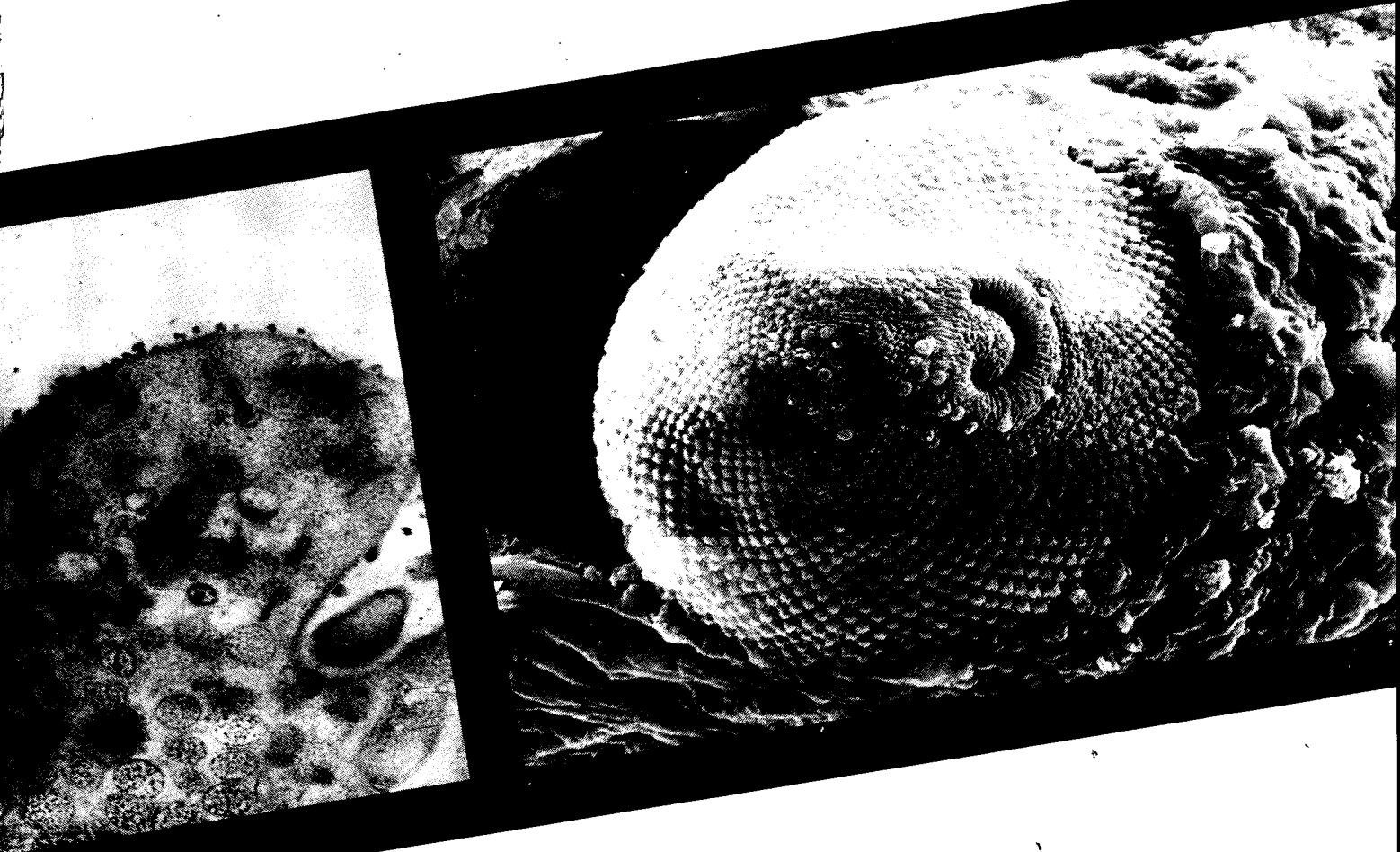


Fernanda Maria Melo Russell Cortez Barbosa Pinto



**ESPÉCIES DE DIGenea QUE INFECTAM
CERASTODERMA EDULE (N.V. BERBIGÃO) EM
PORTUGAL. CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA
DO HOSPEDEIRO À INFESTAÇÃO**

PORTO
1993

**ESPÉCIES DE DIGENEA QUE INFECTAM
CERASTODERMA EDULE (N.V. BERBIGÃO) EM
PORTUGAL. CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA
DO HOSPEDEIRO À INFESTAÇÃO**

Fernanda Maria Melo Russell Cortez Barbosa Pinto

**ESPÉCIES DE DIGENEA QUE INFECTAM
CERASTODERMA EDULE (N.V. BERBIGÃO) EM
PORTUGAL. CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA
DO HOSPEDEIRO À INFESTAÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, NA ESPECIALIDADE DE IMUNOLOGIA,
APRESENTADA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DE ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO
1993

De acordo com o disposto no nº 2 do Artigo 8º do Decreto-lei nº 388/70, esta tese inclui resultados já publicados e outros a publicar, nos seguintes artigos:

Russell-Pinto, F., 1990. Differences in infestation intensity and prevalence of hinge and mantle margin *Meiogymnophallus minutus* metacercariae (**Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* (*Bivalvia*): possible species coexistence in Ria de Aveiro. *J. Parasitol.*, **76**: 653-659.

Russell-Pinto, F. and Bartoli, P., 1992. Sympatric distribution of *Meiogymnophallus minutus* and *M. fossarum* (Digenea: **Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* in the Ria de Aveiro estuary in Portugal. *Parasitol. Res.*, **78**: 617-618.

Russell-Pinto, F., Reimão, R. and de Sousa, M., 1993. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Molluca, *Bivalvia*): Distinct cell types engage in different responses to SRBC *Fish and Shellfish Immunology* (submetido para publicação)

Russell-Pinto, F., 1993. Ultrastructural study of the tegument of *Meiogymnophallus minutus* metacercaria (Digenea: **Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* in Portugal. *J. Parasitol.*, (submetido para publicação).

Russell-Pinto, F., 1993. Ultrastructural study of developmental stages of *Meiogymnophallus minutus* (Digenea: **Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* in Portugal. *Parasitol. Res.* (submetido para publicação).

Os artigos incluídos nesta tese estão autorizados por "Copyright", assinado entre os autores e a revista, a poderem ser utilizados para este fim.

Aos meus Pais

Ao Rui

À Bárbara Maria
Ao Fernando Rui
Ao Paulo Alexandre

Agradecimentos

À Professora Maria de Sousa quero agradecer em primeiro lugar, expressando todo o meu reconhecimento pela oportunidade que me deu de integrar o seu grupo de trabalho. Quero no entanto realçar todo o apoio e incentivo que sempre encontrei da sua parte e, sobretudo, a sua orientação no tema proposto com os seus conselhos, críticas e sugestões na discussão dos resultados obtidos.

Ao Professor Pierre Bartoli quero agradecer toda a colaboração esclarecida e amigável que me tem prestado e que, de início, me encorajou a desenvolver o estudo dos digéneos em Portugal.

Na Professora Corália Vicente encontrei a disponibilidade e o interesse pelo objectivo deste trabalho que permitiram a análise estatística dos resultados obtidos e as sugestões na revisão desta tese, que muito agradeço.

Aos Professores Eric Bowers e Brian James agradeço o interesse demonstrado nos resultados que estavam a ser obtidos, por nós, em Portugal, e a discussão dos mesmos a quando das suas deslocações ao ICBAS em 1991 e 1993.

Ao Professor João Coimbra agradeço o apoio e as palavras de incentivo que sempre me ajudaram na prossecução do meu trabalho.

À Dr.^a Raquel Reimão agradeço a colaboração prestada no trabalho em conjunto, que contribuiu para a obtenção de parte dos resultados, e a disponibilidade que sempre demonstrou nas ajudas prestadas.

O trabalho apresentado não teria sido possível sem o apoio daqueles que, duma ou doutra forma, para ele contribuíram e a quem expresseo o meu reconhecimento, destacando:

D. Teresa Barandela, D. Antonieta Carvalho, D. Paulete Dias, Maria do Rosário Lima e Isabel Cristina Mota.

Da mesma forma quero agradecer à Dr^a Alexandra Manaia, ao Dr. José Manuel Cabeda e a todos os que trabalham no Laboratório do Mestrado de Imunologia pela colaboração prestada e pelo bom ambiente de trabalho que me foi proporcionado.

Ao Departamento de Biologia Celular do ICBAS e ao Centro de Materiais da Universidade do Porto agradeço a disponibilidade da utilização dos microscópios electrónicos de transmissão e varrimento.

Aos que comigo trabalham no Laboratório de Zoologia Aquática, D. Conceição Mariano, Sandra Marisa Fontes e Dr^a Sofia Santos agradeço o apoio e a colaboração que me têm dispensado.

À sr. D. Maria Laura Pires Teixeira, responsável pela tradução para francês do resumo da tese, agradeço o seu trabalho.

Para a apresentação final desta tese foi imprescindível a contribuição dos Serviços de Iconografia, dos Serviços de Desenho e dos Serviços de Reprografia do ICBAS, que muito agradeço..

Não poderia terminar sem uma palavra de profundo agradecimento a todos aqueles, que são muitos e pelo que não os poderei nomear, que sempre me dedicaram a sua atenção e uma palavra amiga. Entre estes quero destacar a minha família pelo apoio e compreensão que manifestaram ao longo do trabalho, o que inclui nomeadamente uma participação activa nos trabalhos de campo.

Parte do trabalho foi feita com o apoio do programa de investigação e desenvolvimento da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT), através do projecto 87.203/Mar.

JUSTIFICAÇÃO DO TRABALHO APRESENTADO

O Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar ministra uma licenciatura em Ciências do Meio Aquático, vocacionada para a investigação em diversos campos da Biologia, entre os quais a Aquacultura de moluscos, crustáceos e peixes, a que não pode ser estranho o estudo de aspectos sanitários e parasitológicos. Assim, na qualidade de responsável pelo Laboratório de Zoologia Aquática, pareceu-me importante iniciar o despiste de parasitas em Bivalves, a nível do grupo Platyhelmintha, classe Trematoda, sub-classe Digenea, pela sua documentada importância na aquacultura de Bivalves e de Peixes.

Logo de início, como assistente no departamento de Biologia Celular e em estreita colaboração com o Prof. Carlos Azevedo, encontrámos uma espécie de Trematoda Digenea, no bivalve *Cerastoderma edule*, pertencente ao género *Meiogymnophallus*, na fase do ciclo evolutivo em que o digéneo utiliza *C. edule* como hospedeiro intermediário. Na continuidade deste despiste parasitológico preliminar em *C. edule* foram também encontradas outras espécies de digéneos. Tornou-se então aparente que em Portugal muito pouco parecia ser conhecido com respeito às espécies por mim observadas pelo que procedi a contactos com investigadores portugueses e estrangeiros. Após o envio de fotografias à Sr.^a Dr.^a Manuela Simões, do Instituto de Investigação Científica Tropical, ao Professor Benard Fried do Lafayette College (E.U.A.) que por sua vez indicou o Dr. Robin Overstreet do Gulf Coast Research Laboratory (E.U.A.), todos foram unânimes em que o Professor Pierre Bartoli da Universidade de Marselha seria a pessoa mais indicada para me esclarecer sobre a posição sistemática e determinação dessas espécies de digéneos. O Prof. Bartoli veio de facto a disponibilizar-se para me auxiliar e esclarecer neste novo campo incentivando-me a desenvolver o estudo então iniciado e agora apresentado.

Estavam assim reunidos os elementos que, à partida, poderiam contribuir para obter resposta à minha pergunta inicial:

- Quais as espécies de digéneos que infectam *C. edule* em Portugal, qual a prevalência e intensidade da infestação ?

A partir desta primeira pergunta foram considerados outros aspectos habitualmente estudados noutros digéneos:

- Qual a morfologia a nível ultrastrutural que estes animais apresentam ?

- O que se observa a nível da interface hospedeiro-parasita ?

Estava também em presença dum animal modelo, *C. edule*, que à partida reunia as condições para o estudo do seu sistema interno de defesa, não conhecido. A oportunidade de iniciar o estudo dos meios internos de defesa de *C. edule* face à infestação por parasitas surgiu com o interesse manifestado pela Prof.^a Maria de Sousa e alguns dos seus colaboradores e à inserção do Laboratório do Mestrado de Imunologia numa rede Erasmus sobre Filogenia da Resposta Imune, dirigida pelo grupo de Wageningen.

Inicialmente, pensámos que a tese incidiria principalmente, sobre "O Estudo da resposta das células circulantes de *Cerastoderma edule* a agentes externos antigénicos e ambientais". No entanto ao chegar ao fim do trabalho verificámos que a parte da caracterização das espécies de digéneos encontrados tinha vindo a ter um peso igual, se não superior, ao estudo da resposta. Daí o título com que a tese é agora apresentada:

"ESPÉCIES DE DIGENEA QUE INFECTAM O BIVALVIA *CERASTODERMA EDULE* (N.V. BERBIGÃO) EM PORTUGAL. CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO À INFESTAÇÃO".

ÍNDICE

| Capítulo 1 | Pág. |
|---|-------------|
| 1 - Introdução geral | 7 |
| 1. 1 - Aspectos gerais do ciclo evolutivo de Trematoda Digenea | 11 |
| 1. 2 - Trematoda Digenea parasitas de <i>C. edule</i> | 18 |
| 1. 3 - Sistema de defesa interno de <i>C. edule</i> | 29 |
| 1. 4 - Propósito do trabalho | 30 |
| Capítulo 2 | |
| 2 - Material e métodos | 33 |
| 2. 1 - Moluscos: espécies e número de animais estudados | 33 |
| 2. 2 - Locais de colheita | 34 |
| 2. 3 - Caracterização macroscópica dos parasitas | 41 |
| 2. 4 - Sistema interno de defesa de <i>Cerastoderma edule</i> | 42 |
| 2. 5 - Observação morfológica | 45 |
| Microscopia óptica | |
| Microscopia electrónica de varrimento | |
| Microscopia electrónica de transmissão | |
| 2. 6 - Análise de dados | 48 |
| Capítulo 3 | |
| Differences in infestation intensity and prevalence of hinge and mantle margin <i>Meiogymnophallus minutus</i> metacercariae (Gymnophallidae) in <i>Cerastoderma edule</i> (Bivalvia): possible species coexistence in Ria de Aveiro | 49 |
| Capítulo 4 | |
| Sympatric distribution of <i>Meiogymnophallus minutus</i> and <i>M. fossarum</i> (Digenea: Gymnophallidae) in <i>Cerastoderma edule</i> in the Ria de Aveiro estuary in Portugal | 59 |

Capítulo 5

- 5 - Morfologia dos Digenea parasitas de *C. edule* da Ria de Aveiro
Hiperparasitismo
Observações noutros locais de Portugal. 63
5. 1 - Caracterização morfológica dos Digenea parasitas de *C. edule*
da Ria de Aveiro 65
- Meiogymnophallus minutus* (Cobbold, 1859)
 - Meiogymnophallus fossarum* (Bartoli, 1965)
 - Gymnophallus choledochus* Odhner, 1900
 - Gymnophallus rebecqui* Bartoli, 1983
 - Labratrema minimum* (Stossich, 1887)
 - Himasthla quissetensis* Miller e Northrup, 1926
 - Cercaria cerastodermæ* I Sannia, James, Bowers, 1978

Capítulo 6

- 6 - Caracterização ultrastrutural da morfologia dos Digenea parasitas de *C. edule* 93
6. 1 - Ultrastructural study of the development stages of *Meiogymnophallus minutus* (Digenea: **Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* in Portugal 95
6. 2 - Ultrastructural study of the tegument of *Meiogymnophallus minutus* metacercaria (Digenea: **Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* (Bivalvia) in Portugal 111
6. 3 - Ultrastrutura das fases do ciclo evolutivo de *G. choledochus* 137
6. 4 - Ultrastrutura das fases do ciclo evolutivo de *L. minimum* 147
6. 5 - Ultrastrutura das fases do ciclo evolutivo de *H. quissetensis* 148

Capítulo 7

- 7 - Distribuição da infecção de *C. edule* por Digenea. Prevalência, Intensidade e efeito interactivo da presença de diferentes espécies de parasitas. 151
7. 1 - Parâmetros físicos da água nas estações de colheita 153
7. 2 - Distribuição da infecção de *C. edule* por Digenea. Prevalência, Intensidade e efeito interactivo da presença simultânea das diferentes espécies de parasitas. 155

Capítulo 8

- 8 - Caracterização das células circulantes do sistema de defesa interno de *C. edule*. Diferentes tipos de hémocitos envolvidos na resposta à estimulação por SRBC. 175
8. 1 - Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) distinct cell types engage in different response to SRBC. 177

Capítulo 9

| | |
|---|-----|
| 9 - Sistema interno de defesa de <i>C. edule</i> na presença de parasitas e / ou em resposta ao "stress" pelo frio. | 203 |
| 9. 1 - Variação da concentração de hemócitos de <i>C. edule</i> não parasitado e parasitado. | 205 |
| 9. 2 - Variação da concentração celular de <i>C. edule</i> com o tempo e a temperatura. | 208 |
| 9. 3 - Tipos de células envolvidos na resposta de <i>C. edule</i> ao "stress" pelo frio. | 210 |

Capítulo 10

| | |
|---|-----|
| 10 - Discussão | 215 |
| Parte I - Despiste e caracterização dos Digenea. | 218 |
| Parte II - Sistema interno de defesa de <i>C. edule</i> . | 220 |
| Referências | 223 |
| Resumo | 237 |
| Abstract | 241 |
| Résumé | 245 |

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Em Portugal o berbigão, *Cerastoderma edule*, tem uma importância social e económica apreciável. A título de exemplo, na Ria de Aveiro, são colocadas no mercado para consumo público interno cerca de duas mil toneladas por ano e trinta toneladas são exportadas anualmente. A apanha de berbigão na Ria de Aveiro contribui para a subsistência de cerca de 200 famílias (J. Bela, Centro de Pescas de Aveiro, informação pessoal).

No Algarve, e em particular na Ria Formosa, está estabelecida uma produção anual de sete mil toneladas de bivalves, o que corresponde a cerca de 90 % dos bivalves consumidos no país, principalmente ameijoas e berbigão, estimando-se em cerca de 8.000 pessoas, as que trabalham nos viveiros de bivalves (Muzavor, 1991). Recentemente, em Fevereiro de 1993, junto à foz do rio Douro, levantou-se uma polémica entre os pescadores da pesca artesanal da Afurada e a Capitania dos portos do Douro e Leixões por esta ter proibido a apanha de berbigão, actividade de que dependia a sobrevivência de 400 pescadores .

Fazendo assim parte da dieta alimentar humana, *C. edule* tem implicações na Saúde Pública. Como um dos elos da cadeia alimentar de peixes, aves aquáticas e de invertebrados, *C. edule* infectado pode também influenciar a saúde destes hospedeiros. Em Portugal o impacto da infecção por tremátodes digéneos sobre os seus hospedeiros parece, no entanto, não estar devidamente estudado. Estudos feitos noutros países indicam que a infestação por tremátodes digéneos pode ter uma importância apreciável na morbilidade e mortalidade dos hospedeiros. Diferenças da susceptibilidade dos hospedeiros à infecção podem, por sua vez, ter como consequência variações na representação das diferentes espécies em regiões particulares.

Os tremátodes digéneos são responsáveis por chistosomiases, equinostomiases, microceliases, clonorquiases. Estas patologias constituem um perigo

não só para a saúde humana mas também para outras espécies animais, nomeadamente bovinos, ovinos, suínos, equinos e animais domésticos (Cheng, 1978, Fig.1. 1).

