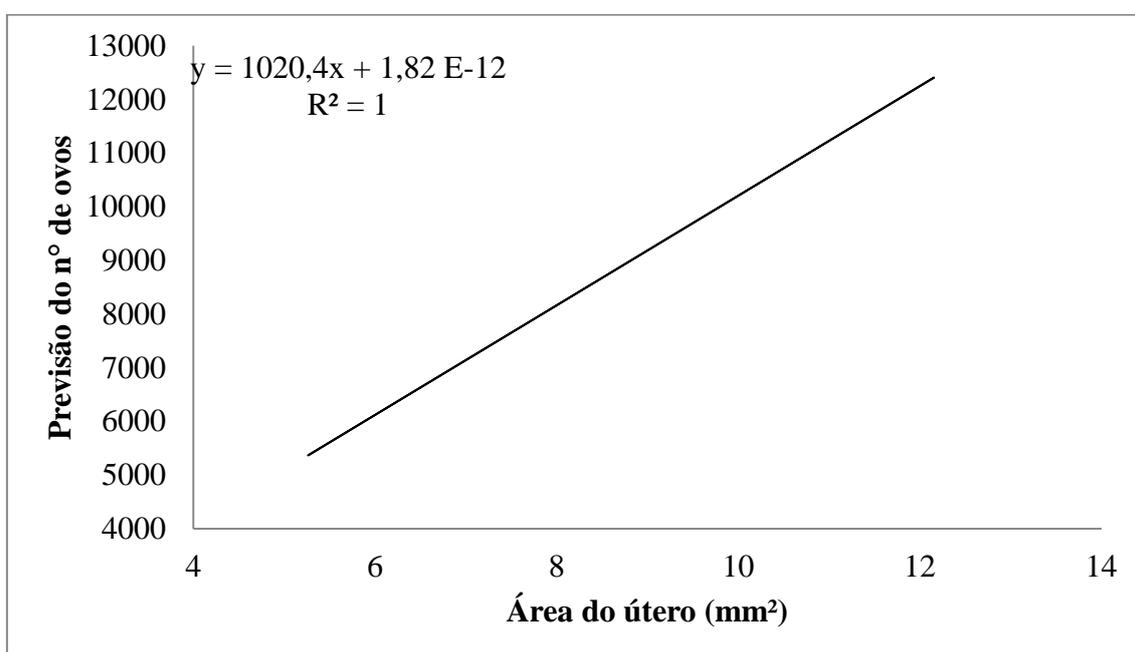


Gráfico 13. Equação da regressão linear simples para prever o número de ovos em útero de *E. coelomaticum* considerando uma taxa de ocupação de 100% da área da imagem por ovos. Legenda: Regressão linear $y = 1.020,40x + 1,812^{-12}$; onde y é o número previsto de ovos e x a variável independente tamanho do útero em mm²; $R^2 = 1$, $p < 0,05$.

5.3.3 Morfologia de *E. coelomaticum*

Detalhes da topografia da superfície foram obtidos através de observações pela microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas dobras no tegumento do parasito tanto na superfície ventral como na dorsal. A ventosa oral apresenta abertura ovalada, predominantemente lisa, apresentando papilas com forma de cúpula. Também foram observadas papilas na superfície da ventosa ventral que apresenta dobras concêntricas e abertura triangular (Figura 16). Muitas estruturas cúbicas também foram detectadas cobrindo o tegumento dos exemplares analisados. Essas protuberâncias estavam dispostas em ambas as superfícies do corpo do parasito (ventral e dorsal). É possível verificar a topografia do poro genital de espécimes adultos de *E. coelomaticum* e este está situado entre as ventosas e apresentou superfície lisa. Além disso, é evidente a visualização do cirro extrovertido que se abre para o meio exterior pelo poro genital. Ainda foi possível observar que o tegumento do corpo apresentou algumas estrias semelhantes a digitais, dispostas de forma concêntrica e transversal (Figura 17). É possível verificar a conformação dos ovos de espécimes adultos de *E. coelomaticum*. A casca dos ovos não apresenta estruturas como projeções ou espinhos. O opérculo é bem delimitado, conforme se pode observar na Figura 18.

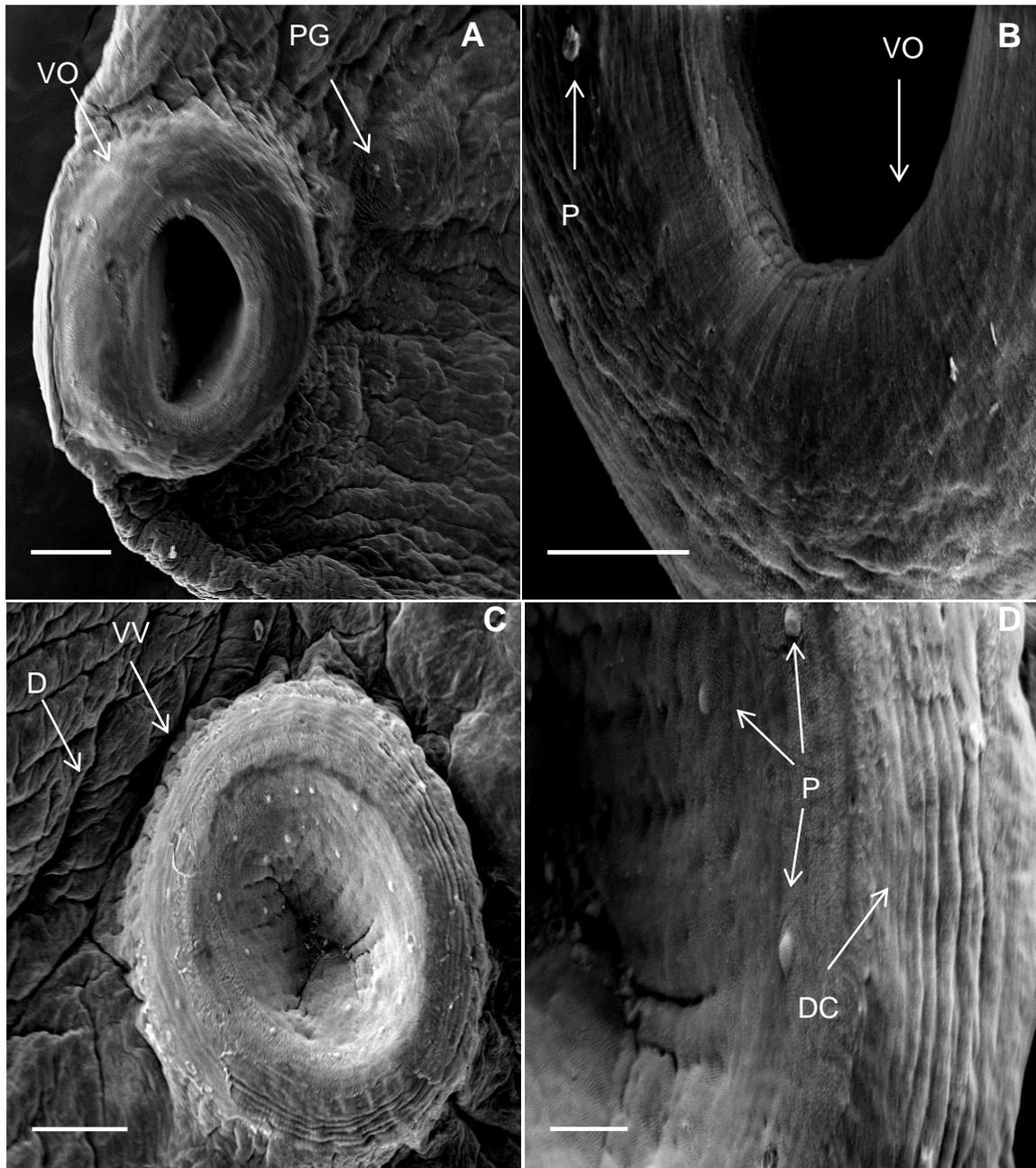


Figura 16. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de adultos de *E. coelomaticum*. [A] Visão da região da ventosa oral (VO) mostrando o poro genital (PG); barra de escala: 0,2 mm. [B] Maior ampliação da ventosa oral (VO) destacando a presença de papilas (P); barra de escala 0,1 mm [C] Visão geral da ventosa ventral (VV) e do tegumento que apresenta dobras (D); barra de escala: 0,2 mm [D] Detalhe da superfície da ventosa ventral destacando as papilas (P) e o tegumento apresentando dobras concêntricas (DC); barra de escala: 0,05 mm.

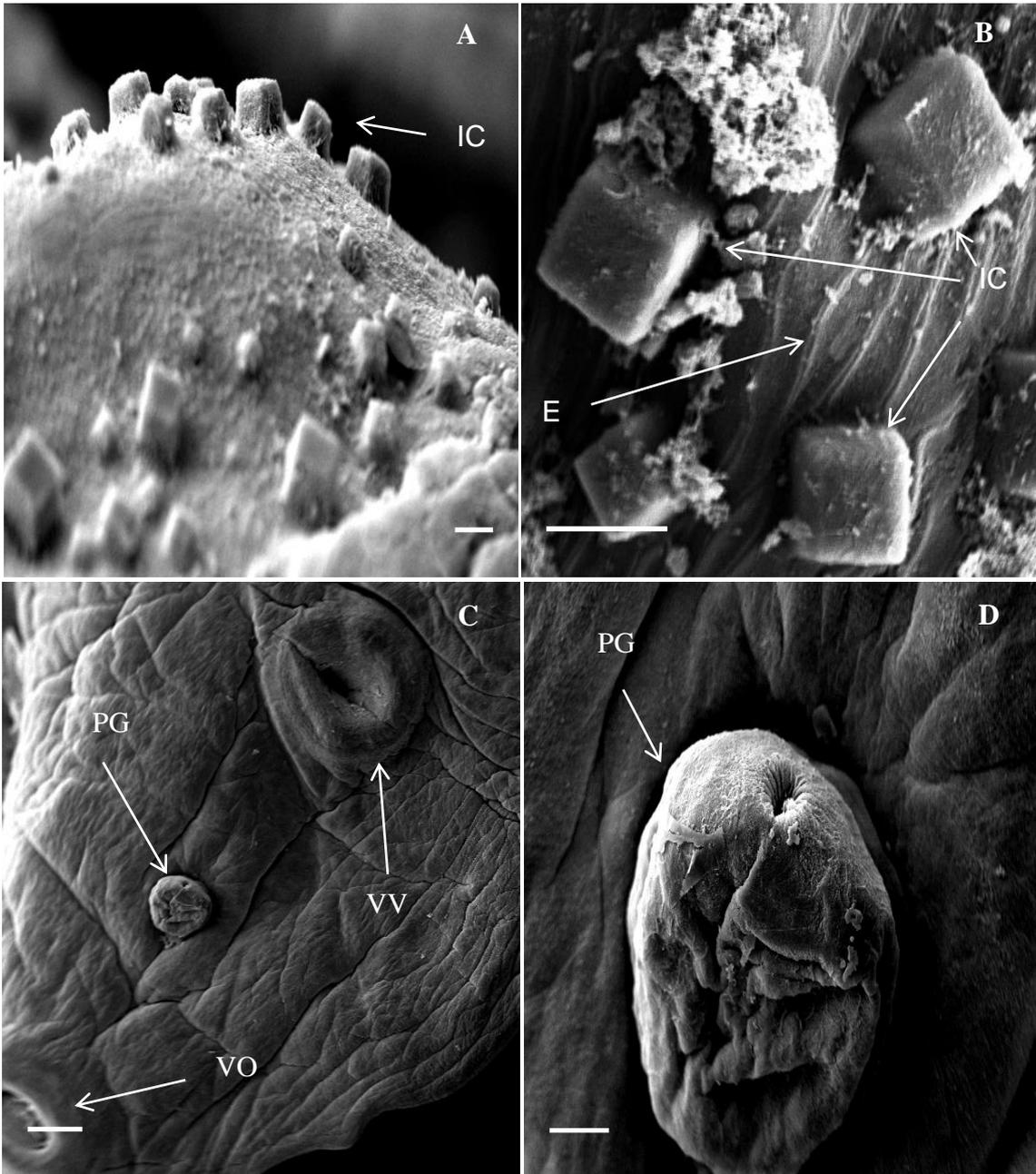


Figura 17. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de adultos de *E. coelomaticum*. [A] Visão do tegumento do parasito com inserções cúbicas (IC); barra de escala: 0,2 mm. [B] Maior ampliação das inserções cúbicas (IC) e estrias (E) semelhantes a digitais; barra de escala 0,02 mm [C] Visão geral da ventosa ventral (VV), ventosa oral (VO) e do poro genital (PG) com o cirro extrovertido; barra de escala 0,2 mm. [D] Maior ampliação do poro genital (PG) com cirro extrovertido; barra de escala: 0,05 mm