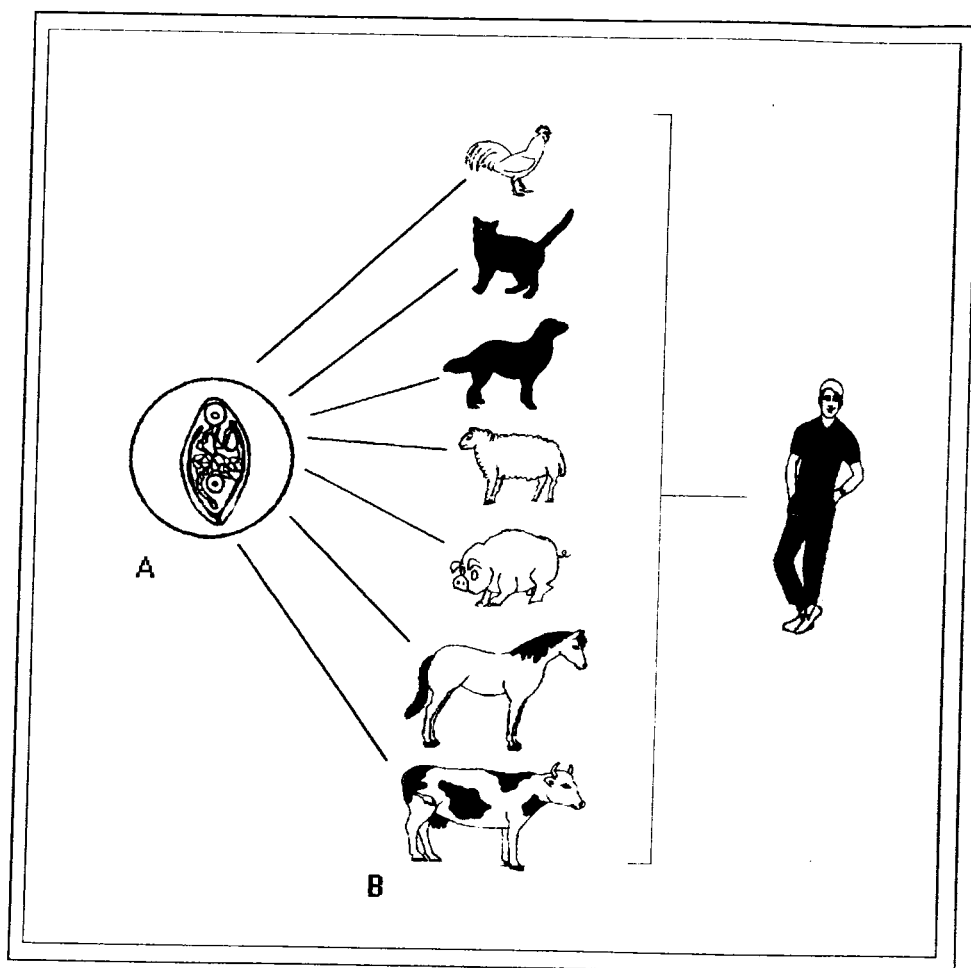


Fig. 1. 1 - A infestação por Trematoda Digenea (A) de animais domésticos (B) pode causar patologias graves no homem

A grande maioria dos peixes com importância comercial são também parasitados por tremátodes digéneos (ver lista pag. 437 a 462, Reichenbach-Klinke e Landolt, 1973). Os bucefalídeos podem ocasionar importantes perdas, baixas na produtividade ou tornar a carne dos peixes infectados sem paladar.

Os sanguinicolídeos apresentam uma prevalência elevada, na fase adulta, nos teleósteos, principalmente em espécies de exploração comercial (Kinne, 1983). Além destes, os felodistomídeos causam o desgaste das substâncias de reserva do hospedeiro, tornando os tecidos flácidos e contribuindo para a castração dos bivalves hospedeiros, na maior parte dos casos de alto valor comercial como no caso da ameijoia preta e mexilhão, ocasionando grandes flutuações na abundância dos lamelibrânquios. Outra família de digéneos que é patogénica para os peixes, principalmente enguias e linguados, é a família **Monorchiidae**. Outros digéneos, tais como os lepocradídeos e os zoganídeos, parasitam peixes na fase adulta. Estes grupos têm também bivalves comercialmente importantes como hospedeiros primários ou intermediários, causando-lhes importantes danos tais como debilidade física, modificações na textura da carne do animal ou a sua morte. No entanto, a maioria das espécies de digéneos atingem a sua fase adulta em aves. Entre os tremátodes digéneos que atingem a sua fase adulta em aves, situam-se as famílias **Gymnophallidae**, **Echinostomatidae**, **Psilostomatidae** e **Renicollidae**. As suas metacercárias, geralmente em grande número, causam patologias graves nestes bivalves, podendo destacar-se os seguintes efeitos: debilidade, deformações e erosão química da concha, produção de concreções calcárias, hipertrofia ou atrofia dos tecidos afectados, alterações do comportamento do hospedeiro facilitando a sua detecção pelo hospedeiro definitivo, aumento das necessidades de oxigénio, modificações da resposta do hospedeiro ao "stress" ambiental, autotomia de partes do corpo, como por exemplo dos sifões e a morte do hospedeiro quando em infestações elevadas (Kinne, 1983).

O aparecimento de espécies geneticamente "resistentes" à infecção por certos digénios pode constituir uma ilustração da influência destes parasitas na evolução de espécies numa região particular. Assim, Coustau *et al.* (1990; 1991b) num estudo da infecção por *Prosorhynchus squamatus* em *Mytilus edulis* e em híbridos de *M. edulis* e *M. galloprovincialis* verificou uma prevalência de infecção muito mais elevada na

população de *M. edulis* (Coustau *et al.*, 1990; 1991b). Uma descrição semelhante tinha sido publicada anteriormente por Le Brun (1988) num estudo comparativo da infecção, pelo monogéneo *Diplozoon gracile*, de *Barbus meridionalis* e de híbridos de *B. barbatus* e *B. meridionalis*.

Estes resultados levam ao reconhecimento da importância do parasitismo no equilíbrio de populações de hospedeiros existentes num determinado local.

O impacto da infecção por digéneos pode assim afectar os componentes dos ecossistemas litorais. Ao provocar a redução do potencial de reprodução do hospedeiro, por castração (Coustau *et al.* 1991a), ao provocar modificações no crescimento e comportamento, contribuindo para a morte dos mesmos, os parasitas podem manifestamente afectar o equilíbrio da representação de espécies numa determinada região. A contribuição do elemento infecção e susceptibilidade à infecção por estes parasitas é, no entanto, frequentemente negligenciado pelos ecologistas.

Em 1970 Stunkard afirmava que "um conhecimento mais profundo dos ciclos de vida permitirá o uso mais inteligente e efectivo duma metodologia que permita uma redução da patologia, uma melhoria nos aspectos sanitários e a conservação dos recursos naturais". Esta afirmação parece não ter perdido actualidade (Laukner, 1987; Jonsson e André, 1992). Pelo contrário as necessidades crescentes de uma alta produtividade na criação de peixes, crustáceos e bivalves em condições de cativeiro vem ilustrar cada vez melhor o impacto potencial que pode advir da infecção daqueles hospedeiros por digéneos, em aquacultura.

Os tanques de criação são locais propícios ao desenvolvimento de infecções parasitárias e consequente contaminação das espécies, o que contribui para a redução da produtividade dessas explorações (Ratcliffe e Rowley, 1981; Coustau *et al.*, 1990). Do exposto se infere a necessidade e a oportunidade de pesquisas feitas sobre este grupo animal.

1. 1 - ASPECTOS GERAIS DO CICLO EVOLUTIVO DE TREMATODA DIGENEA

Considerando o ciclo de vida típico dum trematode digéneo, este pode utilizar dois, três ou mais hospedeiros.

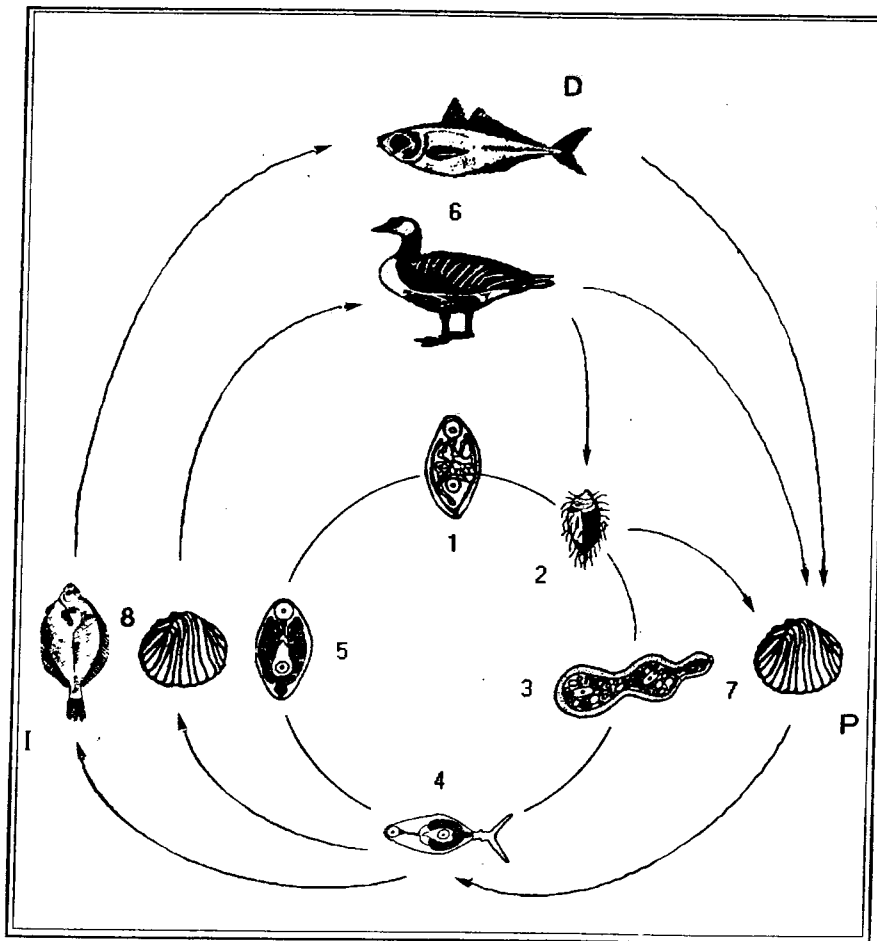


Fig. 1. 2 - Esquema dos ciclos evolutivos de Digenea que parasitam *Cerastoderma edule*: 1- adulto; 2-miracídio ; 3 - esporoquisto; 4 - cercária; 5 - metacercária.; 6 - hospedeiro definitivo (D); 7 - hospedeiro primário (P); 8- hospedeiro intermediário(I). (1,3,4,5, adaptado de Sannia,1977)

Hospedeiro definitivo - designa-se por hospedeiro definitivo a espécie em que o digéneo desenvolve a fase adulta. O hospedeiro definitivo é geralmente um Vertebrado. No caso das espécies que infectam *Cerastoderma edule* os hospedeiros definitivos são Aves aquáticas (*Haematopus ostralegus*, *Larus argentatus*, *Melanitta nigra*, *Calidris alpina*, *Aythya ferina*, *Tadorna tadorna*, entre outras) e Peixes (Osteictícos), *Dicentrarchus labrax*

Hospedeiro primário - denomina-se hospedeiro primário a espécie em que se desenvolve a fase de esporoquisto, onde se efectua a maturação da larva denominada cercária ou cercário. É num invertebrado que estas fases se desenvolvem. No caso dos digéneos que infectam *C. edule* os hospedeiros primários são moluscos bivalves, nomeadamente *C. edule* e *Scrobicularia plana*.

Hospedeiro intermediário - chama-se hospedeiro intermediário ou vector o invertebrado ou vertebrado em que tem lugar o desenvolvimento da cercária em metacercária. No caso dos digéneos que infectam *C. edule* os hospedeiros intermediários são bivalves (*C. edule*), anelídeos (*Nereis diversicolor*) e peixes teleosteos (*Atherina mochon*, *A. hepsetus*, *Pomatoschistus microps* e *Liza ramada*).

Ciclo de vida - o ciclo de vida dos digéneos em que *C. edule* intervem como hospedeiro primário ou intermediário está esquematizado na figura 1. 2

Dada a complexidade do ciclo evolutivo dos Digéneos passamos a referir em pormenor a sua constituição, resumida na figura 1. 3 (Meglitsch, 1983).

Os zigotos, provenientes do animal adulto (Fig. 1.3A), envolvidos pela casca do ovo (Fig. 1.3B), são expelidos através do poro genital para o lúmen do intestino do hospedeiro saindo para o exterior juntamente com as fezes. Nalguns casos é o próprio parasita, cheio de ovos, que é expelido pelo hospedeiro. Uma vez na água os ovos eclodem dando origem a uma forma larvar ciliada, livre e nadadora, microscópica, denominada miracídio (Figs. 1.2-2 e 1.3C).

O miracídio possui um aparelho digestivo rudimentar, dois gânglios cerebróides, quatro ocelos, duas glândulas cefálicas, também denominadas de penetração, dois protonefrídeos e um conjunto de células embrionárias situadas posteriormente (Beaumont e Cassier, 1981). Ao encontrar o hospedeiro primário (Fig. 1.2P), que é na maioria dos casos um molusco, é atraído por ele por quimiotactismo, penetra o tegumento do hospedeiro, utilizando órgãos cefálicos especializados

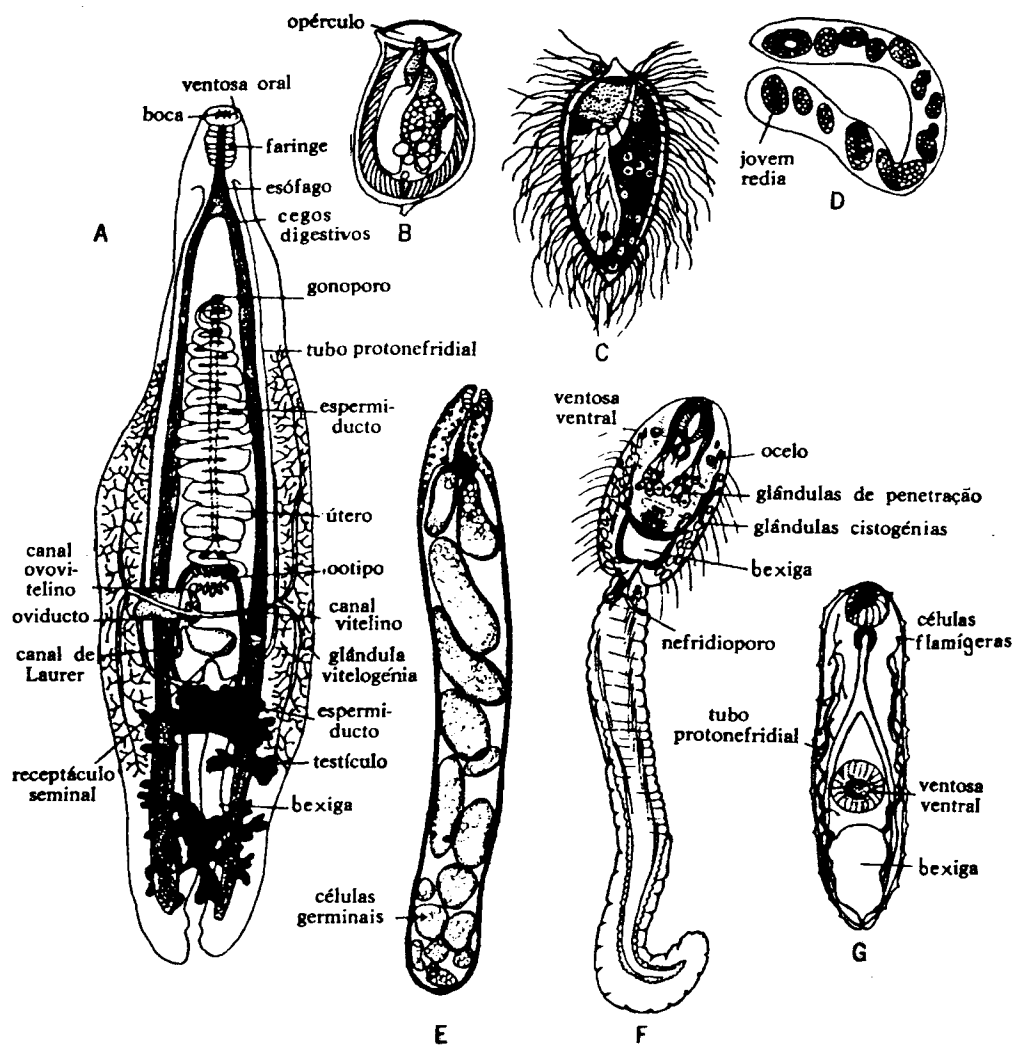


Fig. 1. 3 - Fases do ciclo de vida de *Opisthorchis sinensis*. A - Adulto. B - Cápsula com miracídio. C - Miracídio. D - Esporoquisto contendo rédias. E - Rédias. F - Cercária. G - Metacercária (segundo Meglitsch).

(Harrison e Bogitsh, 1991) perdendo a epiderme ciliada e os órgãos vitais, e migra, através dos vasos do sistema circulatório ou dos tecidos, até à glândula digestiva (também denominada hepatopâncreas), lugar escolhido para o seu desenvolvimento ulterior. A sua presença tem sido também referida noutros órgãos como na brânquia, na gónada e no manto (Cheng, 1981).

Nalguns casos os ovos podem ser ingeridos pelo próprio molusco, eclodindo já no seu interior e atingindo directamente a glândula digestiva. Uma vez atingida a glândula digestiva tem lugar a transformação na fase seguinte, de esporoquisto (Figs. 1.2- 3 e 1.3D).

No interior do esporoquisto mãe existe um espaço denominado câmara de incubação, onde se formam as células germinais. Estas células dividem-se várias vezes e constituem esferas germinais podendo originar uma nova fase, denominada rédia, ou a geração larvar seguinte do ciclo de vida destes vermes, denominada cercária.

O esporoquisto da primeira geração ou esporoquisto mãe, tem a forma de saco mais ou menos longo, podendo dar origem a uma ou várias gerações de esporoquistos filhos com formas variadas, por vezes muito ramificadas e coloridas. No caso do desenvolvimento ser através de rédias (Fig. 1.3E), estas, embora também em forma de saco, diferem dos esporoquistos por possuírem uma abertura anterior, uma faringe muscular, onde se inicia um saco digestivo cego. As rédias podem originar, por gemulação, rédias filhas, cujas esferas germinais formadas no seu interior vão originar cercárias (Cheng, 1978; Schell, 1982; Storer *et al.*, 1982).

A cercária (Figs. 1.2-4 e 1.3F) tem, na maioria dos casos, a forma foleácea, é achatada dorsoventralmente e possui uma cauda que pode apresentar diversas formas características (Fig. 1. 4). Nalgumas espécies as cercárias são desprovidas de cauda. A sua morfologia é já um esboço da do adulto, dada a presença de duas ventosas, oral e ventral ou acetabulum, órgãos sensoriais, aparelho digestivo bifurcado em dois sacos cegos, gânglios nervosos, aparelho excretor constituído por um número

específico de células flamígeras ligadas por canais colectores laterais, que abrem na vesícula excretora (Cheng, 1978; Beaumont e Cassier, 1981). Esta apresenta uma grande diversidade de formas e tamanhos. Possuem glândulas epiteliais tegumentares pré-acetabulares, como cistogêneas e cefálicas de penetração, podendo contribuir para a saída da cercária do esporoquisto e do hospedeiro, para a formação da parede do quisto que na maioria das espécies vai envolver a fase larvar seguinte ou ainda para a penetração no hospedeiro intermediário (Fig. 1I).