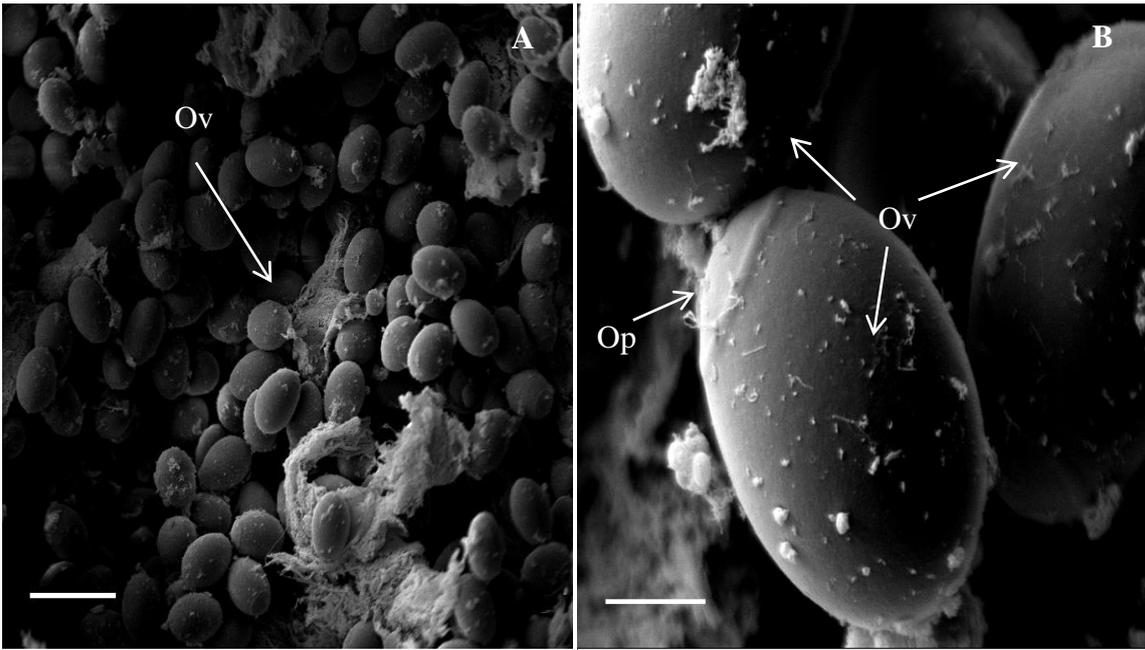


Figura 18. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de ovos de *E. coelomaticum*. [A] Visão geral de ovos (Ov) presentes na luz do útero; barra de escala: 0,05 mm. [B] Ampliação dos ovos (Ov) mostrando o opérculo (Op); barra de escala: 0,01 mm.

5.4 SDS PAGE

Foi possível verificar que as proteínas do tegumento do parasito possuem pesos moleculares estimados entre 160 e 14,4 kDa.



Figura 19. SDS-PAGE de extratos protéicos de *Eurytrema coelomaticum* A solução da amostra foi aplicada com 15, 10 e 5 μ l nos poços da esquerda para a direita respectivamente. Os marcadores de peso molecular são indicados em kDa na primeira canaleta do lado esquerdo (gel corado com Comassie blue).

6 DISCUSSÃO

De acordo com Mohanta et al. (2015), as espécies de *Eurytrema* correspondem a grupo de trematódeos amplamente distribuído pelo globo. Pinheiro et al. (2012) afirmam que as principais regiões de concentração desses parasitos são a América do Sul, Europa e Ásia. Considerando somente o Brasil, este helminto possui ampla distribuição e é comumente encontrado em abatedouros de vários estados brasileiros (Ilha et al. 2005, Bassani et al. 2006).

Apesar de ser comumente encontrado, ainda não se tem estimativas sobre o impacto destes organismos na produção pecuária nacional. É importante destacar que apesar de o presente estudo ter identificado parasitos presentes nas amostras, os animais não apresentaram sintomas graves durante a inspeção *ante-mortem*, corroborando com informações já descritas na literatura sobre o fato da doença ser assintomática em muitos casos (Bassani et al. 2007)

Foram observadas variações nos índices de precipitação na região objeto do estudo. Essas oscilações e a diminuição dos níveis de chuvas provocaram até mesmo o racionamento de água em alguns municípios contemplados no presente trabalho. As variações pluviométricas observadas nos anos anteriores e no ano da coleta das amostras sugerem que a população de *Bradybaena similis*, hospedeiro intermediário, tenha diminuído. Segundo Almeida & Bessa (2001) e Mota & Almeida (2012), a presença de umidade do ar e solo são os fatores determinantes para a reprodução de moluscos terrestres, sendo possível a observação na queda da população nos meses e anos mais secos.

O volume de chuvas observadas no período de 2014 a 2015 foi menor do que o esperado, o que ocasionou um desequilíbrio hídrico, provocando uma queda na umidade do solo, possivelmente prejudicando a reprodução do caramujo, pois de acordo com Silva et al.(2009), a produção de ovos tende a ser menor em condições desfavoráveis de umidade do substrato, o que contribui para uma acentuada queda na população em si.

Os resultados de infecção encontrados no presente trabalho (20,7%) diferem do estudo realizado por Belém et al. (1992) que encontraram uma taxa de infecção de 8,5% na mesorregião sudoeste do estado de São Paulo. Já Azevedo et al. (2004) encontraram uma média global de 12,1% dos animais infectados na região noroeste do estado do Paraná, entretanto os percentuais de infecção variaram entre 8,3% e 40,5% considerando evidentemente cada localidade isoladamente. Por outro lado Bassani et al. (2006) registraram uma prevalência média de 47,8% na região centro-oeste do Paraná com variações entre 26,9% a 72,9%. Schwertz et al. (2016b) observaram uma alta taxa de infecção global, com uma prevalência de 63,5% dos animais parasitados na região de Concórdia no estado de Santa Catarina. Os valores médios de parasitismo destes estudos também divergem dos encontrados no presente trabalho, mas, considerando os valores de variação entre as localidades, estes sim, coincidem com os encontrados nos rebanhos do sul de Minas, que apresentaram variações entre 8,7% a 68,6%.

Essas diferenças entre as prevalências de ocorrência da doença registradas na região sul do estado de Minas Gerais com outras ocorrências no Brasil se devem em parte pelas características geográficas, hidrológicas e condições climáticas encontradas nas mesorregiões do presente trabalho. A região do presente estudo apresenta relevo predominantemente constituído por áreas íngremes conhecidas como “Mar de Minas” (referindo-se a mares de morros) com altitude média de 900 a 1000 metros do nível do mar. Essa região possui ainda uma grande rede de riachos que se interligam e deságuam em rios com abrangência regional, além de rios mais extensos como o caso do rio Grande que faz parte da bacia do Paraná (Coura 2007; IBGE, 2015b). A fitofisionomia da região compreende elementos da mata Atlântica e do Cerrado (Coura 2007). Estas condições ambientais e climáticas podem influenciar a distribuição de hospedeiros intermediários e conseqüentemente dificultar e/ou facilitar o fechamento do ciclo biológico, conforme mencionado por Belém et al. (1992).

Outro fator que possivelmente tem um peso significativo no ciclo de transmissão do parasito é o manejo realizado nas propriedades rurais. De acordo com Liu et al. (2016), uma das poucas estratégias que são realmente

efetivas para o controle desta parasitose incluem um sistema efetivo de alojamento dos animais, níveis de higiene das instalações e boas práticas no manejo do rebanho.

O fato de uma propriedade possuir animais infectados e todos os fatores ambientais necessários para a manutenção do ciclo parasitário favorecem a perpetuação da infecção por *E. coelomaticum* (Ilha et al. 2005).

Os tamanhos médios dos parâmetros observados no presente estudo (comprimento e largura do animal, tamanho das ventosas e demais órgãos) confirmam que a espécie predominante nos rebanhos do sul de Minas Gerais é compatível com *Eurytrema coelomaticum*. Dentre os parâmetros avaliados somente o comprimento e largura média dos ovários analisados diferiram um pouco dos valores médios descritos por Figueira et al. (2014), que observaram um tamanho médio de 0,38 mm por 0,47 mm de comprimento e largura respectivamente, enquanto o presente estudo observou valores de 0,32 mm e 0,37 mm para os mesmos parâmetros. Wireno et al. (1987) descreveram os tamanhos médios do ovário de *Eurytrema pancreaticum* com aproximadamente 0,27 mm de diâmetro. Os valores médios encontrados no presente estudo e a relação de proporção entre as ventosas e o tamanho corporal também vão de encontro com aqueles descritos por Ilha et al. (2005) e Mohanta et al. (2015). Somente o município de Campo Belo apresentou animais com tamanho de ovário inferior aos demais. Isso pode ser em decorrência de padrões fenotípicos expressados em decorrência de alguma alteração no entorno de seu ambiente. Yamamura (1989) observou que ovos provenientes de um mesmo animal (trematódeo) resultam em adultos com diferentes padrões de crescimento quando realizada a infecção experimental em bovinos e ovinos.

Ao analisar se havia algum tipo de relação entre as diferentes variáveis qualitativas analisadas, foi verificado que não houve associação entre o número de animais positivos para *E. coelomaticum* com relação ao sexo do bovino ($p > 0,05$). Esta informação vai na contramão dos achados por Bassani et al. (2006) que encontraram uma predominância de parasitos em fêmeas bovinas correspondendo a 50,3% das fêmeas e 34,8% dos machos infectados.

A média de idade dos 469 animais foi de 3,21 anos, tendo os animais negativos uma média de 3,13 e os positivos 3,54. De acordo com o teste do qui

quadrado houve uma associação significativa ($p < 0,05$) entre a presença de *E. coelomaticum* e a idade do animal. Essa característica também foi observada por Bassani et al. (2006), que verificaram uma diferença estatística significativa entre estas duas variáveis, sendo os animais parasitados em média um ano mais velhos (tendo os animais saudáveis $3,78 \pm 1,75$ anos e os infectados $4,72 \pm 1,94$).

Foi possível verificar uma associação entre o escore de condição corporal dos animais parasitados e a presença de *E. coelomaticum* em pâncreas bovinos. Batista et al. (2014) observaram que cabras da raça Anglonubiana com valores maiores de ovos por grama de fezes – OPG para parasitos gastrintestinais registram escores menores do que a média observada. Eles associaram os menores escores a anemia resultante das infecções por parasitos. De acordo com Ndlovu et al. (2009), o escore de condição corporal (ECC) é sem dúvida o melhor parâmetro prático para se avaliar o status nutricional de um rebanho. Em seu trabalho eles observaram a variação do ECC durante 10 meses em três diferentes raças de bovinos Nguni, Bonsmara e Angus (sendo a primeira um híbrido de diferentes raças indianas e europeias, a segunda de origem na África do sul e a última uma linhagem europeia). Eles observaram que mesmo com baixas cargas parasitárias (ovos do tipo strongyloides e *Fasciola sp*) os animais da raça Angus apresentaram um decréscimo em seus escores ao longo do experimento. Já Bassani et al. (2006) não encontraram diferenças significativas que pudesse demonstrar alguma associação entre a presença de *E. coelomaticum* e os diferentes escores corporais.

No presente estudo foi verificada uma associação entre a presença do parasito no pâncreas bovino e a raça predominante do animal, entretanto não é possível com base somente nestes dados inferir qual a relação desta associação. É necessário um acompanhamento destes animais por um longo período e com um nº relativamente maior para poder avaliar com maior precisão esta relação. No estudo realizado por Ndlovu et al. (2009), houve uma resistência maior a infecção por *Fasciola sp.* por parte de animais mestiços (Nguni e Bonsmara) em relação ao gado predominantemente europeu.

De acordo com Neuhaus (1978), o comprimento do útero de alguns trematódeos correlaciona-se com o tamanho do corpo. No presente estudo foi observado que há uma relação entre o tamanho do animal e o tamanho do útero com valor de $p < 0,05$, e f de significação $< 0,05$. A relação positiva e significativa entre o tamanho corpóreo e do útero indica que o acréscimo de um é acompanhado pelo aumento proporcional do outro sem, no entanto, requerer dependência entre eles, mas possibilitando que a partir do primeiro possa ser estimado o valor do segundo.

O útero de *E. coelomaticum* possui em sua luz aglomerados de ovos, não existindo um método eficaz para quantificar o número total de ovos dentro do órgão sem empregar métodos que destroem as estruturas internas do parasito, ocasionando a perda de material ao longo do processo de incisão e retirada do órgão, afetando a contagem e posteriormente os resultados. O software ImageJ fornece medidas precisas da área de superfície dos ovos e portanto é uma ferramenta excepcional para auxiliar na contagem e consequente criação de estimativas mais próximas à realidade. Rosati et al. (2015) usaram a análise de imagens digitais combinada com medidas de profundidade, para calcular o número de ovos de moscas varejeiras (Diptera: Calliphoridae) e deste modo, criaram um modelo tridimensional para estimar o número de ovos através do volume e não somente pela área superficial.

No presente estudo foi realizada uma correlação linear simples para avaliar o tamanho esperado do útero de animais adultos a partir da área corpórea total de *E. coelomaticum*. Valero et al. (2001) usaram como referência para avaliar o desenvolvimento do útero de *Fasciola hepatica* proveniente de rebanhos da Bolívia, Espanha e França um modelo de crescimento alométrico onde a curva apresenta um crescimento exponencial. Já Neuhaus (1978) usou para calcular a equação do comprimento do útero de *Dicrocoelium dendriticum*, *Pleurogenoides medians* e *Fasciola hepatica* o tamanho corrigido do corpo que é igual a $\sqrt{\text{largura} \times \text{comprimento}}$. O autor observou uma curva sigmoide com a parte média apresentando uma seção linear, onde ele considerou um crescimento alométrico.