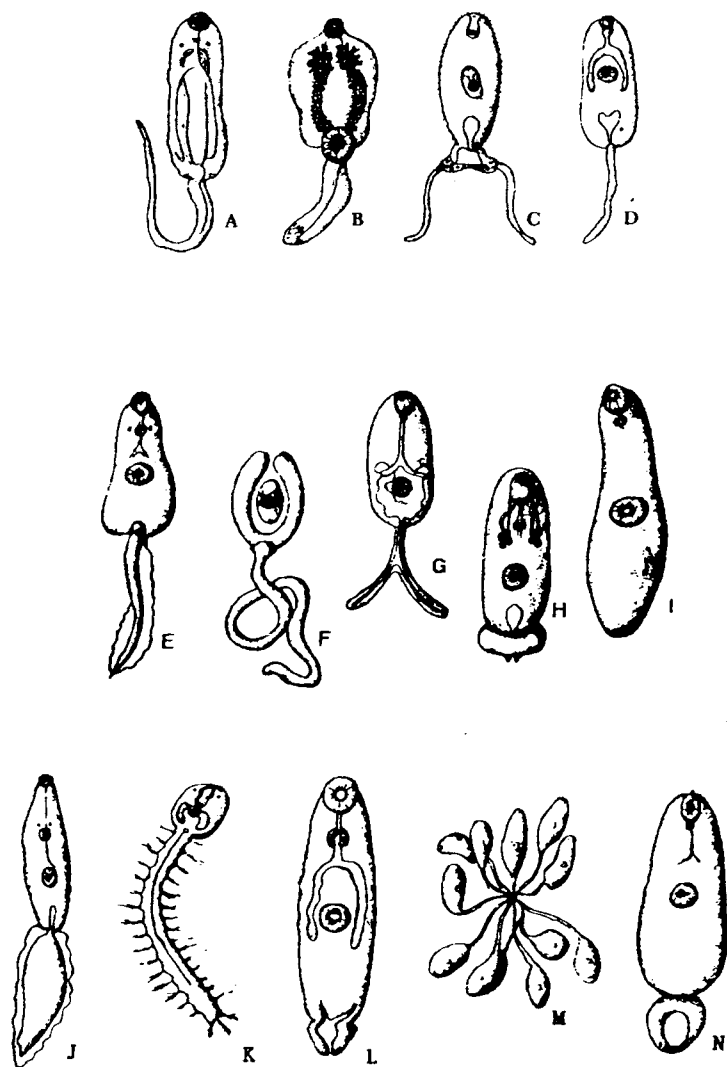


Fig. 1. 4 - Alguns tipos morfológicos de cercárias: A-Monostoma. B- Anfistoma. C- Gasterostoma. D-Distoma. E- Pleurolofocerca. F- Cisticerca. G- Furcocerca. H- Microcerca. I- Gimnofala. J-Ropalocerca. K- Tricocerca. L- Cercária. M- Rat-king. N- Cotilocerca (segundo Cheng).

As pós-acetabulares segregam substâncias intervenientes na adesão da cercária ao substrato ou ao hospedeiro (Fried e Haseeb, 1991). O aparelho sexual não se encontra diferenciado nesta fase larvar. A cercária abandona o molusco hospedeiro perfurando a parede do esporoquisto ou através do orifício de postura da rédia, transformando-se numa larva livre e nadadora. Quando encontra o hospedeiro intermediário, um invertebrado ou vertebrado, penetra-o, "procurando" o órgão que vai constituir o seu microhabitate ou microbiótopo, onde se desenvolve e permanece. Perde a cauda, enquistando-se na maioria dos casos, podendo ou não modificar a morfologia do tegumento e dos órgãos de fixação. Nesta nova fase, toma o nome de metacercária .

A metacercária (Figs. 1.2-5 e 1.3G) é uma réplica do adulto, iniciando-se a diferenciação das gónadas embora ainda não sendo funcionais. Nesta fase dá-se uma distensão da vesícula excretora, situada posteriormente, podendo apresentar dois ramos laterais mais ou menos desenvolvidos, chegando a atingir a região da faringe, cheia de corpúsculos discoides refringentes, que são produtos de excreção armazenados na vesícula (Koie, 1985). Esta permanece no hospedeiro intermediário, enquistada ou não, até que este seja ingerido por um vertebrado, o hospedeiro definitivo (Fig. 1.2D).

Uma vez no interior do hospedeiro definitivo, desenquista e migra para o órgão que vai constituir o seu microhabitate específico, onde consegue uma boa fixação mecânica (Cheng, 1981). A "escolha" do microhabitate baseia-se em necessidades bioquímicas e físicas do parasita. Sendo dotado de estruturas (ventosas, espinhos, etc.) que contribuem para a sua adesão e impedem a sua expulsão, permanece no hospedeiro até completar o desenvolvimento da fase adulta (Figs. 1.2-1 e 1.3A), traduzido pela atrofia da vesícula excretora e pelo completo desenvolvimento, na maioria das espécies, dum aparelho sexual hermafrodita complexo (Bartoli, 1974a; Schell, 1982; Fried e Haseeb, 1991). Ao atingir a

maturação sexual ou expele os ovos ou é expelido com as fezes do hospedeiro, fechando-se assim o seu ciclo de vida.

Os digéneos demonstram uma estreita especificidade para o hospedeiro nas fases de miracídio, esporoquisto, rédia e cercária só sobrevivendo num número limitado de espécies, geralmente moluscos. Pelo contrário as metacercárias e adultos são menos "específicos" no que respeita à "escolha" do hospedeiro. Em muitos casos consegue-se obter o seu desenvolvimento experimental em laboratório, em animais como pintainhos, patos jovens, ratinhos, (Fried e Rosa-Brunet,1991; Koie,1992; Pekarinnen, 1987) e em outras aves ou peixes pertencentes ao mesmo ecossistema (ver Tab. 1. 1). Esta característica tem contribuído para o conhecimento de muitas fases larvares em hospedeiros experimentais, mantendo-se desconhecidos, por vezes, os hospedeiros naturais.

1. 2 - TREMATODA DIGENEA PARASITAS DE *C. EDULE*

Distribuição - Aspectos gerais

Antes de apresentarmos a nossa contribuição para o estudo dos parasitas de *C. edule*, em Portugal, pareceu-nos valioso sumarizar o que já se encontra publicado noutros países. Este sumário foca sobretudo os digéneos que parasitam *Cerastoderma edule*, focando os hospedeiros naturais e experimentais e a sua distribuição geográfica. Os resultados desse sumário estão apresentados na tabela 1. 1 e serão referenciados na descrição que se segue.

Tabela 1. 1 - Digenea parasitas de *C edule* : Ciclos de vida e distribuição geográfica

| ESPÉCIES | Hospedeiro primário | Hospedeiro intermediário | Hospedeiro definitivo | Área geográfica | Referências |
|---------------------------------|-------------------------------------|---|---|--|--|
| <i>Meiogymnophallus minutus</i> | <i>Scrobicularia plana</i> | <i>Cerastoderma edule</i> | <i>Haematopus ostralegus</i> | Mar do Norte, País de Gales, Inglaterra | Bowers e James, 1967 ; Laukner 1971;Loos-Frank, 1971; James et al. , 1977; Goater. 1993. |
| <i>M. fossarum</i> | <i>S. plana</i> | <i>C. glaucum</i> , <i>Tapes</i> , <i>Spisula</i> , <i>Solen</i> , <i>Ensis</i> | <i>H. ostralegus</i> , <i>Larus argentatus</i> [§] | Camarga(França) | Bartoli,1965; 1972; 1973; 1974; Bowers et al. 1990 |
| <i>Gymnophallus choledochus</i> | <i>C. edule</i> | <i>C. edule</i> * <i>Nereis diversicolor</i> | <i>Larus spp.</i> , <i>Tadrona tadorna</i> , Anatidae, Limicolidae | Mar do Norte, Camarga | Loos-Frank,1969; Laukner, 1971; Bartoli,1974 |
| <i>G. nereicola</i> | <i>Abra ovata</i> | <i>Abra ovata</i> * | <i>H.ostralegus</i> , <i>Calidris spp.</i> , <i>Charadrius spp.</i> , <i>Larus spp.</i> | Camarga | Bartoli.1972;1974 |
| <i>G. rebecqui</i> | <i>Abra ovata</i> , <i>A.tenuis</i> | <i>Abra ovata</i> , <i>C.glaucum</i> , <i>A.tenuis</i> * | <i>Aythya spp.</i> , <i>Anas clyptea</i> | Camarga,Inglaterra | Rebecq.1964; Bartoli,1974; 1983; Campbell, 1985. |
| <i>Labratrema minimum</i> | <i>C. edule</i> | <i>Atherina spp.</i> <i>Pomatoschistus microps</i> , | <i>Dicentrarchus labrax</i> | Camarga , Langdoc | Carrère.1937; Rebecq,1964; Maillard 1975 |
| <i>Himasthla quissetensis</i> | <i>Nassarius obsoletus</i> | <i>Mya arenaria</i> , <i>Ensis</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>Tapes Mercenaria</i> . <i>Crassostrea</i> , <i>C.edule</i> , <i>S.plana</i> <i>C. glaucum</i> . | <i>Sterna hirundo</i> [§] , <i>Larus argentatus</i> [§] , <i>L. marinus</i> | QuamquissetHarbor Woods Holes(USA) Mar do Norte Camarga | Miller e Northrup, 1926; Stunkard.1938;1960;1970; Laukner.1971;Prévot,1974 |
| <i>Cercaria cerastodermae</i> 1 | <i>C. edule</i> , <i>C. glaucum</i> | <i>C. edule</i> *, Teleóstco ^f | Teleóstco ^f | Kyle Tongue (Escócia),Inglaterra, Thames (estuário) | Bowers.1965; Boyden, 1969; Sannia e James ,1978 |

* : Hospedeiro que a cercária não abandona, onde se transforma em metacercária. § : Hospedeiro experimental. f : Hospedeiro desconhecido

MEIOGYMNOPHALUS MINUTUS (Cobbold, 1859)

A existência de metacercárias de *M. minutus* foi descrita pela primeira vez por Lebour (1907a; 1911) como *Cercaria margaritae*, sendo uma fase não enquistada. Cole (1938) observou em *C. edule* proveniente de Menai Straits e Cardigan Bay, País de Gales, cercárias que denominou *C. cambrensis* mas que, na realidade eram metacercárias (Bowers e James, 1967), constituindo massas de cor castanha, situadas sob a charneira da concha numa cavidade em forma de cunha. Bowers e James, (1967), fizeram uma revisão dos géneros *Gymnophallus* e *Meiogymnophallus*, redescrivendo também as fases de metacercária em *C. edule* proveniente do estuário do rio Burry, no sul de Wales e do adulto infestante (Tab. 1.1; Fig. 1.5). As metacercárias encontravam-se sob o umbo da concha, envolvidas pela face extrapaleal do manto, epitélio colunar, localizando-se no espaço extrapaleal subarticular de *C. edule* (James *et al.*, 1977).

A fase adulta de *M. minutus* desenvolve-se no hospedeiro definitivo, *Haematopus ostralegus occidentalis* Neumann, 1905 (Bowers e James, 1967; James *et al.*, 1977), uma ave aquática pertencente à ordem Charadriiformes, cujo nome vulgar é ostraceiro. A sua distribuição geográfica vai desde a costa norte do Atlântico, (Escandinávia, Grã-Bretanha, Irlanda e Islândia) até Marrocos (Cramp, 1983) (Tab. 1.1; Fig. 1.5).

As fases de esporoquisto e cercária foram observadas mais tarde (Loos-Frank, 1971) no bivalve *Scrobicularia plana*, seu hospedeiro primário.

M. minutus em *C. edule* está referenciado na Bretanha (Sellin, 1970); no Mar Báltico (Lauckner, 1971); no Mar do Norte (Loos-Frank, 1971); na baía de Arcachon por Bartoli (informação pessoal) (Tab. 1.1; Fig. 1.5).

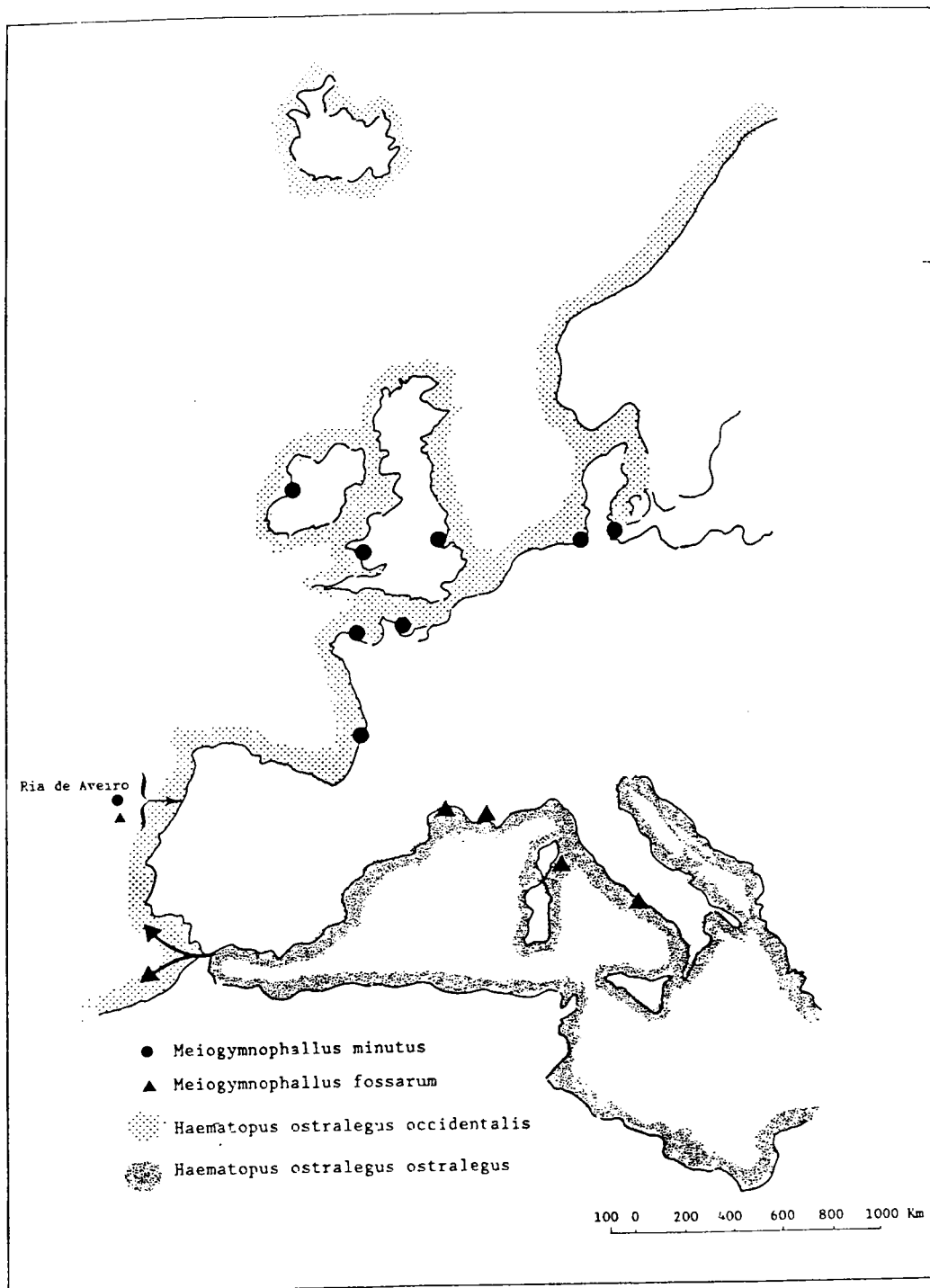


Fig. 1. 5 - Distribuição na costa europeia e mediterrânica das espécies *M. minutus* e *M. fossarum* e dos seus hospedeiros definitivos *H. ostralegus* (segundo Russell-Pinto e Bartoli)

MEIOGYMNOPHALLUS FOSSARUM (Bartoli, 1965)

A fase de metacercária de *M. fossarum* (Tab. 1.1) foi referenciada pela primeira vez em *C. glaucum* no golfo de Nápoles, em 1934, por Palombi que a designou por *Metacercária (Gymnophallus) strigata*, observada em *Tapes decussata* (= *Venerupis decussata*), bivalve hospedeiro-intermediário, que também é descrito como interveniente no ciclo evolutivo de *M. fossarum* por Bartoli (1973b). Bartoli redescreve esta espécie como *Gymnophallus fossarum*, infestante de *C. glaucum* proveniente da Camarga, Sul de França, (Bartoli, 1965;1973a), sendo também assinalada pelo mesmo autor no golfo de Lion e na costa leste da Córsega (Fig. 1. 5).

Esta espécie é actualmente designada por *M. fossarum* (Bowers *et al.* 1990). O ciclo evolutivo de *M. fossarum* desenvolve o estado de esporoquisto, onde se dá a maturação da fase de cercária, em *S. plana*, hospedeiro primário, tal como a espécie anterior. A fase de metacercária desenvolve-se no hospedeiro intermediário *C. glaucum* (Bartoli, 1965; 1973a), bivalve lagunar. Os indivíduos adultos infestam *H. ostralegus ostralegus*, hospedeiro definitivo, cuja distribuição estava limitada à região mediterrânica (Tab. 1.1; Fig.1.5). Dada a grande semelhança morfológica existente entre *M. fossarum* e *M. minutus* estas espécies foram consideradas como sendo a mesma e muitas vezes tratadas em conjunto (James *et al.*, 1977). Só recentemente (Bowers *et al.*, 1990), com base em infestações experimentais de *C. edule* e de *C. glaucum* por cercárias provenientes de *S. plana* mediterrânico e atlântico, foi feita a distinção entre elas.

Como se pode observar na figura 1.6 o que estava descrito para estas duas espécies de **Gymnophallidae**, de acordo com os trabalhos de Bowers e James (1967), James *et al* (1977), Bartoli (1965; 1973a; 1974a), era que na costa ocidental atlântica as metacercárias de *M. minutus*, que parasitavam *C. edule*, encontravam-se localizadas no espaço extrapaleal subarticular, sempre envolvidas por proliferações celulares do epitélio do manto; por sua vez *C. glaucum* com a mesma proveniência não se

encontrava infestado pela espécie *M. minutus*. As metacercárias de *M. fossarum*, na costa oeste mediterrânea, foram observadas livres, parasitando *C. glaucum*, situadas no espaço extrapaleal periférico, ao longo das margens dos lóbulos paleais e do istmo paleal e nunca envolvidas pelos tecidos do hospedeiro.