Segundo Bassani et al. (2007), a proporção de ovos eliminados e a observação destes via OPG não está relacionada diretamente ao número de

parasitos albergados no hospedeiro, mesmo considerando àqueles que depositam seus ovos diretamente na luz do intestino.

Neste trabalho foi realizada uma estimativa do número de ovos presentes no útero de espécimes adultos de *E. coelomaticum*. Na literatura não há descrição sobre estimativas do número de ovos presentes no útero de animais adultos. Yamamura (1989) testando a ovipostura de *E. coelomaticum* observou *in vitro* uma quantidade média de 641 ovos depositados por dia, sendo considerado pelo autor um número baixo e totalmente irregular em relação a outros parasitos. Já Brandolini & Amato (2001) testando diferentes meios fisiológicos observaram que a solução de Locke foi a que apresentou a melhor taxa de ovipostura com média de 746 ± 139 ovos, seguido pela solução de Earle $304.6 \pm 154,7$ e finalmente a solução salina a 0,85% com $194,5 \pm 132$ ovos em média.

O formato e a coloração dos ovos observados neste trabalho corroboram com os dados informados por Yamamura (1989) e Pinheiro et al. (2015) que identificaram ovos com coloração amarelada ou amarronzada e com comprimento médio de 40 e 44,07 μm por 30 e 30,71 μm de largura média, respectivamente. Segundo os autores os ovos com coloração marrom estavam férteis enquanto os amarelados eram imaturos.

Apesar do relativo sucesso com relação à estimativa de ovos é imprescindível destacar que as metodologias adotadas neste trabalho possuem limitações como o fato de que as imagens analisadas pelo software possuem características bidimensionais, enquanto que os parasitos possuem conformação tridimensional. Desta forma o número total de ovos acaba sendo subestimado, pois aqueles ovos que não são capturados pela imagem acabam por não entrar no cálculo da estimativa. Portanto, considerando os três cenários estabelecidos no presente trabalho fica evidente que o número mínimo de ovos presentes em úteros de *E. coelomaticum* varia entre as médias de 5.946,30 e 15.813,10, sendo necessário desenvolver uma metodologia para extração do órgão sem que haja perda de material e assim determinar com exatidão o número total de ovos presentes.

A metodologia aplicada pelo software é a denominada watershed (refere-se metaforicamente a uma bacia hidrográfica geológica, ou à divisão de

drenagem). O algoritmo watershed trata a imagem como um mapa topográfico, com o brilho de cada ponto que representa a sua altura e encontra as linhas que ocorrem ao longo das suas bordas. Portanto a segmentação da imagem é normalmente usada para localizar objetos e limites, como linhas, curvas, etc. (Verma 2013). Um problema que pode ocorrer é a presença de ruídos nas imagens que podem diminuir a precisão do teste, mas mesmo com esses pormenores, a análise possui grande sensibilidade e pode ser considerada uma excelente ferramenta de análise de imagens (Zhu et al. 2007).

Uma das vantagens do procedimento realizado neste estudo é o fato de que são utilizados softwares livres (ImageJ e Gimp), e estes não requerem hardwares caros ou especializados. Outro aspecto positivo relacionado à técnica de estimativa de ovos de *E. coelomaticum* é que as imagens digitalizadas fornecem registros permanentes que podem ser verificados através de contagem manual se isso for desejado.

Usando a técnica descrita neste trabalho é possível realizar a estimativa de milhares de ovos em pouco tempo e com uma grande acurácia. O tempo necessário para contagem manual pode ser uma complicação em experimentos que exigem a contagem de ovos, exigindo um esforço substancial, perda de tempo e recursos (Mains et al. 2008). Portanto, o método descrito neste trabalho inclui uma redução substancial de tempo, maior consistência nos dados obtidos, diminuição de erros, além de tirar o viés humano.

De acordo com as informações obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar um tegumento predominantemente liso apresentando estrias concêntricas ao redor das ventosas e transversais no corpo. Essa conformação da disposição das estrias também é vista em outros trematódeos como a espécie *Lobatostoma jungwirthi* (Trematoda: Aspidogastrea) (Paola & Damborenea, 2001), *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* (Sakamoto & Oikawa 2007) e *Concinnum epomopis* (Trematoda: Dicrocoeliidae) (Otubanjo, 1985). *C. epomopis* compartilha ainda mais características ultraestruturais com *E. coelomaticum*. De acordo com o autor foi possível observar papilas sensoriais dispostas ao longo do corpo, mas principalmente na região das ventosas oral e acetabular, possuindo, portanto,

padrão similar ao observado no presente trabalho. Outros trematódeos que apresentam um padrão semelhante de papilas ao redor de suas ventosas são espécies de *Phyllodistomum*, conforme trabalho realizado por Stunzenas et al. (2017). Lima et al. (2011) observaram estrias semelhantes a digitais no tegumento de *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae), porém o tegumento apresentou grande número de tubérculos com vários espinhos distribuídos aleatoriamente por todo o corpo.

A localização do poro genital observado no presente estudo ajusta-se com o que é descrito na literatura, estando na linha mediana entre a ventosa oral e a ventosa ventral, conforme descrito por (Bassani et al. 2007)

Muitas estruturas cúbicas foram observadas em exemplares de *E. coelomaticum* provenientes do sul do estado de Minas Gerais, tanto na microscopia de luz (campo claro) quanto na eletrônica de varredura. Estas estruturas estavam dispostas em praticamente toda extensão do corpo dos parasitos, sendo visualizadas tanto na superfície ventral quanto na dorsal. Somente em alguns pontos não foi possível encontrar as inclusões no tegumento: nas ventosas e no entorno do poro genital dos animais. Estruturas com formatos diferenciados foram observados em algumas espécies de trematódeos, como o caso de *Opisthorchis viverrini*, que têm inclusões cristalinas que são minúsculos grânulos circulares em células subtegumentares (Sobhon & Apinhasmit 1995). Corpos esféricos e em forma de haste são as estruturas encontradas em células subtegumentares de *Paragonimus westermani* (Fukuda et al. 1982). A neoderme de *Shistosoma mansoni* apresenta tubérculos e espinhos além de áreas com pouca rugosidade (Lima et al. 2011). Johnson et al. (2003) caracterizaram uma estrutura cristalina da proteína Glutathione S Transferase em *Shistosoma haematobium* e que provavelmente atua na interação parasito – hospedeiro. Eles citam também que essa estrutura pode ser considerada uma promissora candidata a vacina contra esquistossomose.

Apesar de possuírem diferentes tipos de estruturas em seus tegumentos, nenhuma das espécies pesquisadas dentro da classe Trematoda exibiu características próximas às inserções cúbicas registradas no presente estudo, exceto o trabalho de Sakamoto & Oikawa (2007) que ao analisar as

espécies *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum* descreveram que as inclusões cúbicas possuem perfil protéico. Segundo os autores, a estrutura mais próxima aos cristais cúbicos é a proteína Glutathione S Transferase observada em *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis* e *Fasciola hepatica*. Inserções protéicas podem ser definidas como substâncias citoplasmáticas estáveis e geralmente são constituídas por agregados protéicos (Singh et al. 2005).

É fundamental entender qual o real papel das inserções cúbicas dispersas no tegumento do parasito e avaliar se estas estruturas podem ser utilizadas como uma molécula candidata a vacina e/ou medicamento contra a euritrematose bovina. Portanto compreender as relações entre as diferentes estruturas e moléculas do parasito são essenciais para o desenvolvimento de estratégias efetivas no controle da parasitose.

O perfil protéico do tegumento de *E. coelomaticum* deve ser melhor entendido e desta maneira aumentar o rol de conhecimentos acerca das interações do parasito durante a infecção nos ductos pancreáticos. Neste estudo foram observadas proteínas de diferentes tamanhos no extrato protéico do tegumento do parasito. Sakamoto & Oikawa (2007) identificaram que as estruturas cúbicas possuem um peso molecular de 36,6 kDa. No presente estudo as proteínas do tegumento apresentaram tamanho variando entre 160 e 14,4 kDa. Deste modo fica claro que é necessário identificar as demais proteínas exibidas no tegumento e correlacionar com a patogênese da doença, além é claro, de observar possíveis proteínas candidatas a vacinas contra a euritrematose.

7 CONCLUSÕES

- A constatação da presença de *E. coelomaticum* nos municípios de Aguanil, Boa Esperança, Bom Sucesso, Campo Belo, Cana Verde, Candeias, Coqueiral, Cristais, Lavras, Nepomuceno e Santana do Jacaré amplia a área de ocorrência do parasito, que até o momento ainda não havia sido descrito no sul de Minas Gerais.
- O estudo morfológico permitiu a caracterização da espécie *E. coelomaticum*, além da confirmação da presença de estruturas cúbicas em grande parte do tegumento
- Não houve no presente estudo a influência do sexo do animal com a presença do parasito.
- Foram encontrados indicativos de que animais com escores mais baixos e idade superior a 3,5 anos são mais susceptíveis a infecção por *E. coelomaticum*.
- Existe uma relação de tamanho entre o útero dos animais e o comprimento total dos parasitos.
- A utilização da técnica proposta neste trabalho tornou possível realizar a estimativa de milhares de ovos em pouco tempo e com uma grande acurácia, dando maior consistência nos dados obtidos, diminuição de erros, além de tirar o viés humano. A contagem manual de ovos apresentou um índice inferior quanto ao número de ovos observados em comparação com a contagem realizada através do software ImageJ.
- O uso das metodologias utilizadas neste trabalho podem ser aplicadas aos diferentes grupos de parasitos e isso significa um aumento do conhecimento sobre as taxas de reprodução e poderão auxiliar no entendimento sobre aspectos relacionados à epidemiologia dos parasitos.
- Apesar do êxito na estimativa do número de ovos previsto em úteros de *E. coelomaticum*, a metodologia aplicada possui suas limitações nos fornecendo com precisão o número mínimo de ovos presentes, considerando os três cenários propostos. Regressões lineares simples

podem ser estabelecidas para calcular o número de ovos albergados baseados no tamanho do útero, e as equações podem ser definidas considerando a taxa de ocupação na luz do útero ou considerando um percentual de 100%. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os indivíduos adultos possuem cerca de 5.946,30 a 15.813,10 ovos, dependendo do critério usado para avaliar.

- Há uma necessidade de se fazer estudos mais aprofundados relacionados com aspectos reprodutivos das formas adultas de *E. coelomaticum*, bem como entender aspectos relacionados a epidemiologia e análises mais específicas associadas à análise proteômica das proteínas cúbicas presentes no tegumento do parasito, avaliando se estas podem ser utilizadas para a criação de vacinas e ou medicamentos parasitários efetivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida MN de, Bessa EC de A. Estudo do crescimento e da reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac) (Mollusca, Xanthonycidae) em laboratório. *Rev. Bras. Zool.* 2001; 18: 115–122.

Amato, J.F.R.; Boeger, W.A.; Amato, S.B. Coleta e processamento de parasitos de pescado. Seropedica: UFRRJ, 1991. 81p. Protocolos para laboratorio.

Azevedo JR De, Mannigel RC, Agulhon AZ, Thiago R, Barbiéri AW, Oliveira DCL De, Headley SA. Prevalence and geographical distribution of bovine prevalence eurytrematosis in cattle slaughtered in northern Paraná, Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 2004; 24: 23–26.

Bassani CA, Sangioni LA, Paulo J, Saut E, Headley SA, Yamamura MH. Euritrematose bovina. *Ciencias Agrar. Londrina* 2007; 28: 299–316.

Bassani CA, Sangioni LA, Saut JPE, Yamamura MH, Headley SA. Epidemiology of eurytrematosis (*Eurytrema* spp. Trematoda: Dicrocoeliidae) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the state of Paraná, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2006; 141: 356–361.

Batista JF, Campelo JEG, Moraes MF, Silva PO, Magalhães PC, Barçante FP da S, Mendonça IL. Endoparasitismo gastrointestinal em cabras da raça Anglonubiana. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.* 2014; 15: 318–326.

Belém PAD, Oliveira MR dc, Padovani CR. Intensidade de parasitismo por *Eurytrema* sp em bovinos da mesorregião do sudoeste paulista. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci* 1992; 29: 366–368.

Brady M, O'Neill S. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect.* 1999; 67: 5372–5378.

Brandolini SVPB, Amato SB. Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae). *Rev. Bras. Zool.* 2001; 18: 499–510.

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *J. Parasitol.* 1997; 83: 575.

Chang QC, Liu GH, Gao JF, Zheng X, Zhang Y, Duan H, Yue DM, Fu X, Su X, Gao Y, Wang CR. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genome from the pancreatic fluke *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Gene* 2016; 576: 160–165.

Costa HM de A. Helminthos - Classe Trematoda. In: Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Vitor RWA (Eds.), *Parasitol. Humana.*, Atheneu, São Paulo, 2004. p. 185–192.

Coura SMD. Mapeamento de vegetação do estado de Minas Gerais utilizando dados modis. São José dos Campos. Dissertação [Mestrado], Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2007; 150p.

David P, Geary TG. Helminth surfaces: molecular and functional properties. In: Joseph Marr, Tim W. Nilsen RWK (Ed.), *Mol. Med. Parasitol.*, Academic Press, 2003. p. 297–338.