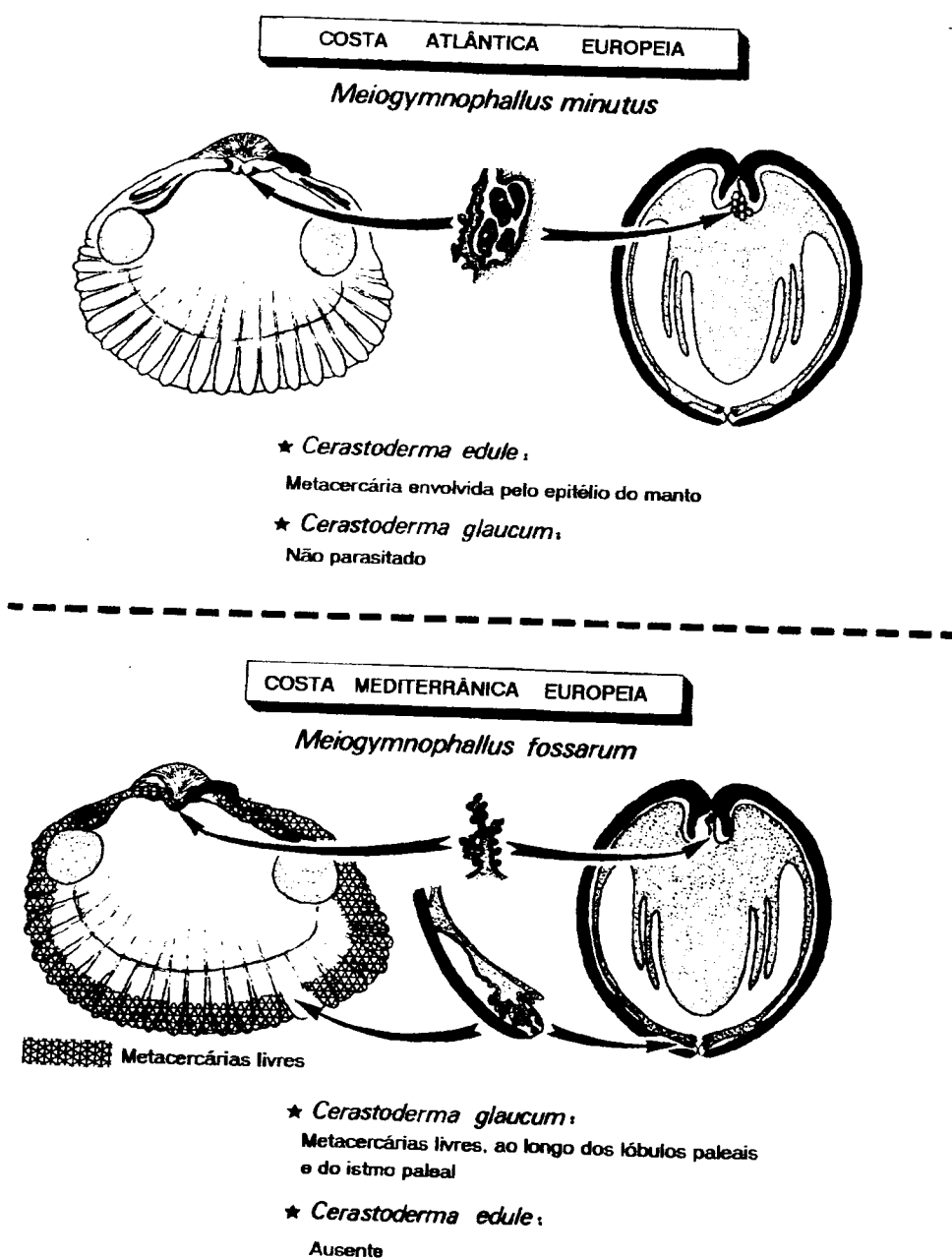


Fig. 1. 6 - Microbiótópos usados por *M. minutus* e *M. fossarum* em *C. edule* e *C. glaucum* da costa ocidental europeia e mediterrânea (segundo Bartoli).

GYMNOPHALLUS CHOLEDOCHUS Odhner, 1900

O ciclo de vida deste trematóde foi estudado por Loos-Frank (1969) em hospedeiros do Mar do Norte (Tab. 1.1). *G. choledochus* (Digenea, **Gymnophallidae**) tem como hospedeiro primário *C. edule*. O hospedeiro intermediário é nesta espécie um poliqueta pertencente ao género *Nereis*, *Nephtys* ou *Arenicola*, onde se encontra a fase de metacercária. A fase de adulto parasita a gaivota, *Larus argentatus*, ou outras espécies como *L. marinus*, *L. canus*, *L. ridibundus* e *Tadorna tadorna*, infestando a vesícula biliar de **Charadriiformes**, **Laridae** e **Anatidae**.

Anteriormente Prévot (1965) tinha encontrado na costa francesa da Mancha (Calvados) metacercárias **Gymnophallidae** no poliqueta *Nereis diversicolor* que identificou como sendo *G. choledochus*. Com estas metacercárias provocou uma infestação experimental em *Larus argentatus michahellis*. Desta experiência resultou que a metacercária elegeu como microbiótopo, local de infestação e desenvolvimento da fase adulta, a vesícula biliar da gaivota.

Bartoli (1974a) assinala a presença de *G. choledochus* em *Cardium glaucum* (= *Cerastoderma glaucum*) usando o mesmo hospedeiro vector, *N. diversicolor*, que a metacercária de *Gymnophallus nereicola* (Rebecq e Prévot, 1962). Posteriormente observou que estas duas metacercárias estavam localizadas no hospedeiro intermediário no mesmo parápode (Bartoli, 1974b).

Também James *et al.* (1977) assinalam *C. edule*, colhido em Burry Inlet (Wales), como hospedeiro primário de *G. choledochus*, a metacercária não enquistada no poliqueta *Nephtys hombergi* e a fase de adulto na vesícula biliar de *Larus argentatus*, ou de *Melanitta nigra*, registando uma incidência de 0,3% no hospedeiro *C. edule* e de 80% no poliqueta.

Loos-Frank (1969), ao estudar o ciclo evolutivo de *G. choledochus* infestante de aves aquáticas do Mar do Norte descobriu que este trematóde tinha a capacidade para desenvolver um segundo ciclo de vida alternativo conforme as condições

ambientais em que se encontrava. Assim, constatou que o ciclo de vida acima descrito constitui o ciclo de vida da infestação da Primavera e do Verão, época do ano em que as metacercárias infestam os poliquetas.

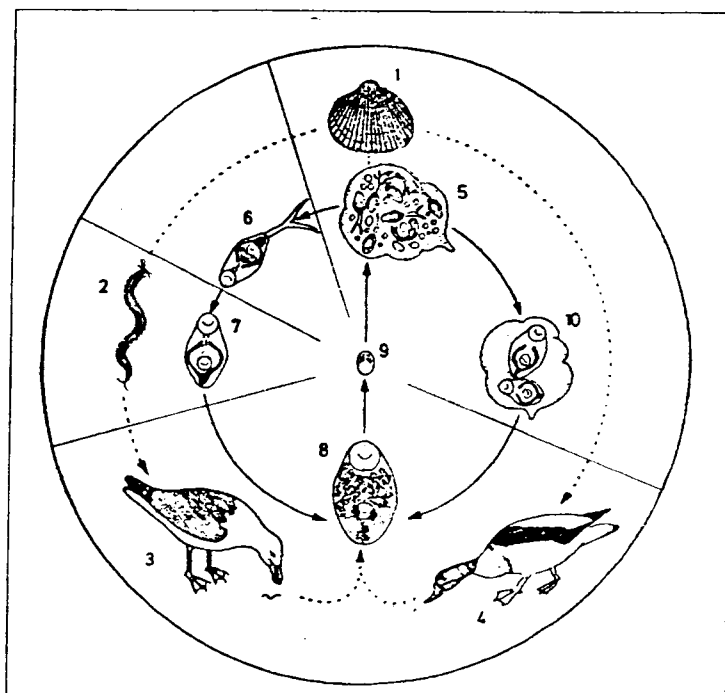


Fig. 1. 7 - Ciclo evolutivo de *G. choledochus*. 1 - *C. edule*; 2 - *Nereis.sp*; 3- *L. argentatus*; 4 - *T. tadorna*; 5 - esporoquisto (Primavera e Verão); 6- cercária; 7- metacercária; 8- adulto; 9- ovo; 10 - esporoquisto com metacercária (Outono e Inverno) (segundo Loos-Frank).

O ciclo de vida alternativo foi observado no Outono e no Inverno tendo como causa principal, segundo a sua opinião, a baixa temperatura da água do Mar do Norte. Neste caso *G. choledochus* elimina um hospedeiro, o poliqueta (Loos-Frank, 1969; Fig. 1. 7). Nesta alternativa de desenvolvimento *C. edule* é o único hospedeiro intermediário, encontrando-se parasitado pelas fases de esporoquistos-cercárias e esporoquistos-metacercárias, passando o ciclo de três para dois hospedeiros.

Quando o bivalve é ingerido pelo hospedeiro definitivo, um pato mergulhador, como por exemplo *Tadorna tadorna*, as fases larvares vão evoluir em adultos na

vesícula biliar do hospedeiro. Estes patos alimentam-se de bivalves enquanto que as gaivotas e as aves limícolas se alimentam de poliquetas. Daí ser diferente o hospedeiro definitivo quando o parasita se desenvolve segundo um ciclo com dois hospedeiros ou com três hospedeiros.

***GYMNOPHALLUS REBECQUI* Bartoli, 1983**

Gymnophallus rebecqui foi assinalado em primeiro lugar por Rebecq (1964) na Camarga (França) (Tab. 1.1), com o nome genérico *Parvatrema* sp.1. A fase larvar encontrada foi a de metacercária em *C. glaucum*. Posteriormente a espécie foi de novo estudada por Bartoli (1974a; 1983), em amostras de *C. glaucum* e *Abra ovata* (Philippi, 1836), provenientes do mesmo local e estação de colheita referidos por Rebecq (1964). Nesta redescção Bartoli (1983) observou que as metacercárias designadas por *Parvatrema* sp.1, (Rebecq, 1964), não possuíam a maior parte dos caracteres do género *Parvatrema*, tal como tinha sido definido por Cable (1953) e mais tarde redefinido por James (1964) mas apresentavam todos os caracteres do género *Gymnophallus*.

Assim esta espécie passou a ser designada pelo nome de *Gymnophallus rebecqui* Bartoli, 1983, como tributo a J. Rebecq.

Os digéneos adultos foram obtidos por contaminação experimental de várias espécies de aves, **Anatidae e Laridae**, por metacercárias provenientes de *C. glaucum* e *A. ovata* (Bartoli, 1983).

Em 1985 Campbell consegue identificar estados larvares, esporoquistos e cercárias parasitas no bivalve *Abra tenuis* (Montagu, 1808), na costa sul de Inglaterra, como pertencentes à espécie *G. rebecqui* e constata que o esporoquisto se situa na gónada, contribuindo para a esterilização do bivalve.

O hospedeiro primário era desconhecido até esta data, podendo concluir-se que *G. rebecqui* usa o mesmo bivalve para hospedeiro primário e intermediário, embora os

estados larvares escolham locais de infestação distintos. Como na Camarga, o seu desenvolvimento em digéneo adulto foi observado em patos, *Aythya ferina*, *Aythya fuligula* e *Anas clypeata*, hospedeiros definitivos naturais (Campbell, 1985).

LABRATREMA MINIMUM (Stossich, 1887)

Este tremátode digéneo, pertencente à família **Bucephalidae**, denominado *Bucephalus minimus* Stossich, 1887, foi descoberto na Camarga por Carrère (1937) (Tab. 1.1), que observou a fase de metacercária enquistada no fígado dos peixes *Atherina mochon* e *A. hepsetus* e denominou-o *Dolichoenterum lamirandi*. Este mesmo autor conseguiu experimentalmente obter o parasita adulto no robalo, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758).

Rebecq (1964) encontra este digéneo infestando os mesmos hospedeiros e descreve-o novamente.

Segundo Cheng (1967), esta espécie tinha sido assinalada em *C. edule* por Johnstone (1904) na costa de Lancashire, no norte de França (Pelsneer, 1906) e em Inglaterra (Lebour, 1911).

Maillard (1975) encontrou frequentemente este parasita na costa do Languedoc, na fase de metacercária em *Atherina* sp. e noutros teleósteos, enquistado no fígado e a fase adulta no intestino do robalo. No entanto observou que apesar de morfologicamente idêntico ao descrito por Carrère (1937) e Rebecq (1964), anatomicamente a posição dos órgãos no digéneo era diferente, baseado na observação de cortes histológicos seriados. Apesar de ter concluído que as três descrições se baseavam na mesma espécie de **Bucephalidae**, o tremátode que acabava de descrever não correspondia às características de nenhum dos géneros conhecidos, pertencentes a esta família. Por isso criou um novo género *Labratrema* e denominou a espécie tipo de *L. lamirandi* (Carrère, 1937) Maillard, 1975.

Segundo Combes *et al.* (1980), o nome válido para esta espécie é *Labratrema minimum* (Stossich, 1887) Maillard, 1975 sendo sinónimo de *B. minimus*, Stossich, 1887, *D. lamirandi*, Carrère, 1937, e em parte de *Bucephalus haimeanus* Lacaze-Duthiers, 1854. Este último nome só deve ser atribuído exclusivamente à cercária parasita de *Ostrea edulis* e não à cercária parasita de *C. edule* (Lacaze-Duthiers, 1854).

Maillard (1975) estabeleceu o ciclo evolutivo desta espécie após ter feito infestações experimentais dos hospedeiros naturais em laboratório, estabelecendo para hospedeiro primário *C. glaucum*; pequenos teleósteos como *Pomatoschistus microps*, *A. mochon* e *A. hepsetus* como hospedeiros intermediários e *D. labrax* como hospedeiro definitivo.

James *et al.* (1966; 1977) referem este digéneo como parasita de *C. edule*, em Wales, mantendo a mesma designação em 1977, para a espécie cuja cercária parasita *C. edule*. A metacercária enquistada aloja-se no fígado de *P. microps*, hospedeiro vector, destruindo-o. O adulto desenvolve-se no intestino de *D. labrax* seu hospedeiro definitivo, de acordo com as observações feitas anteriormente por Mathews (1973).

A presença da metacercária enquistada de *L. minimum* no fígado de *Liza ramada*, tainha, foi assinalada recentemente no Mediterrâneo por Faliex (1990).

Como referido anteriormente esta espécie tem como hospedeiro vector um vertebrado, um peixe teleósteo, e como hospedeiro definitivo também outro teleósteo, sendo um ciclo de vida diferente do da família **Gymnophallidae** em que o hospedeiro vector é um bivalve (invertebrado) e só o definitivo é um vertebrado, uma ave.

***HIMASTHLA QUISSETENSIS* Miller e Northrup, 1926**

A cercária de *H. quissetensis* (**Echinostomatidae**) foi descrita por Miller e Northrup (1926) ao observar *Nassa obsoleta* (= *Nassarius obsoletus*), gastrópode, em Quamquisset Harbor. O estudo do seu ciclo evolutivo foi feito por Stunkard (1938)

que estabeleceu como hospedeiro intermediário o lamelibrânquio *Mya arenaria* (Tab. 1.1).

No entanto são inúmeros os bivalves que estão descritos como hospedeiros vector de *H. quissetensis*. Entre eles salientamos *Mitylus edulis*, *Tapes decussata* (Cheng, 1967). Em 1966 Cheng encontrou metacercária de *H. quissetensis* em *Crassostrea virginica* e *C. gigas*.

Após infestações experimentais, Stunkard (1938) desenvolveu a fase adulta em *Sterna hirundo* (andorinha) e em *Larus argentatus* (gaivota). Ficou assim estabelecido o ciclo evolutivo de *H. quissetensis* e também a pouca especificidade desta espécie em relação ao hospedeiro intermediário.

Posteriormente, Prévot (1974) encontra *H. quissetensis* na Camarga, redescrivendo o seu ciclo evolutivo na costa mediterrânica. Estabeleceu *L. marinus* como hospedeiro definitivo natural e *L. argentatus* como hospedeiro definitivo experimental, alojando-se o adulto de *H. quissetensis* na metade posterior do intestino. Como hospedeiro intermediário, considerou nada mais nada menos do que 21 espécies de bivalve, entre os quais os já descritos anteriormente e mais *C. glaucum* e *S. plana*, mantendo *Nassa obsoleta* e também *Cyclonassa nerita* como hospedeiro primário (Prévot, 1974). Laukner (1971) observa *C. edule* do Mar do Norte infestado por metacercárias desta espécie.

CERCARIA CERASTODERMAE I Sannia, James e Bowers, 1978

As fases larvares deste tremátode digéneo em *C. edule* (Tab. 1.1) foram observadas em primeiro lugar por Lebour (1906, 1907a,b) que as denominou de *Distomium* sp. e posteriormente (Lebour, 1911), sem o apoio de resultados experimentais, foram consideradas como larvas pertencentes à espécie *Lepidapedon racion* (Cobbold, 1858), família **Lepocreadiidae**. Só bastante mais tarde é que *C. cerastodermæ* I é referenciado na literatura (Bowers, 1965; Boyden 1969), em *C.*

edule proveniente da costa norte da Escócia e de Southend, neste local também infestando *C. glaucum*.

Em 1978, Sannia, James e Bowers reexaminam esta espécie, a partir de esporoquistos contendo cercárias e metacercárias enquistadas. Estes autores consideraram a espécie como rara na costa britânica. Observaram-na em *C. edule* colhido no local onde previamente tinha sido assinalada, Kyle of Tongue, no norte da Escócia (Bowers, 1965) e em duas estações do baixo Tamisa (Boyden, 1969). Após um estudo detalhado (Sannia e James, 1978) que incluiu a infestação experimental de peixes teleósteos, concluíram que os resultados obtidos por Lebour (1906, 1907a,b) estavam incorrectos. A obtenção de adultos experimentais não foi conseguida. Redescreveram a espécie, com base nas fases larvares presentes em *C. edule*, dando-lhe o nome pelo qual hoje é conhecida, incluindo-a na família **Monorchiidae** (Odhner, 1911). Os teleósteos, hospedeiros intermediário e definitivo, ainda não são conhecidos (Laukner, 1983).

Muito recentemente Jonsson e André (1992) relatam a presença de *C. cerastodermæ* I em águas escandinavas, na costa noroeste da Suécia, parasita da gónada e da glândula digestiva de *C. edule*.

1. 3 - SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE *C. EDULE*

Sobre o sistema interno de defesa de *C. edule* pouco ou nada se conhece. Não parece haver nenhum trabalho recente sobre o estudo dos elementos que constituem o sistema interno de defesa de *C. edule*. A única referência encontrada foi um estudo em três espécies de bivalves e entre elas *Cardium* (= *Cerastoderma*) *edule* feito por Betances em 1921 em que os hemócitos encontrados são designados por granulocitoblastos, sendo caracterizados por possuírem um citoplasma esponjoso (*in* Cheng, 1981, tabela I, pag. 246).

Cheng (1981), num artigo de revisão sobre o sistema de defesa de bivalves, faz uma síntese dos esquemas de classificação dos hemócitos observados nesta classe dos moluscos. Entre as poucas espécies em que este estudo tem sido feito distinguem-se nomeadamente: *Mytilus* sp. (Moore e Lowe, 1977; Feng *et al.*, 1977; Renwrantz *et al.*, 1985; Pipe, 1990), *Crassostrea* sp. (Cheng e Rifkin, 1970; Feng *et al.*, 1971; Ruddell, 1971; Feng *et al.*, 1977; Vasta *et al.*, 1984; Renwrantz *et al.*, 1979; Fisher e DiNuzzo, 1991; Olafsen *et al.*, 1992), *Mercenaria mercenaria* (Cheng e Foley, 1975; Yoshino e Cheng, 1976; Tripp, 1992) e *Corbicula* sp. (Yang e Yoshino, 1990).

1. 4 - PROPÓSITO DESTE TRABALHO

Com a presente dissertação pretende-se contribuir para a análise detalhada de vários aspectos da infestação de *Cerastoderma edule* por Digenea em Portugal, principalmente numa zona, a Ria de Aveiro, em que *C. edule* tem uma importância social e económica considerável, como referido anteriormente. Assim procurámos:

- 1- Identificar os Trematoda Digenea que parasitam *C. edule* proveniente da Ria de Aveiro e doutros locais em Portugal.
- 2- Descrever a morfologia das suas fases larvares em microscopia óptica e em microscopia electrónica de transmissão e de varrimento.
- 3- Fazer o estudo da prevalência e intensidade de infestação.
- 4- Caracterizar a relação hospedeiro-parasita, em relação ao mês e estação de colheita.
- 5- Procurar saber como o hospedeiro, *C. edule*, responde à presença dos parasitas, pelo estudo das células do seu sistema de defesa interno. Este estudo inclui aspectos ultrastruturais e citoquímicos.
- 6- Estudar a resposta destas células a agentes externos antigénicos.
- 7- Analisar de que forma a presença dos parasitas vai influenciar a resposta das células que fazem parte do sistema interno de defesa de *C. edule*.