Eduardo SL, Sy HG. Scanning electron microscope observations on the tegumental surface of adult *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) Looss, 1907 (Trematoda: dicrocoeliidae), a parasite of ruminants in the Philippines. *Philipp. J. Vet. Med.* 2007; 44: 100–106.

Farjallah S, Slimane B Ben, Piras CM, Amor N, Garippa G, Merella P. Molecular characterization of *Fasciola hepatica* from Sardinia based on sequence analysis

of genomic and mitochondrial gene markers. *Exp. Parasitol.* 2013; 135: 471–478.

Fernández N, Rivero CLR, Pérez CJS. Incremento de la sensibilidad analítica del sistema FasciDIG ® para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* increase of analytical sensitivity of FasciDIG ® system for the diagnosis of *Fasciola hepatica*. 2012; 64: 335–341.

Figueira GF, Oliveira VHS de, Taroda A, Alfieri AA, Headley SA. Caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos do estado do Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2014; 23: 383–386.

Filippi JJ, Quilichini Y, Foata J, Marchand B. Topography and ultrastructure of the tegument of *Lecithochirium musculus* (Digenea: Hemiuridae), a parasite of the European eel *Anguilla anguilla* (Osteichthyes: Anguillidae). *J. Morphol.* 2012; 273: 361–370.

Franco-Acuña DO, Pinheiro J, Oliveira-Menezes A, Brandolini SVPB, Souza W de, DaMatta RA. Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. *Vet. Parasitol.* 2011; 182: 201–212.

Fukuda K, Fujino T, Hamajima F 1982. Crystalline inclusions in the subtegumental cells of the adult lung fluke, *Paragonimus westermani*. *Zeitschrift für Parasitenkd.* 2011; 68: 235–238.

Gomes EM, Chagas GM, Pinheiro J 2000. The Influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. *Braz. arch. biol. technol* 2011; 43: 1–7.

Grosskopf HM, Schwertz CI, Machado G, Bottari NB, Silva ES da, Gabriel ME, Lucca NJ, Alves MS, Schetinger MRC, Morsch VM, Mendes RE, Silva AS da. Cattle naturally infected by *Eurytrema coelomaticum*: Relation between

adenosine deaminase activity and zinc levels. *Res. Vet. Sci.* 2016; 110: 79-84.

Headley SA. Bovine Eurytrematosis : Life Cycle , Pathologic Manifestations and Public Health Considerations. *Cesumar* 2000; 2: 59–62.

Headley SA, Saut JPE, Bassani CA, Sangioni LA, Junior EHB, Yamamura MH. Histopathologic patterns of pancreatic lesions induced by *Eurytrema coelomaticum* in cattle from the central-west region of the state of Paraná , southern Brazil. *Brazilian J. Vet. Pathol.* 2009; 2: 3–7.

Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Review series helminth infections: the great neglected tropical diseases. 2008; 118: 1311–1321.

IBGE a. Censo Agropecuário de 2015. [homepage na internet] Dados Gerais. [acesso em 10 de maio 2016]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=31&search=minas-gerais>

IBGE b. Hidrografia e relevo. [homepage na internet] Dados Gerais. [acesso em 25 de novembro de 2017]. Disponível em: <https://mapas.ibge.gov.br/tematicos/geomorfologia>

Ilha MRS, Loretto AP, Reis ACF. Wasting and mortality in beef cattle parasitized by *Eurytrema coelomaticum* in the state of Paraná, southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 2005; 133: 49–60.

Jefferies JR, Campbell AM, Rossum AJ Van, Brophy PM, Rossum AJ Van, Barrett J, Brophy PM. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics* 2001; 1: 1128–1132.

Jiménez B, Maya-Rendon C. Helminths and sanitation. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* 2007; 52: 60–71.

Johnson KA, Angelucci F, Bellelli A, Hervé M, Fontaine J, Tsernoglou D,

Capron A, Trottein F, Brunori M. Crystal structure of the 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. *Biochemistry* 2003; 42: 10084–10094.

Karshima NS, Bata SI, Bobbo AA, Habila A. Prevalence and risk factors of *Dicrocoelium dendriticum* and *Eurytrema pancreaticum* infections in slaughtered-cattles in Bauchi, Nigeria. *Niger. J. Parasitol.* 2016 37.

Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22: 466–483.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.

Lima CMBL, Freitas FIDS, Morais LCSL De, Cavalcanti MGDS, Silva LF Da, Padilha RJR, Barbosa CGS, Santos FAB Dos, Alves LC, Diniz MDFFM. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after in vitro exposure to allicin. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44: 327–330.

Liu GH, Xu MJ, Song HQ, Wang CR, Zhu XQ. De novo assembly and characterization of the transcriptome of the pancreatic fluke *Eurytrema pancreaticum* (trematoda: Dicrocoeliidae) using Illumina paired-end sequencing. *Gene* 2016; 576: 333–338.

Looss A, Cuffey E. On some parasites in the museum of the School of Tropical Medicine, Liverpool with a contribution on the case of distomiasis of the liver and rectum. *Ann Trop Med Parasitol* 1907; 1:123–154.

Lopes-Torres EJ, Souza W de, Miranda K. Comparative analysis of *Trichuris muris* surface using conventional, low vacuum, environmental and field emission scanning electron microscopy. *Vet. Parasitol.* 2013, 196: 409–416.

Mains JW, Mercer DR, Dobson SL. Digital image analysis to estimate numbers

of *Aedes* eggs oviposited in containers. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2008; 24: 496–501.

Mandarim-de-Lacerda CA. Avaliação quantitativa da esteatose hepática. Rio de Janeiro. Tese. Academia Nacional de Medicina, 67 p. 2010

Marcos L a, Terashima A, Gotuzzo E. Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21: 523–530.

Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet. Parasitol.* 2009; 163: 264–280.

McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012; 25: 585–608.

Mohanta UK, Ichikawa-Seki M, Hayashi K, Itagaki T. Morphological and molecular characterization of *Eurytrema cladorchis* parasitizing cattle (*Bos indicus*) in Bangladesh. *Parasitol. Res.* 2015; 114: 2099–2105.

Morales A, Espino AM. Evaluation and characterization of *Fasciola hepatica* tegument protein extract for serodiagnosis of human fascioliasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19: 1870–1878.

Mota GG, Almeida MN de. Conquiliomorfometria, crescimento alométrico e ciclo de vida de *Dysopeas muibum* (Marcus & Marcus, 1968) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de campo. *Rev. Eletrônica Biol.* 2012; 5: 83–99.

Ndlovu T, Chimonyo M, Muchenje V. Monthly changes in body condition scores and internal parasite prevalence in Nguni, Bonsmara and Angus steers raised on sweetveld. *Trop Anim Heal. Prod* 2009; 41: 1169–1177.

Neuhaus W. Die Metrik des Uteruswachstums bei digenen Trematoden. *Zeitschrift für Parasitenkd.* 1978; 55: 209–221.

Otubanjo OA. Scanning electron microscopic studies of body surface and external genitalia of a dicrocoeliid trematode, *Concinnim epomopsis* Sandground 1973. *Parasitenkunde* 1985; 71: 495–504.

Paola A, Damborenea MC. Tegumentary ultrastructure (SEM) of preadult and adult *Lobatostoma jungwirthi* (Kritscher, 1974) (Trematoda: Aspidogastrea). *Comp. Parasitol.* 2001; 68: 249–255.

Pinheiro J, Franco-Acuña DO, Oliveira-Menezes A, Brandolini SVPB, Adnet FAO, Lopes Torres EJ, Miranda FJB, Souza W De, Damatta RA. Additional study of the morphology of eggs and miracidia of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda). *Helminthol.* 2015; 52: 244–251.

Pinheiro J, Franco-Acuña DO, Oliveira-Menezes A, Paschoal Blanco Brandolini SV, DaMatta RA, Souza W de. New insight into the morphology of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae) cercariae by light, scanning, and transmission electron microscopies. *Parasitol. Res.* 2012; 111: 1437–1445.

Pires JA de À. A Cadeia Produtiva de Carne Bovina no Brasil Mercado Internacional e Nacional. In: *III Simpósio Produção Gado Corte*, 2000, pp. 1–376.

Quevedo P de S, Mendes M, Felipe GP, Soares MP, Muller G, Farias NA da RF. Pancreatite intersticial crônica em bovino causada por *Eurytrema coelomaticum*. *Ciência Rural* 2013; 43: 1449–1452.

Ribeiro CM, Lima DE de, Katagiri S. Importância do exame coprológico no diagnóstico da euritrematose bovina. *Veterinária e Zootec.* 2013; 20: 70–73.

Rosati JY, Pacheco VA, Vankosky MA, Vanlaerhoven SL. Estimating the

number of eggs in blow fly (Diptera: Calliphoridae) egg masses using photographic analysis. *J. Med. Entomol.* 2015; 52: 658–662.

Sakamoto T, Kono IS, Yasuda N, Yamamoto Y, Nakagawa H. Studies on *Eurytrema coelomaticum* II.: The Anthelmintic efficiency of nitroxynil and praziquantel against *Eurytrema coelomaticum* in cattle. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.* 198; 16: 93–101.

Sakamoto T, Oikawa T. Cubic crystal protein inclusions in the neodermis of the pancreatic fluke, *Eurytrema pancreaticum*, and *Eurytrema coelomaticum*. *Parasitol. Res.* 2007; 101: 1393–1399.

Schwartz CI, Carmo GM do, Bottari NB, Silva ES da, Gabriel ME, Lucca NJ, Guarda N dos S, Moresco RN, Machado G, Morsch VM, Schetinger MRC, Stefani LM, Mendes RE, Silva AS da. Relationship between pathological findings and cholinesterase activity and nitric oxide levels in cattle infected naturally by *Eurytrema coelomaticum*. *J. Comp. Pathol.* 2016a; 154: 150–156.

Schwartz CI, Gabriel ME, Henker LC, Bottari NB, Carmo G do, Guarda N dos S, Moresco RN, Machado G, Morsch VM, Schetinger MRC, Stedille FA, Baska P, Mattei V, Silva AS da, Mendes RE. Oxidative stress associated with pathological changes in the pancreas of cattle naturally infected by *Eurytrema coelomaticum*. *Vet. Parasitol.* 2016b; 223: 102–110.

Shalaby HA, El Namaky AH, Kamel RA, Derbala AA. Tegumental surface changes in adult *Paramphistomum microbothrium* (Fischöeder 1901) following in vitro administration of artemether. *J. Helminthol.* 2010; 84: 115–122.

Silva LC, Meireles LMO, Junqueira FO, Bessa ECA. Influência da umidade do substrato sobre crescimento, produção de ovos e sobrevivência de *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae) sob condições de laboratório. *Rev. Brasileira Biotecnologia* 2009; 7: 144–149.

Singh A, Upadhyay V, Panda AK. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 99: 303–310.

Sobhon P, Apinhasmit W. *Opisthorchis viverrini*: The tegumental cytoskeleton. *Int. J. Parasitol.* 1995; 25: 787–796.

Stunzenas V, Petkeviciute R, Poddubnaya LG, Staneviciute G, Zhokhov AE. Host specificity, molecular phylogeny and morphological differences of *Phyllodistomum pseudofolium* (Nybelin, 1926) and *Phyllodistomum angulatum* (Linstow, 1907) (Trematoda: Gorgoderidae) with notes on Eurasian ruffe as final host for *Phyllodistomum* spp. *Parasit. Vectors* 2017; 10: 286.

Tessele B, Brum JS, Barros CSL. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. *Pesqui. Vet. Bras.* 2013; 33: 873–889.

Traub RJ, Robertson ID, Irwin PJ, Mencke N, Thompson RC a A. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India. *Trends Parasitol.* 2005; 21: 42–48.

Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Public health drug development for neglected diseases : a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet Infect. Dis. public Heal.* 2002; 359: 2188–2194.

Valero MA, Panova M, Mas-Coma S. Developmental differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke populations from Bolivian highlands and European lowlands. *Parasitol. Res.* 2001; 87: 337–342.

Verma A. The marker based watershed segmentation - A Review. *Int. J. Eng. Innov. Technol.* 2013; 3: 171–174.

Vial HJ, Fairlamb AH, Ridley RG. Renewed strategies for drug development against parasitic diseases. *Parasitol. Today* 1999; 15: 393–394.

Wiroreno W, Carney WP, Ansori M. Description and growth pattern of

Eurytrema pancreaticum from *Bos indicus* from East Java. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 1987; 54: 73–77.

Yamamura MH. Algumas avaliações sobre a patologia e controle da euritrematíase bovina. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado], Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1989; 128p. Disponível em: <http://r1.ufrj.br/wp/ppgcv/wp-content/themes/PPGCV/pdf/R103.pdf>.

Zheng Y, Luo X, Jing Z. Comparison of 18S ribosomal RNA gene sequences of *Eurytrema coelomaticum* and *Eurytrema pancreaticum*. *Parasitol. Res.* 2007; 100: 645–646.

Zhu SZS, Xia X, Zhang Q, Belloulata K. An image segmentation algorithm in image processing based on threshold segmentation. *IEEE Conf. Signal-Image Technol. Internet-Based Syst.* 2007 : 679–684.