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Moluscos: espécies e números de animais estudados

Neste trabalho foram estudados as seguintes espécies de Mollusca Bivalvia, como hospedeiros primário e intermediário de várias espécies de Trematoda Digenea:

Cerastoderma edule (Linnaeus, 1758), (Fig. 2.1a), pertencente à subclasse Lamellibranchia, à ordem Heterodonta (Storer et al. 1982), à superfamília **Cardiacea**, à família **Cardiidae** e à subfamília **Laevicardiinae** (Lindner, 1977), actualmente transferida para a subfamília **Lymnocardiinae** (Schneider, 1992). O seu nome vulgar (n. v.) é berbigão.

Foram observados 2817 animais, entre Maio de 1985 e Outubro de 1992, provenientes da Ria de Aveiro.

Em Abril e Maio de 1987, foram feitas algumas colheitas na foz do Rio Douro. Foram observados 40 *C. edule*. Em Novembro de 1992 uma amostra de 25 *C. edule*, proveniente do mesmo local, foi também analisada.

Durante este período de trabalho foi feito, também, o despiste parasitário em berbigão proveniente da Ria de Olhão (n=441) e de alguns mercados de abastecimento público do Porto (n=493).

Cerastoderma glaucum (Poiret, 1789), (Fig. 2.1b), pertence à mesma subfamília da espécie anterior, sendo denominado berbigão macho. A distinção entre estas duas espécies, morfologicamente muito semelhantes, foi feita de acordo com os caracteres estabelecidos por Laukner (1971), Boyden e Russell (1972) e Boyden (1973).

Foram observados 311 animais desde Fevereiro de 1986 a Setembro de 1992.

Scrobicularia plana (Da Costa, 1778), (n.v. lambujinha), (Fig. 2.1c) bivalve heterodonto pertencente à superfamília **Tellinacea**, família **Scrobiculariidae** (Lindner, 1977).

Foram observados 2857 animais, entre Fevereiro de 1986 e Agosto de 1992.

2.2 - Locais de colheita

Cerastoderma edule (Linnaeus, 1758) (Fig. 2.1a) foi colhido no Canal de S. Jacinto (estrada nº 327). Foram estabelecidas quatro estações, de acordo com a presença do bivalve e com a sua localização em relação à foz da Ria (local denominado Barra).

Os locais de colheita (Fig. 2.2) foram denominados de estação 1, situada no Km 54, em frente à casa da Reserva Natural de S. Jacinto; estação 2, no local denominado de Praia de Barca, Km 50; estação 3B, localizada no Bico do Muranzel, Km 46; estação 3A, ilha alagadiça, situada em frente ao Bico do Muranzel, nem sempre com acesso fácil pois é necessário utilizar um barco, permitindo a recolha das espécies durante o período final da maré baixa, em que o terreno fica a descoberto. Estes locais foram escolhidos por apresentarem melhores condições para o desenvolvimento dos ciclos evolutivos dos digéneos e pela presença de todos ou de parte dos hospedeiros necessários ao seu ciclo de vida.

Os bivalves colhidos encontravam-se enterrados na zona superficial do substrato arenoso (estações 2 e 3B) ou lodoso (estação 1 e 3A).

As colheitas foram feitas, a partir de Maio de 1985, mensalmente ou de acordo com as necessidades do trabalho e iniciadas duas horas antes da hora final da maré baixa.

As colheitas na foz do Rio Douro foram feitas junto ao Cais Velho.

Cerastoderma glaucum (Poiret, 1789) (Fig. 2.1b) foi obtido em parte, nas estações 3A e 3B acima referidas, que se caracterizam pela predominância da espécie *C. edule*, sendo a quantidade de *C. glaucum* menor (n=185).

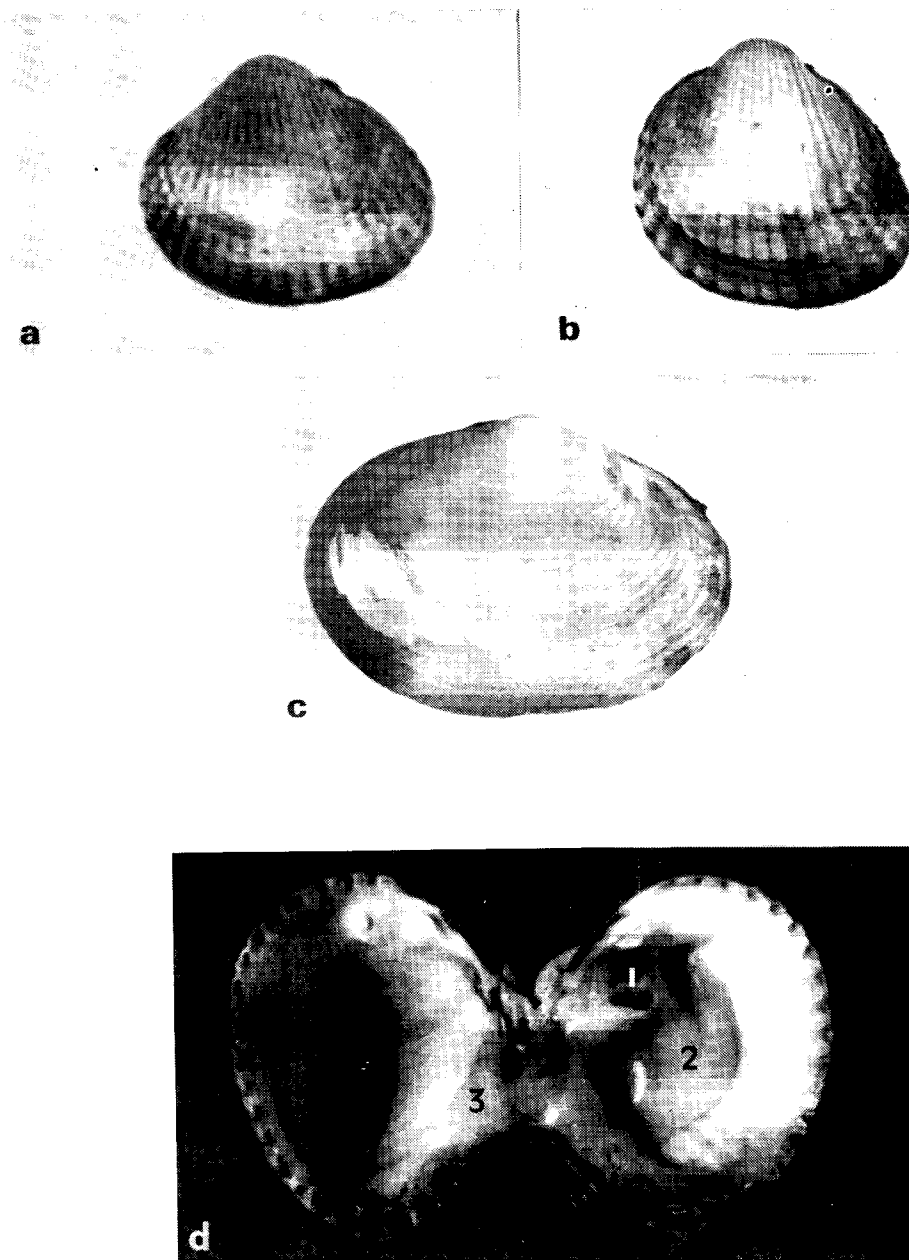


Fig. 2. 1 - a - *C. edule*; b - *C. glaucum*; c - *S. plana*; d - Anatomia interna de *C. edule*: 1- glândula digestiva, 2- pé, 3- brânquia (a, b, c x 1,25; d x 1,4).

Foram também efectuadas colheitas, durante o ano de 1988 (Fevereiro, Maio, Julho, Agosto, Setembro e Outubro) , num total de 126 indivíduos, provenientes dos seguintes locais: Ilha de Samos , Lagoa do Paraíso, Ponte de Ílhavo, Salina (Porto de pesca), Marinha (Porto comercial) e Costa Nova (Fig. 2.3). Nestes locais *C. glaucum* é

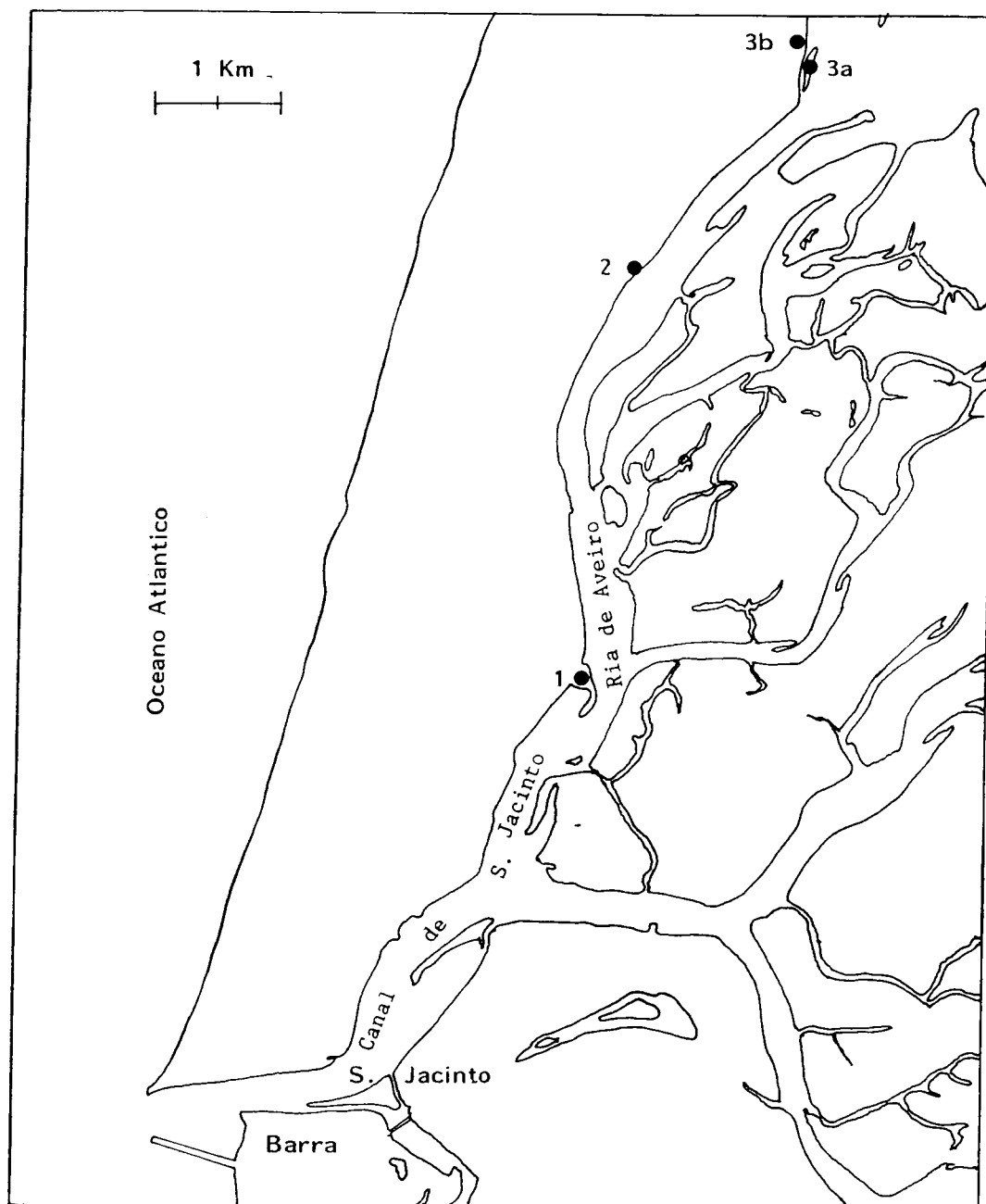


Fig. 2.2 - Localização das estações de colheita de *C. edule* e *S. plana* na Ria de Aveiro (segundo Russell-Pinto).

mais abundante do que nas estações 3A e 3B, encontrando-se no entanto muitos indivíduos com caracteres intermédios entre *C. glaucum* e *C. edule*, o que torna por vezes bastante difícil a distinção entre as duas espécies.

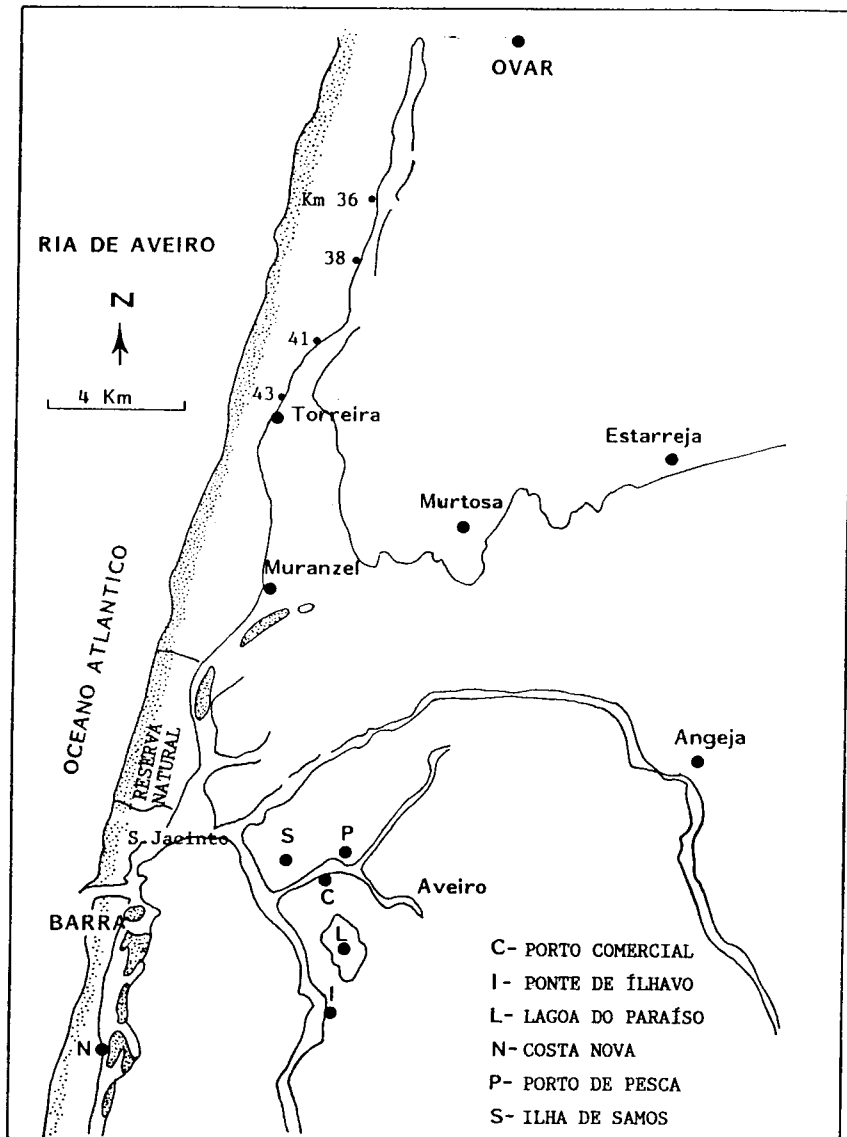


Fig. 2.3 - Locais de colheita de *C. glaucum* na Ria de Aveiro

Procedemos também a uma prospeção do bivalve *C. glaucum* em Maio e Junho de 1990, em zonas no canal de Ovar e de S. Jacinto, a norte da estação 3B (Fig.

2.3). Foram estabelecidos os seguintes locais de colheita: Km. 36, Km. 38, Km. 41 e Km. 43. Foi escolhido como extremo sul o local denominado Torreira (Km. 43) e norte o local denominado Torrão do Lameiro (Km. 36). Para sul do Km. 43 já aparecem indivíduos que apresentam caracteres morfológicos de *C. edule* e *C. glaucum*, começando a predominância de *C. edule*. A distinção entre *C. edule* e *C. glaucum* baseou-se nos trabalhos de Boyden (1969;1973) Boyden e Russell (1972) e Brok(1991

Foram observados 48 indivíduos sendo o maior número proveniente dos locais sites nos Km. 41 e 43 , em número de 13 e 32, respectivamente.

***Scrobicularia plana* (Da Costa, 1778):** as colheitas de *S. plana* (Figs. 2.1c; 2. 2) efectuaram-se nas estações 3A e 3B, num total de 791 e 717 animais, respectivamente, entre Fevereiro de 1986 e Outubro de 1987 e de Outubro de 1987 a Abril de 1989 (Russell-Pinto, 1990). Entre Fevereiro de 1986 e Agosto de 1992, foram observados um total de 870 indivíduos provenientes do local 3A, 1596 de 3B e 391 da estação 2. Só na estação 3A foi observada em *S. plana* a infecção por *M. minutus*

***Nereis diversicolor* O. F. Müller, 1776:** foram feitas colheitas de indivíduos pertencentes a esta espécie de poliquetas nas estações 3A, 3B e 1 (Fig. 2.2), por ser hospedeiro intermediário dum dos digénea, *Gymnophallus choledochus*, que parasita *C. edule*. Um total de 189 espécimenes foram observados entre Janeiro de 1986 e Maio de 1987.

Manutenção e observação dos hospedeiros

***C. edule* e *C. glaucum*:** Após a colheita, uma parte foi observada e processada após a sua chegada ao laboratório, outra mantida no frigorífico, a 4° C, e outra colocada em aquários de vidro, sempre que possível, em água transportada do local de colheita, continuamente filtrada e aerificada.

Por vezes foi necessário recorrer a água preparada artificialmente, a partir de sal não tratado proveniente das salinas de Aveiro, uma vez que a água da Ria, nos locais em estudo, apresenta uma salinidade bastante elevada, acima de 27‰.

No período de um ano, compreendido entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992, foi feito um estudo sequencial da infecção de *C. edule*, nas estações 1, 2 e 3B (Fig. 2.2) em que foram comparados estatisticamente os seguintes parâmetros: comprimento da concha, espécies de parasitas encontrados, concentração de hemócitos em *C. edule* observados à temperatura ambiente e submetidos a "stress" pela sua manutenção a 4° C durante, 48, 72, 96 e 144 horas, em animais parasitados e não parasitados. A amostra de *C. edule* estudada, em relação à concentração celular, durante o período de "stress" e nas três estações, foi de 482 indivíduos sendo a amostra total de 848 *C. edule* para os outros parâmetros.

Este estudo, ao longo dum ano, permitiu também o conhecimento da prevalência e intensidade de infestação das espécies de parasitas observadas e da distribuição das espécies por estação, por mês e por comprimento da concha.

Os valores da temperatura, salinidade e pH da água nas três estações foram também registados mensalmente, durante este período.

S. plana: Os espécimes de *S. plana* foram mantidos em pequenos recipientes de vidro individuais, em água proveniente do local da colheita, sendo observados à lupa diariamente, esperando a emissão espontânea de cercárias desenvolvidas em esporoquistos de *M. minutus*; outra parte foi mantida em aquário procedendo-se à sua dissecação, procurando de imediato a obtenção de cercárias.

Para a obtenção da emissão natural de cercárias no laboratório, após a colheita *S. plana*, provenientes de estação 3A, foram colocadas em tinas de 8 cm de diâmetro, com 100 ml de água da estação de colheita que era transportada com essa finalidade. Os animais foram mantidos à temperatura do laboratório, junto a uma janela, para receberem luz natural.

A água em cada recipiente era observada diariamente à lupa e mudada, dia sim, dia não, e os animais eram transferidos para recipientes limpos, conseguindo-se assim a mortalidade mínima dos hospedeiros.

Durante este período os animais infestados foram mudados de recipiente e de água todos os dias, as cercárias contadas a partir de alíquotas de 10 ml, medidas e processadas para microscopia electrónica de varrimento e de transmissão e observados os seus movimentos durante a natação.

Nereis diversicolor: os exemplares deste anelídeo foram observados à lupa binocular, por transparência, pressionados entre duas lâminas de vidro.

2.3 - Caracterização macroscópica dos parasitas

C. edule, *C. glaucum* e *S. plana* de cada colheita foram dissecados à lupa; os digéneos foram retirados dos órgãos infectados (Fig. 2.1 d) ou dos seus microbiótopos nas regiões extrapaleais da concha (Fig. 2.4). Depois de identificados, fotografados e medidos foram pressionados entre duas lâminas, para observação dos seus órgãos internos, para contagens de prevalência (percentagem de hospedeiros infectados, também denominada incidência) e de intensidade (número de digéneos por hospedeiro) de infestação.

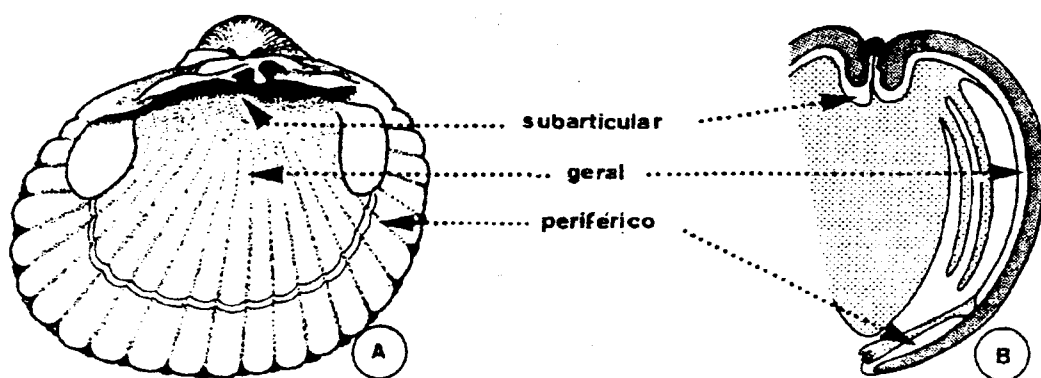


Fig. 2.4 - Microbiótopos extrapaleais. A - face interna da valva esquerda de *C. edule*. B - corte transversal esquemático (segundo Bartoli).

Obtenção de metacercárias desenquistadas: O desenquistamento das metacercárias foi feito *in vitro*, em estufa a 41^o C, durante 20 a 30 minutos, na seguinte solução: 5 ml de bicarbonato salino (0,8% w/v de cloreto de sódio e 1,5% w/v de bicarbonato de sódio) a que se juntou 0,8% w/v de taurocholato de sódio e 0,3% w/v de tripsina, adicionando-se, no momento de usar, 5 ml de ácido clorídrico a 0,002 M contendo 0,8 w/v de cisteína.

Hospedeiros contaminados, amostras de órgãos infectados e os digéneos depois de isolados, foram processados para observação em microscopia óptica (MO) e electrónica de transmissão (MET) e de varrimento ou scanning (MEV) .

2.4 - Sistema interno de defesa de *Cerastoderma edule*

Obtenção das células da hemolinfa de *C. edule*

A colheita de animais foi efectuada no canal de S. Jacinto, Ria de Aveiro, nas estações 1, 2 e 3B. As observações de *C. edule* foram iniciadas após a colheita, à temperatura do laboratório e este é o tempo designado "0 horas".

Grupos de 30 lamelibrânquios de colheitas feitas regularmente entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992, nas diversas estações, foram mantidos no frigorífico a 4^o C durante 24, 48, 72, 96 e 144 horas.

Colheita de hemolinfa

A hemolinfa foi extraída dos animais mantidos à temperatura ambiente e de animais mantidos a 4^o C por períodos de 24 , 48 , 72, 96 e 144 horas.

As conchas foram lavadas em água corrente. Foi feita uma pequena incisão, na zona do ligamento e as valvas foram mantidas abertas por pressão entre os dedos, tornando visível a região pericárdica, com o auxílio duma lupa binocular. A hemolinfa foi colhida por punção na cavidade pericárdica, com seringas de 1 ml e agulhas

hipodérmicas (5/8"), através da incisão, sendo transferida para um tubo Eppendorf contendo 100 µl duma solução de BSA a 0,5%, ou EDTA 0,25M e mantidos em gelo até ao momento de ser utilizada com o fim de evitar a formação de agregados celulares. A hemolinfa pode também ser retirada por inserção directa da extremidade da agulha no vértice da concha junto ao ligamento, atingindo na mesma a região pericárdica. Foram colhidos entre 300 e 1000 µl de hemolinfa de cada animal.

Quer as seringas quer os tubos foram passados internamente por uma solução de BSA a 0,5% ou de EDTA 0,25M em água filtrada e autoclavada proveniente das estações de colheita ou em solução salina de Chernin (1963). Estes solutos foram usados pela sua isotonicidade com a hemolinfa. As concentrações usadas resultaram do ajuste da osmolaridade (840 mOs)

Para determinar o efeito do tempo de refrigeração na concentração de hemócitos, a hemolinfa foi recolhida de animais frescos (0 h) à temperatura ambiente e de animais mantidos 48 horas a frio (4° C). Foram estudados 46 animais de cada grupo. A determinação do número de hemócitos viáveis foi efectuada por contagem num hemacitómetro pela técnica da exclusão pelo azul de Tripán, hemolinfa: Tripán (v/v), a partir duma solução mãe a 1%, diluída a 0,25% em tampão Chernin.

Para o estudo morfológico e citoquímico foram efectuados esfregaços celulares, por "cytospin", usando 100 µl da hemolinfa colhida pelo método já descrito, centrifugada durante 5 minutos a 500 r. p. m. numa citocentrífuga Shandon 2 ou 3.

Citoquímica

Os esfregaços de células da hemolinfa, depois de secos à temperatura ambiente, foram tratados para a detecção da presença de enzimas, como esterases, fosfatase ácida e peroxidase pelos métodos seguintes: α- nafilacetato esterase (Sigma, St Louis, USA); naphthol-AS-TR fosfato (Barka e Anderson, 1962); benzidina peroxidase segundo Wachstein e Meisel (Pearse, 1972). Para todas as reacções enzimáticas foram

feitas lâminas controlo, incubadas nas mesmas soluções mas com omissão do substracto.

Foi também utilizada a coloração de Leishman (BDH, Inglaterra) a 0,15% em metanol para a diferenciação de hemócitos Tipo III.

Resposta dos hemócitos à imunização com eritrócitos de carneiro

Formação de rosetas-E e fagocitose

O sangue de carneiro desfibrinado foi lavado em soro fisiológico e foram preparadas suspensões de eritrócitos a partir do sedimento obtido na última centrifugação a 1%, 2,5%, 5% e 10% v/v em PBS.

A injeção de eritrócitos de carneiro (SRBC) na cavidade pericárdica de *C. edule* foi efectuada sob uma lupa binocular, através de uma pequena abertura na charneira da concha. Os animais foram injectados com 100 µl de cada uma das concentrações de SRBC (1%, 2,5%, 5% e 10%). Os animais colhidos no dia da experiência (0h) foram estudados à temperatura ambiente; os animais estudados às 24 e 48 horas foram mantidos a 4° C. Na totalidade foram estudados 78 animais injectados e 37 não injectados usados nas mesmas condições como animais controlo. A suspensão hemolinfa / SRBC foi recolhida da cavidade pericárdica 30 minutos após a injeção de eritrócitos. O número de rosetas-E formadas *in vivo* por cada 100 hemócitos foi determinado usando um hemacitómetro; foram consideradas como rosetas as formações em que quatro ou mais eritrócitos envolviam um hemócito. Foi também determinado o volume total de hemolinfa / SRBC retirado e a sua concentração celular.

Para a caracterização morfológica e determinação da percentagem dos tipos de células envolvidas na formação de rosetas e na eritrofagocitose, foram preparados esfregaços em "cytopsin" a partir de suspensões recolhidas 30 minutos após a injeção de SRBC (a 2,5; 5 e 10%) em animais colhidos no próprio dia (0 h à temperatura

ambiente) e em animais mantidos 24 ou 48 horas a 4° C. Em cada esfregaço assim preparado foram estudados 100 células em cada uma das 78 observações feitas (ampliação 1000x). As células foram contadas discriminando o tipo celular, a formação de rosetas e eritrofagocitose. Foi usado como grupo controlo um conjunto de animais não injectados, com as acima referidas suspensões de SRBC, nas mesmas condições de temperatura e tempo.

Os aspectos ultrastruturais do processo de formação de rosetas e fagocitose e a morfologia dos diferentes tipos de hemócitos foram estudados em microscopia electrónica de transmissão e de varrimento

2.5 - Observação morfológica

Microscopia óptica

Hospedeiros e parasitas: Fragmentos dos órgãos infectados dos hospedeiros e as fases larvares dos digéneos foram fixadas em Bouin, desidratadas numa série ascendente de soluções de etanol a 50%, 75%, 90%, 95% e 100%, diafanizados em benzol, depois incluídas em parafina. Cortes com 7 µm de espessura foram corados com Mayer hemalumen e eosina e montados em entellan.

Esfregaços celulares: Os esfregaços de hemócitos foram corados pelo método de rotina HEMACOLOR (Merk, Alemanha) para microscopia óptica. Para a possível caracterização das células tipo III, alguns esfregaços, depois de secos ao ar, foram corados pela solução de Leishman a 0,15% em metanol, filtrado antes de usar. Colocaram-se duas gotas de corante e de água destilada sobre a lâmina, deixando-se actuar entre 3 e 5 minutos.

Microscopia electrónica de varrimento

Hospedeiros e parasitas: órgãos infectados e as fases larvares dos digéneos, depois de convenientemente isoladas, foram fixados 2 a 4 horas a 4° C em glutaraldeído a 3% tamponado com Dulbecco fosfato salino (DPBS) com um pH 7,4 para 2-4 horas (Gamliel, 1985). Também foi utilizado como fixador glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 nas mesmas condições de tempo e temperatura. Após a fixação o material biológico foi lavado, nos tampões usados na diluição do fixador, durante 2 horas a 4° C e posfixado 1 hora à temperatura ambiente em tetróxido osmium a 1% no tampão respectivo. A desidratação ocorreu foi efectuada através duma série ascendente de soluções de etanol a 50 %, 75%, 90% e 95%, durante 30 minutos, com duas passagens por etanol absoluto de 1 hora cada seguidas de outras em concentrações similares de isoamiloacetato em etanol a 100% e 3x em isoamiloacetato puro, por um período de 10 minutos em cada. As amostras foram colocadas nos suportes metálicos e secas ao ar. Algumas amostras foram submetidas ao ponto crítico em CO₂ até como termo de comparação entre os dois métodos. Os espécimenes, depois de montados, foram tratados pelo ouro e examinados num microscópio electrónico JEOL JSM 35C SEM.

Células da hemolinfa: Após a colheita, 75 µl de hemolinfa e 25 µl de solução salina de Chernin (1963) foram colocadas em lamelas circulares (18mm de diâmetro), limpas convenientemente, e incubadas em estufa a 26° durante 20 minutos (Morona et al., 1984) para permitir a aderência dos hemócitos. Também foram preparados esfregaços (Cytospin) celulares para observação em MEV. Foram usados 100 µl de hemolinfa centrifugada 5 minutos a 500 rpm. A partir desta fase as células aderentes à lamela foram fixadas em glutaraldeído a 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 durante 1 hora a 4° C e processadas de acordo com a técnica anteriormente descrita para a observação em MEV dos digéneos.

Microscopia electrónica de transmissão

Hospedeiros e parasitas: Órgãos infectados dos hospedeiros e as fases larvares dos digéneos, depois de convenientemente seccionados, foram fixados em glutaraldeído a 3 % em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4, durante 2 horas a 4° C, lavados no tampão usado na diluição do fixador, durante 2 horas a 4° C e posfixados 1 hora à temperatura ambiente em tetróxido osmium a 1% no tampão respectivo. A desidratação foi efectuada através duma série ascendente de soluções de etanol a 50 %, 75%, 90% e 95%, durante 30 minutos, seguida de duas passagens por etanol absoluto de 1 hora cada, e 15 minutos (2x) em óxido de propileno. As peças foram impregnadas em misturas de óxido de propileno e Epon na proporção de 3:1, 1:1 e 1:3 com a duração de 1 hora cada e uma passagem de 1 hora em Epon puro, à temperatura ambiente e 30 minutos a 60° C, em estufa. A inclusão foi efectuada em cápsulas de gelatina cheias com Epon, sendo colocadas na estufa a 60° C durante dois dias, para a polimerização da resina (Glauert, 1975).

Cortes semifinos, com 1 μm , foram feitos com faca de vidro e corados com uma solução de azul de metileno e Azur II, para observação em MO. Cortes ultrafinos, feitos também com faca de vidro, num ultramicrotomo LKB, depois de recolhidos em grelhas de cobre, foram contrastados em soluções aquosas de acetato de uranilo (Watson, 1958) e de citrato de chumbo (Reynolds, 1963), durante 20 e 15 minutos respectivamente. As observações e as microfotografias foram feitas num microscópio electrónico de transmissão JEOL 100CXII a 60 KV.

Células da hemolinfa: Nas amostras obtidas para observação em MET, a hemolinfa recolhida foi colocada imediatamente num tubo Eppendorf contendo uma solução de glutaraldeído a 0,35% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, em gelo, durante 15-20 minutos. A solução foi então centrifugada a 1.500 rpm durante 10 minutos. Depois de retirado o sobrenadante, o sedimento foi fixado durante mais 2 horas a 4°C em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4,

seccionado em pequenos fragmentos, lavados no tampão usado na diluição do fixador, nas mesmas condições de tempo e temperatura e posfixados 1 hora, à temperatura ambiente, em tetróxido osmium a 1%, no tampão respectivo. O material biológico foi em seguida processado como acima descrito para as fases larvares dos digéneos.

Análise de dados

O nível de significância das diferenças observadas, na relação hospedeiro/parasitas com as estações de colheita, com a concentração celular, com os diferentes tipos de hemócitos e com o "stress", ao longo dum ano de observações, e da resposta dos tipos de hemócitos de *C. edule* à injeção *in vivo* de diferentes concentrações duma suspensão de SRBC foi obtido através da aplicação de análise de variância (ANOVA) a um ou dois factores seguida de um teste LSD para comparações múltiplas.

A relação entre a prevalência de infestação e a estação de colheita, ou o período de colheita foi testado pelo teste de Qui-quadrado de independência.

CAPÍTULO 3

**DIFFERENCES IN INFESTATION INTENSITY AND
PREVALENCE OF HINGE AND MANTLE MARGIN
MEIOGYMNOPHALLUS MINUTUS METACERCARIAE.
(GYMNOPHALLIDAE) IN *CERASTODERMA EDULE*
(*BIVALVIA*): POSSIBLE SPECIES COEXISTENCE IN
RIA DE AVEIRO**

Fernanda Russell-Pinto

J. Parasitol., 76: 653-569, 1990

DIFFERENCES IN INFESTATION INTENSITY AND PREVALENCE OF HINGE AND MANTLE MARGIN *MEIOGYMNOPHALLUS MINUTUS* METACERCARIAE (GYMNOPHALLIDAE) IN *CERASTODERMA EDULE* (BIVALVIA): POSSIBLE SPECIES COEXISTENCE IN RIA DE AVEIRO

Fernanda Russell-Pinto

Department of Aquatic Zoology, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Oporto, 4000 Porto, Portugal

ABSTRACT: *Cerastoderma edule* is a bivalve mollusc of considerable importance to the economy of Portugal. The present study concerns the prevalence and intensity of infection of *C. edule* by *Meiogymnophallus minutus* metacercariae at 4 collection sites in Ria de Aveiro. Metacercariae were observed below the hinge and mantle margin locations. Differences in the infestation prevalence and intensity between the metacercariae obtained from the 2 host sites suggest the existence of 2 distinct species, *Meiogymnophallus minutus* (enveloped by the host mantle below the hinge of the cockle) and *Gymnophallus fossarum* (free in the peripheral extrapallial space). The Ria de Aveiro may be at a geographical location conducive to species coexistence due to overlapping of definitive host ranges of Atlantic and Mediterranean populations.

The life cycle of *Meiogymnophallus minutus* (Trematoda: Digenea) has a cercarial stage that develops in the pelecypod, *Scrobicularia plana* (Veneroida), and a metacercarial stage in *Cerastoderma edule* that was described at first as developing unencysted (Lebour, 1911; Cole, 1938; Loos-Frank, 1971) below the umbo and is now known to be enveloped by the extrapallial face of the host mantle in a wedge-shaped cavity below the hinge of *C. edule* (Bowers and James, 1967; James et al., 1976). The definitive hosts of *M. minutus* are *Haematopus ostralegus* and *Melanitta nigra* (James et al., 1976). There is no published study of the prevalence and intensity of parasitism of *C. edule* in Portugal.

This paper presents the results of a quantitative study of the prevalence and intensity of infection at 4 sites along the Ria de Aveiro; in addition, the physical characterization of the cercaria and the metacercaria at the 4 sites is described.

MATERIALS AND METHODS

Scrobicularia plana and *C. edule* were collected at 4 sites (Fig. 1) of Ria de Aveiro chosen because of reported differences in the presence of *S. plana* and their different distances from the river's mouth. *Scrobicularia plana* is present at sites 3a and 3b (João Bela, pers. comm.). Sites 1 and 2 were chosen to observe the differences in the number of cercaria reaching *C. edule*, the second intermediate host. A total of 1,508 specimens of *S. plana* and 321 specimens of *C. edule* was

collected between February 1986 and April 1989 (Tables I and II, respectively).

After collection, *S. plana* was isolated in small glass containers in natural brackish water at room temperature: the water was examined with a stereomicroscope (Nikon SMZ-2T) for the presence of cercaria. The water was changed every 2 days. When cercariae were found, a 10-ml sample of water was transferred to a cylindrical glass trough and the number of cercaria counted.

Cerastoderma edule was maintained in laboratory tanks filled with aerated water and filtered brackish water. Specimens were dissected to search for metacercaria, enveloped by the mantle below the hinge. Worms were removed, counted, and flattened between 2 glass slides for detailed study.

Measurements of the cercariae body lengths, widths, and sucker diameters were done on specimens fixed for scanning electron microscopy (SEM) and kept in Dulbecco's buffer at 4 C. Living cercariae in brackish water were studied under coverglass pressure, using a compound binocular microscope (Nikon 102).

Cercariae and metacercariae were fixed in Bouin's fixative, dehydrated with serially diluted ethanol (50%, 75%, 90%, 95%, and 100%), and cleared in benzol before paraffin embedding. Sections (7 µm) were stained with Mayer's hemalumen-eosin.

For SEM, sporocysts, cercariae, and metacercariae were fixed in 3% glutaraldehyde buffered with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) at pH 7.4 for 2-4 hr at 4 C (Gamliel, 1985). Fixed specimens were washed in DPBS for an additional 2 hr at 4 C and postfixed for 1 hr at room temperature in 1% osmium tetroxide in DPBS. Dehydration was carried out first through a series of ethanol concentrations (50-100%), followed by a series of similar isoamylacetate solutions in 100% ethanol (10 min each concentration) and 3 passages (of 10 min each) in 100% isoamylacetate (H, Fig. 2). After the last passage, the preparations were air dried and mounted. Some samples were critical point dried in CO₂ (M, Fig. 2). Mounted specimens were coated with gold and examined in a JEOL JSM 35C SEM.

Received 10 November 1989; revised 26 February 1990; accepted 7 April 1990.

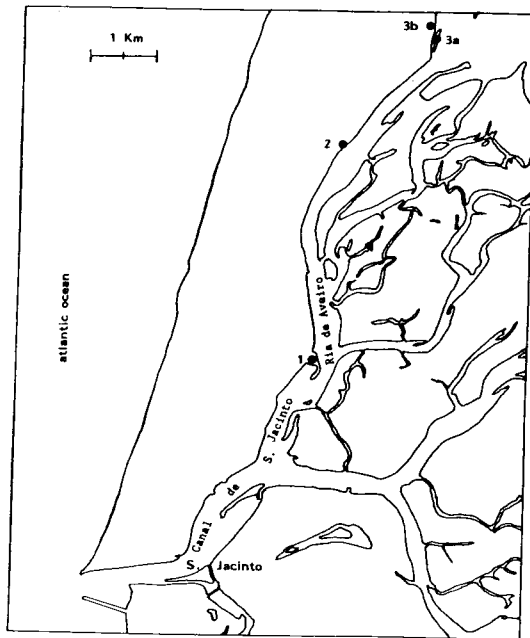


FIGURE 1. Map of localization of the sample collection sites in Ria de Aveiro.

RESULTS

Worm localization

Sporocysts: The sporocysts of *M. minutus* occurred in the digestive gland and gonad of the bivalve *S. plana*, where they tended to substitute for the respective host tissue. They were filamentous and whitish and contained a great number of cercariae at different stages of development. The natural emission of thousands of cercariae lasted longer than 15 days under laboratory conditions.

Metacercariae: Metacercariae of *M. minutus* were found in *C. edule*, the second intermediate host. They were found in the extrapallial cavity below the hinge of the edible cockle, enclosed by the extrapallial epithelium of the host's mantle wall, as previously described by Bowers and James (1967). These metacercariae are referred to, in this work, as hinge metacercaria (H, Fig. 2). In addition to these, identical worms also were found in the peripheral extrapallial space between the adductor muscles, in the folds of the margins of the mantle. In contrast with the hinge metacercariae, the mantle margin metacercariae were not enveloped by the mantle epithelium. These are referred to as mantle margin metacer-

TABLE I. Prevalence of *Meiogymnophallus minutus* cercariae in *Scrobicularia plana*.

| Station* | Date of collection | Number examined | Number infected |
|----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| 3a | Feb/86 | 18 | — |
| 3a | Mar/86 | 25 | 1 |
| 3a | Apr/86 | 28 | — |
| 3a | May/86 | 99 | 2 |
| 3a | Jun/86 | 162 | 3 |
| 3a | Jul-Dec/86 | 151 | — |
| 3a | Mar/87 | 18 | 1 |
| 3a | Apr/87 | 80 | — |
| 3a | May/87 | 61 | 1 |
| 3a | Jun/87 | 70 | 1 |
| 3a | Sep/87 | 62 | — |
| 3a | Oct/87 | 17 | — |
| Prevalence (%) | | | 1.13 |

* No infection was found in 717 *S. plana* in the ensuing 18 mo at site 3b.

cariae (M, Fig. 2) and may correspond to the metacercariae of *Gymnophallus fossarum* described earlier by Bartoli (1965) in *Cerastoderma glaucum*.

Quantitative study

Prevalence of infestation of *S. plana* (Table I): *Scrobicularia plana* was only found at stations 3a and 3b. A total of 791 clams was collected between February of 1986 and October 1987 from site 3a, of which 9 (1.13%) were infected. In contrast, no infected *S. plana* was found in station 3b among the 717 animals collected between October 1987 and April 1989 (Table I).

Prevalence of infestation of *C. edule* (Table II, Fig. 3): A total of 91 cockles was examined from site 3a between February 1986 and October 1987, of which 85 (93.3%) had metacercariae in the hinge and 76 (83.5%) had mantle infestation.

Between October 1987 and April 1989, 90 clams were examined from station 3b, of which 84 (93.3%) had hinge metacercariae; from station 2, 75/81 (92.6%) were infected; and 41/49 (83.7%) examined at station 1 had hinge metacercariae. As summarized in Table II, the prevalence of infestation in the hinge was generally higher than the prevalence of mantle margin infestation: 66% (station 3b), 56.8% (station 2), and 14.3% (station 1). These differences are represented graphically in Figure 3.

Intensity of infestation of *C. edule*: Differences between the hinge and the mantle also were observed in the numbers of metacercariae recovered from *C. edule* collected at all stations (Table III, Fig. 4). With the exception of station

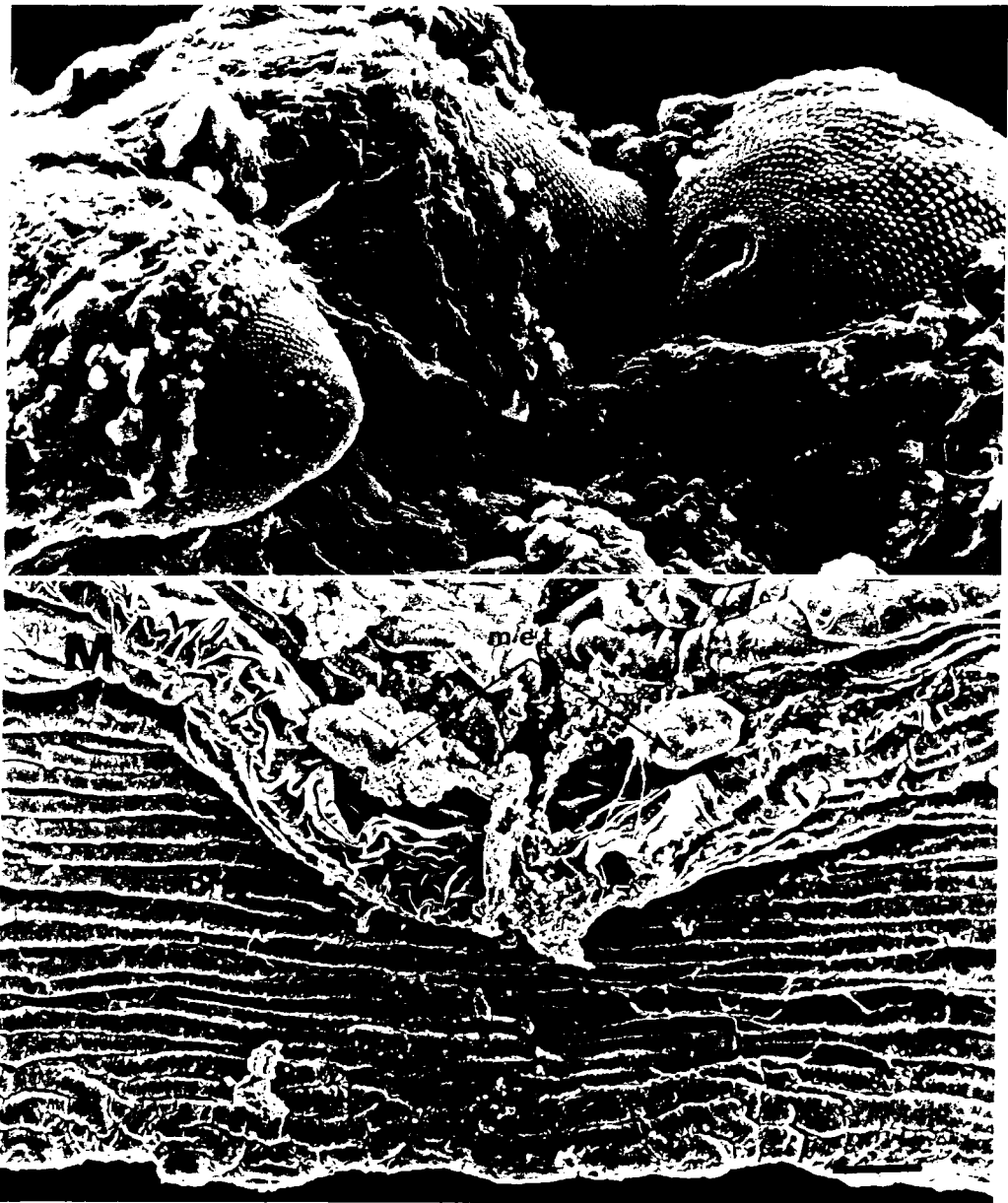


FIGURE 2. Scanning electron micrographs of *Meiogymnophallus minutus* (H) (bar = 10 μ m) and mantle margin (M) metacercariae (met) (bar = 100 μ m).

1 at which the range of metacercariae found in the hinge (1–20) was not much higher than that seen in the mantle (1–3), in the clams collected from all the other stations the average number of metacercariae found in the hinge was considerably higher than that found in the mantle (Table III).

Thus at station 3a, an average of 139.5 ± 54 (range 44–318) metacercariae was seen in the hinge in contrast with 13.5 ± 10.2 (range 2–40) found in the mantle margins. At station 3b, the average number of metacercariae in the hinge was 113 ± 62 (range 16–298) in contrast with 11 ± 10 in the mantle (range 1–36). At station

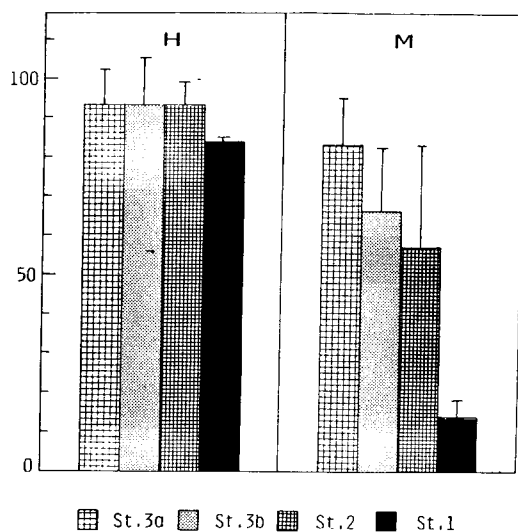


FIGURE 3. Prevalence (%) of infestation of *Meio-gymnophallus minutus* metacercariae in the hinge (H) and mantle margin (M) of *Cerastoderma edule* at 4 locations in Portugal.

2, the infestation intensities in the hinge and mantle were 80 ± 60.5 (range 6–335) and 6.6 ± 7.6 (range 1–33), respectively. A summary of these results illustrating graphically the differences observed is presented in Figure 4.

Dimensions of the cercariae (Table IV): The average body length of the fixed cercariae collected from station 3a was $208.60 \pm 29.00 \mu\text{m}$ and the average body width was $51.90 \pm 12.06 \mu\text{m}$ (Table IV).

The length of the tail, stem, and furca corresponds to $\frac{2}{3}$ of the body length. This constitutes a highly contractile organ and its dimensions vary widely in fixed worms. When swimming, the tail is perpendicular to the body. At rest it maintains a position against the body. The oral sucker's length is longer than its width ($33.04 \pm 5.17 \mu\text{m}$ vs. $26.00 \pm 2.30 \mu\text{m}$); it is also longer than the

TABLE II. Prevalence of *Meio-gymnophallus minutus* metacercariae in *Cerastoderma edule*.

| Station | Hinge (infected/total) | | Mantle (infected/total) | |
|---------|---------------------------|------|----------------------------|------|
| | | % | | % |
| 1* | 41/49 | 83.7 | 7/49 | 14.3 |
| 2* | 75/81 | 92.6 | 46/81 | 56.8 |
| 3b* | 84/90 | 93.3 | 66/100 | 66.0 |
| 3a† | 85/91 | 93.4 | 76/91 | 83.5 |

* Specimens collected between October 1987 and April 1989.

† Specimens collected between February 1986 and October 1987.

TABLE III. Intensity of infestation of *Cerastoderma edule* by *Meio-gymnophallus minutus* metacercariae.

| Station | Site | Number examined | <i>M. minutus</i> intensity | Mean intensity (n) |
|---------|--------|-----------------|-----------------------------|--------------------|
| 1 | Hinge | 49 | 1–20 | 15.7 ± 8.8 |
| | Mantle | 49 | 1–3 | 1.7 ± 0.8 |
| 2 | Hinge | 81 | 6–335 | 80.0 ± 60.5 |
| | Mantle | 81 | 1–33 | 6.6 ± 7.6 |
| 3b | Hinge | 90 | 16–298 | 113.1 ± 62.1 |
| | Mantle | 100 | 1–36 | 11.0 ± 10.1 |
| 3a | Hinge | 91 | 44–318 | 139.5 ± 54.0 |
| | Mantle | 91 | 2–40 | 13.3 ± 10.2 |

ventral sucker. The ventral sucker width is slightly larger than its length ($25.04 \pm 3.55 \mu\text{m}$ vs. $22.32 \pm 2.29 \mu\text{m}$).

Dimensions of the metacercariae (Table V): The average measurements taken of living metacercariae differed slightly among the specimens collected at the different stations. In general, the dimensions of the metacercariae that were observed in the mantle margins were smaller than those of the metacercariae seen under the hinge (Table V).

The average body length of hinge metacercariae varied between $311.2 \mu\text{m}$ (station 2) and $290.0 \mu\text{m}$ (station 1). The average body width was $151.1 \mu\text{m}$ in the specimens collected at station 1 and $137.3 \mu\text{m}$ at station 2. For the mantle metacercariae the largest length and width were $290.7 \mu\text{m}$ (station 3a) and $146.1 \mu\text{m}$, respectively, and the shortest length at station 3b was $285.4 \mu\text{m}$ and the smallest width at station 1 was $132.7 \mu\text{m}$.

In specimens collected at all stations, the oral sucker was consistently bigger than the ventral sucker or the acetabulum; both oral and ventral suckers were wider than they were long (Table V). The average ratio of the oral : ventral sucker

TABLE IV. Physical characterization of fixed cercariae of *Meio-gymnophallus minutus*.*

| | Mean \pm SD | Range | n |
|-----------------------|--------------------|---------|----|
| Body length | 132.06 ± 17.18 | 104–161 | 24 |
| Oral sucker length | 33.04 ± 5.17 | 26–42 | 24 |
| Oral sucker width | 26.00 ± 2.30 | 21–31 | 24 |
| Ventral sucker length | 22.32 ± 2.29 | 18–26 | 24 |
| Ventral sucker width | 25.04 ± 3.55 | 18–31 | 25 |
| Tail stem length | 36.96 ± 9.63 | 23–60 | 28 |
| Tail stem width | 17.83 ± 1.54 | 16–21 | 28 |
| Furca length | 43.83 ± 10.54 | 29–70 | 27 |
| Cercaria width | 51.90 ± 12.06 | 36–83 | 26 |
| Cercaria length | 208.60 ± 29.00 | 143–252 | 28 |

* Measurements in μm .

TABLE V. Physical characterization of metacercariae studied.

| | Station 1 | | Station 2 | | Station 3a | | Station 3b | | All stations | |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
| | Hinge | Mantle | Hinge | Mantle | Hinge | Mantle | Hinge | Mantle | Hinge | Mantle |
| Body length | 290.0 ± 30.2* 240-350† 31‡ | 285.7 ± 34.1 150-330 20 | 311.2 ± 31.7 250-380 42 | 290.3 ± 28.6 260-320 36 | 290.0 ± 29.7 240-330 44 | 285.4 ± 29.1 230-320 54 | 292.3 ± 26.3 240-330 84 | 290.7 ± 24.5 240-330 80 | 295.4 ± 28.9 | 288.5 ± 27.7 |
| Body width | 151.1 ± 14.8 110-170 27 | 132.7 ± 30.6 130-160 20 | 137.3 ± 34.9 70-180 41 | 135.7 ± 28.7 90-170 35 | 140.5 ± 31.7 70-180 43 | 140.2 ± 25.4 80-160 53 | 151.3 ± 13.1 120-180 83 | 146.1 ± 13.6 120-170 80 | 145.9 ± 24.2 | 141.1 ± 22.6 |
| Oral sucker length | 36.3 ± 4.9 29-44 31 | 34.9 ± 4.0 31-39 20 | 37.0 ± 6.6 26-49 40 | 38.5 ± 7.2 23-47 34 | 39.4 ± 5.9 31-47 44 | 37.3 ± 6.8 23-49 53 | 37.8 ± 5.8 23-49 82 | 35.4 ± 6.8 26-47 80 | 38.7 ± 5.9 | 36.5 ± 6.6 |
| Oral sucker width | 38.3 ± 4.3 31-47 31 | 38.0 ± 5.5 29-42 20 | 38.6 ± 6.3 26-49 40 | 39.9 ± 5.2 34-47 33 | 40.4 ± 4.2 34-47 44 | 39.1 ± 5.2 31-49 55 | 39.3 ± 4.7 31-47 85 | 38.3 ± 5.2 29-47 79 | 39.3 ± 4.9 | 38.8 ± 5.2 |
| Ventral sucker length | 26.2 ± 4.3 18-34 32 | 26.6 ± 4.3 18-34 20 | 27.7 ± 3.7 23-36 39 | 28.4 ± 2.7 26-31 33 | 27.6 ± 4.9 18-34 43 | 26.8 ± 4.0 18-34 53 | 26.8 ± 4.7 18-34 83 | 26.1 ± 3.7 18-31 76 | 27.0 ± 4.5 | 26.8 ± 3.7 |
| Ventral sucker width | 29.1 ± 2.8 26-34 32 | 29.4 ± 4.3 18-36 20 | 29.4 ± 3.0 26-33 38 | 29.7 ± 2.3 26-34 31 | 29.1 ± 4.0 23-34 43 | 28.7 ± 3.6 21-36 53 | 28.4 ± 3.9 18-34 83 | 28.1 ± 3.6 21-31 79 | 28.8 ± 3.7 | 28.7 ± 3.5 |
| Preacetabulum length | 138.9 ± 31.5 81-185 32 | 159.6 ± 24.6 62-184 20 | 152.0 ± 21.7 120-192 39 | 138.8 ± 19.2 117-169 32 | 140.3 ± 24.3 112-182 46 | 135.6 ± 26.3 96-182 50 | 142.1 ± 20.6 104-177 83 | 140.8 ± 26.6 94-185 79 | 143.1 ± 23.7 | 141.1 ± 25.2 |
| Postacetabulum length | 95.1 ± 12.4 81-114 32 | 97.1 ± 12.4 47-112 20 | 99.5 ± 29.0 94-119 39 | 96.4 ± 12.1 81-107 33 | 87.3 ± 20.5 75-174 41 | 94.8 ± 13.0 68-117 53 | 92.3 ± 14.6 62-120 82 | 95.1 ± 13.6 65-120 79 | 93.1 ± 19.3 | 95.5 ± 13.1 |

* Mean ± SD (µm).

† Range.

‡ Number of worms examined.

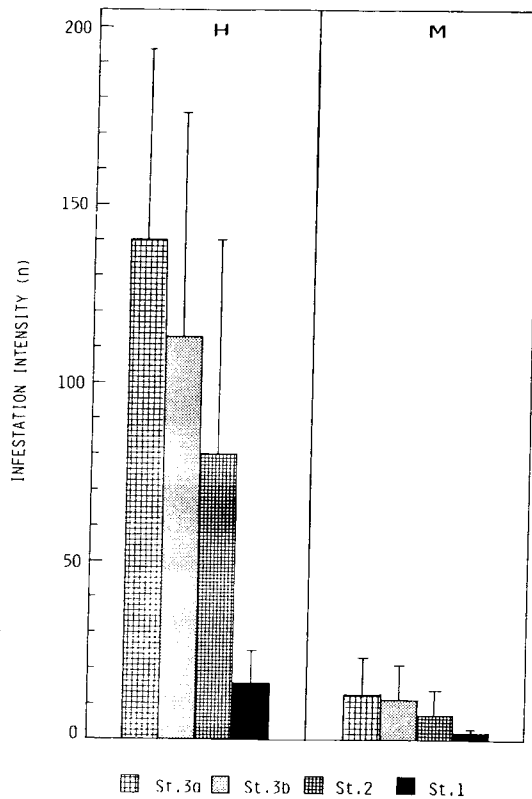


FIGURE 4. Mean intensity of *Meiogymnophallus minutus* metacercariae in the hinge (H) and mantle margin (M) of *Cerastoderma edule* at 4 locations in Portugal.

length was 4.3:3 for the hinge metacercariae and about 4.05:3 for the mantle metacercariae (Table V).

DISCUSSION

Although *C. edule* is a bivalve mollusc of considerable economic importance, to my knowledge this is the first detailed study of the prevalence and intensity of infestation by *M. minutus* metacercariae in Portugal. My choice of studying 4 stations in the Ria de Aveiro was dictated partly by the sizeable contribution of the molluscs collected in Aveiro to the domestic and export markets, and partly because of reported differences in the prevalence of *S. plana* at different distances from the mouth of the river. *Scrobicularia plana* is known to be present at stations 3a and 3b; accordingly, it could be anticipated that the highest prevalence of *C. edule* would occur

at these sites. This was confirmed only for the parasites found in the mantle margins, for which appreciable differences were observed between the ranges and the average number of parasites collected from the mantle margins of *C. edule* from stations 3a, 3b, and 2, and station 1. No difference was noted in the prevalence of the parasites observed in the hinge region.

The existence of differences between the hinge and the mantle margin regions was further reinforced by the study of the infestation intensity. In general, many more parasites were seen in the hinge than in the mantle margins; the difference between the intensity of the infestation at the different stations was also more marked in the hinge than in the mantle margins.

Previous reports from the Camargue (Mediterranean Sea) have described the exclusive presence of metacercariae free in the peripheral extrapallial space, leading to the proposal by Bartoli (1965) that the mantle margin metacercariae represent a different species, *G. fossarum*. The report by James et al. (1976) from Burry Inlet, South Wales, described *M. minutus* in the extrapallial wedge-shaped cavity below the hinge teeth enclosed in host mantle tissue in *C. edule* and the same metacercariae of *M. minutus* free in peripheral extrapallial space in *Cerastoderma glaucum*; this led to some controversy about the possible existence of 2 species. The present report apparently is the first of metacercariae being found simultaneously in significant numbers in the hinge and mantle of *C. edule*. The morphological differences presented in Table V between hinge- and mantle-inhabiting metacercariae may provide further evidence of the existence of 2 species, as proposed by Bartoli (1973). Present results also raise the question of whether the 2 trematode species of molluscs in Ria de Aveiro result from the sympatry of definitive host populations of Mediterranean and Atlantic origin.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grant 87.203/Mar from Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT). I gratefully acknowledge Professor Maria de Sousa for helpful discussions and preparation of the English text and Miss Rosário Lima for technical assistance.

LITERATURE CITED

BARTOLI, P. 1965. Développement expérimental d'une métacercarie nouvelle de la famille des Gymno-

- phallidae Morozov, 1955 (Trematoda: Digenea), parasites de Lamellibranches marins. Bulletin de la Société Zoologique de France **90**: 571-580.
- . 1973. La pénétration et l'installation des cercaires de *Gymnophallus fossarum* P. Bartoli, 1965 (Digenea, Gymnophallidae) chez *Cardium glaucum* Bruguière. Bulletin du Musée d'Histoire Naturelle **117**: 319-334.
- BOWERS, E. A., AND B. L. JAMES. 1967. Studies on the morphology, ecology and life-cycle of *Meio-gymnophallus minutus* (Cobbold, 1859) comb. nov. (Trematoda: Gymnophallidae). Parasitology **57**: 281-300.
- COLE, H. A. 1938. On some larval trematode parasites of the mussel (*Mytilus edulis*) and the cockle (*Cardium edule*). Part II. A new larval *Gymnophallus* (*Cercaria cambrensis*) sp. nov. from the cockle (*Cardium edule*). Parasitology **30**: 40-43.
- GAMLIEL, H. 1985. Optimum fixation conditions may allow air drying of soft biological specimens with minimum cell shrinkage and maximum preservation of surface features. Scanning Electron Microscopy **4**: 1649-1664.
- JAMES, B. L., A. SANNIA, AND E. A. BOWERS. 1976. Parasites of birds and shellfish. In Problems of a small estuary, A. Nelson-Smith and E. M. Bridges (eds.). Quadrant Press Ltd., Swansea, p. 1-16.
- LEBOUR, M. V. 1911. A review of the British marine cercariae. Parasitology **4**: 416-456.
- LOOS-FRANK, B. 1971. Zur Kenntnis der gymnophalliden Trematoden des Nordseeraumes. IV. Übersicht über die gymnophalliden Larven aus Mollusken der Gezeitenzone. Zeitschrift für Parasitenkunde **36**: 206-232.

CAPÍTULO 4

SYMPATRIC DISTRIBUTION OF *MEIOGYMNOPHALLUS MINUTUS* AND *M. FOSSARUM* (DIGENEA: GYMNOPHALLIDAE) IN *CERASTODERMA EDULE* IN THE RIA DE AVEIRO ESTUARY IN PORTUGAL.

Fernanda Russell-Pinto e Pierre Bartoli

Parasitol. Res 78:617-618, 1992

Short communications

Sympatric distribution of *Meiogymnophallus minutus* and *M. fossarum* (Digenea: Gymnophallidae) in *Cerastoderma edule* in the Ria de Aveiro estuary in Portugal*Fernanda Russell-Pinto¹ and Pierre Bartoli²¹ Aquatic Zoology, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences. University of Oporto. Lg. Prof. Abel Salazar, 2. P-4000 Porto, Portugal² Laboratoire de Biologie Marine et d'Ecologie du Benthos Case 901, Faculté des Sciences de Luminy, 13288 Marseille Cédex 9, France

Accepted June 15, 1992

The life cycle of *Meiogymnophallus minutus* and *M. fossarum* includes the peppery furrow shell *Scrobicularia plana* L. as the primary host, cockles as the intermediate hosts, and the oystercatchers *Haematopus ostralegus occidentalis* or *H.O. ostralegus* as the final hosts.

Previous field observations have recorded *M. minutus* metacercariae enclosed in host tissue only in North Atlantic *Cerastoderma edule* and *M. fossarum* free in the extrapallial fluid of the lagoon cockle *C. glaucum* and in other Mediterranean lamellibranchs but not in *C. edule* (Bartoli 1972; James et al. 1977; Bowers et al. 1990). However, Bowers et al. (1990) experimentally infected *C. edule* with *M. fossarum* metacercariae but could not infect *C. glaucum* with *M. minutus* metacercariae. Our observations (see below) clearly support these findings.

The field results obtained by Russell-Pinto (1990) in cockles of the Ria de Aveiro estuary in Portugal (Fig. 1) are reinterpreted in the present report in the light of the work of Bowers et al. (1990). We report for the first time that in this region, the metacercariae of both the North Atlantic species *M. minutus* and its Mediterranean sibling *M. fossarum* occur simultaneously in the same specimens of the estuarine cockle *C. edule*, the former exclusively being enclosed in host tissue under the hinge and the latter occurring free in the extrapallial fluid under the hinge or along the pallial borders of the valves (Fig. 2A). In addition, *C. glaucum* is infected only by *M. fossarum* in the same microhabitats as in *C. edule* (Fig. 2B). *M. minutus* was found in 92% of the *C. edule* studied and *M. fossarum* was detected in 59% (total number of specimens examined, 310). Both species were seen in 174 *C. edule* (56%), a number significantly higher

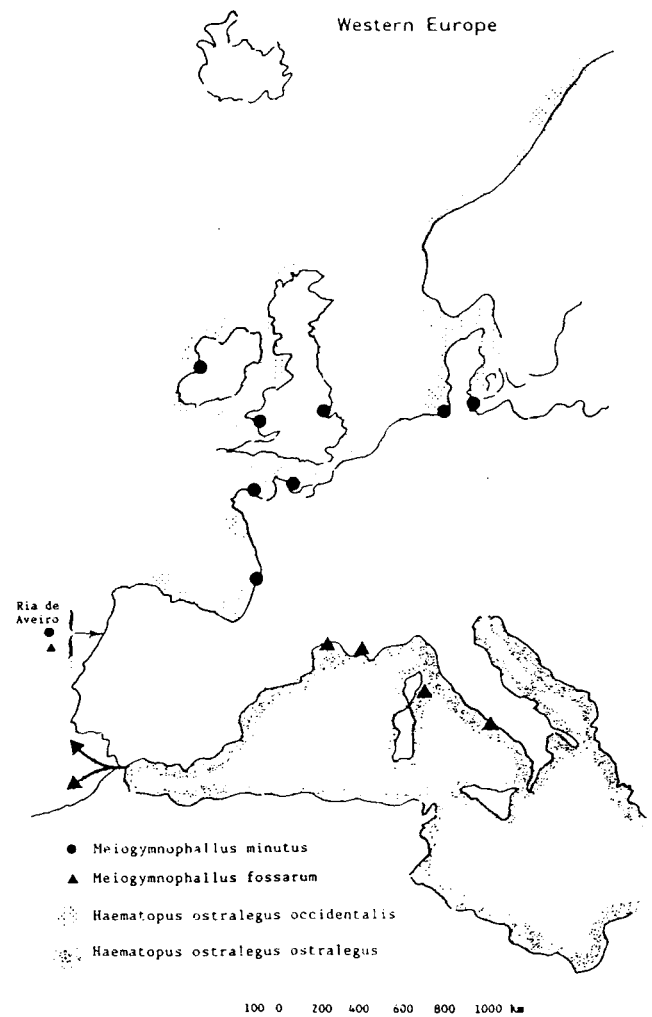


Fig. 1. Map showing the previous well-defined delimitation of the natural infection of *Cerastoderma edule* and *C. glaucum* by *Meiogymnophallus minutus* (●) and *M. fossarum* (▲) as well as the distribution of the definitive hosts *Haematopus ostralegus occidentalis* and *H. o. ostralegus*. Coexistence of the two digeneans in *C. edule* is indicated (thin arrow; ●, ▲) in Ria de Aveiro

* Supported in part by research contract 87203/Mar from the Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica

Correspondence to: F. Russell-Pinto

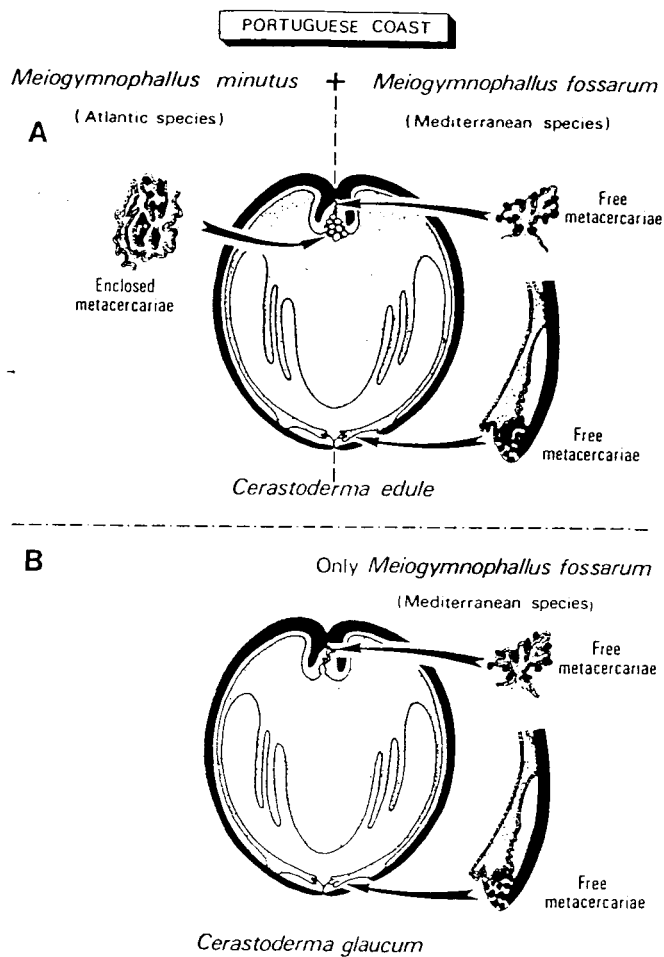


Fig. 2. Distribution of *Meiogymnophallus minutus* and *M. fossarum* in Portuguese *Cerastoderma edule* (A) and *C. glaucum* (B). These Digenea species appear to be sympatric on the Portuguese shores studied

than the expected value (168; $P < 0.026$, χ^2 test) calculated from the single incidence. Only 19% of the *C. glaucum* examined were infected with *M. fossarum*.

The sympatric occurrence of *M. minutus* and *M. fossarum* in *C. edule* on Portuguese shores is consistent with the previously reported observations of *M. minutus* and, in relation to *M. fossarum*, with the sightings of many Mediterranean species in this region, which designates it as Lusitano-Mediterranean. Both primary host and small numbers of the final host (Silva Luis, personal communication) have also been recorded in this region.

Acknowledgements. We are grateful to Profs. E.A. Bowers and B.L. James for helpful discussions and for their contributions during the final preparation of the manuscript.

References

- Bartoli P (1972) Les cycles biologiques de *Gymnophallus nereicola* J. Rebecq et O. Prévot, 1962 et *G. fossarum* P. Bartoli, 1965 espèces jumelles parasites d'oiseaux de rivages marins (Trematoda, Digenea, Gymnophallidae). *Ann Parasitol Hum Comp* 47: 193-223
- Bowers EA, Bartoli P, James BL (1990) A demonstration of allopatric sibling species within the Gymnophallidae (Digenea). *Syst Parasitol* 17: 143-152
- James BL, Sannia A, Bowers EA (1977) Parasites of birds and shell-fish. In: Nelson-Smith A, Bridges EM (eds) *Problems of a small estuary*. Quadrant Press, Swansea, pp 1-16
- Russell-Pinto F (1990) Differences in infestation intensity and prevalence of hinge and mantle margin *Meiogymnophallus minutus* metacercariae (Gymnophallidae) in *Cerastoderma edule* (Bivalvia): possible species coexistence in Ria de Avairo. *J Parasitol* 76: 653-659

CAPÍTULO 5

**MORFOLOGIA DOS DIGENEA PARASITAS DE
C. EDULE DA RIA DE AVEIRO.**

HIPERPARASITISMO.

OBSERVAÇÕES NOUTROS LOCAIS DE PORTUGAL

5. 1 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS DIGENEA

PARASITAS DE *C. EDULE* DA RIA DE AVEIRO

HIPERPARASITISMO

OBSERVAÇÕES NOUTROS LOCAIS DE PORTUGAL

Num total de 3816 *C. edule* colhidos na Ria de Aveiro (n=2817), na foz do rio Douro (n=65), provenientes da ria de Olhão (n=441) e de mercados de abastecimento público do Porto (n=449) encontramos as espécies de digéneos discriminados na Tabela 5. 1, nomeadamente *Meiogymnophallus minutus*, *M. fossarum*, *Gymnophallus choledochus*, *G. rebecqui*, *Labratrema minimum*, *Himasthla quissetensis*, *Cercaria cerastodermæ* I (Tab. 5.1).

A espécie parasita dominante foi *M. minutus* (na Ria com 88,71%, no Douro com 50,77%, em Olhão com 53,85% e no mercado 95%), seguida por ordem decrescente de: *H. quissetensis* (Ria=59,19%, Douro=12% mercado =48,48%), *M. fossarum* (Ria=37,5%, Douro= 4%, Olhão=3,8%, mercado 70%), *G. rebecqui* (Ria=4,44%), *L. minimum** (Ria=2,65%, mercado=5,00%), *G. choledochus** (Ria=2,24%, mercado =3,33%), *Cercaria cerastodermæ* I* (Ria=1,60%) Neste trabalho foi observada a infestação simples de *C. edule* em n= 211 e também infestação múltipla (duas espécies n=382; três espécies n=219; quatro espécies, n=10). Também foi observado *C. edule* hiperparasitado por um microsporídeo, *Unicaryum legeri*.

A descrição da morfologia das espécies anteriormente mencionadas provenientes da Ria de Aveiro, a observação de hiperparasitismo e os resultados obtidos noutros locais de proveniência de *C. edule* são descritos em pormenor neste capítulo.

Nota * - espécies que parasitam *C. edule* na fase de cercária pelo que a prevalência é muito menor do que a da fase metacercária.

Tabela 5. 1 - Identificação de espécies de tremátodes digéneos observados em *C. edule* e em outros hospedeiros intermediários em Portugal

| Famílias, Espécies | Hospedeiro | | Proveniência |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| | Esporoquistos e cercária | Metacercária | |
| GYMNOPHALLIDAE | | | |
| <i>Meiogymnophallus minutus</i> | <i>S. plana</i> | <i>C. edule</i> | Ria, Olhão, Douro |
| <i>Meiogymnophallus fossarum</i> | <i>S. plana</i> | <i>C. edule</i> | Ria, Douro |
| | | <i>C. glaucum</i> | Ria |
| <i>Gymnophallus choledochus</i> | <i>C. edule</i> | <i>C. edule</i> | Ria |
| | | <i>Nereis sp.</i> | Ria |
| <i>Gymnophallus rebecqui</i> | | <i>C. glaucum</i> | Ria |
| | | <i>C. edule</i> | Ria |
| BUCEPHALIDAE | | | |
| <i>Labratrema minimum</i> | <i>C. edule</i> | | Ria, Olhão |
| | <i>C. glaucum</i> | | Ria |
| | <i>S. solida</i> | | Mercado |
| ECHINOSTOMATIDAE | | | |
| <i>Himasthla quissetensis</i> | <i>C. edule</i> | | Ria, Olhão, Douro |
| MONORCHIIDAE | | | |
| <i>Cercaria cerastodermæ I</i> | <i>C. edule</i> | | Ria |
| | <i>C. glaucum</i> | | Ria |

Observámos as fases larvares de esporoquisto, cercária e metacercária destes digéneos em *C. edule*, bivalve interveniente como hospedeiro no seu ciclo de vida como referido na Tabela 5.1, 5.2.

Tabela 5. 2 - Hospedeiros intervenientes no ciclo de vida dos Digéneos que parasitam *C. edule* na Ria de Aveiro.

| DIGÉNEO | Hosp. DEFINITIVO | Hosp. INTERMEDIÁRIO | Hosp. PRIMÁRIO |
|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| <i>M. minutus</i> | <i>H. ostralegus</i> ¹⁾ | <i>C. edule</i> | <i>S. plana</i> |
| <i>M. fossarum</i> | <i>H. ostralegus</i> ¹⁾ | <i>C. edule</i> | <i>S. plana</i> |
| <i>G. choledochus</i> * | <i>T. tadorna</i> ¹⁾ | <i>C. edule</i> | <i>C. edule</i> |
| <i>G. rebecqui</i> * | <i>A. ferina</i> ¹⁾ | <i>C. edule</i> | <i>A. ovata</i> |
| <i>L. minimum</i> | <i>D. labrax</i> ²⁾ | <i>P. microps</i> ²⁾ | <i>C. edule</i> |
| <i>H. quissetensis</i> | <i>L. argentatus</i> ¹⁾ | <i>C. edule</i> | <i>N. obsoletus</i> |
| <i>C. cerastodermæ I</i> | Peixe | Peixe | <i>C. edule</i> |

* - Estas espécies não foram observadas em *C. edule* entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992.

1) - Aves aquáticas ; 2) - Teleósteos

MEIOGYMNOPHALLUS MINUTUS (Cobbold, 1859)

A fase de esporoquisto e cercária foi observada em *S. plana* e a de metacercária em *C. edule*, provenientes da Ria de Aveiro.

Morfologia das fases do ciclo de vida

Microscopia óptica

Esporoquisto

Na dissecação da *S. plana* (hospedeiro primário) (Fig. 1.2) facilmente se observa a infestação por esporoquistos de *M. minutus* (Fig. 5.1a). No seu interior observam-se esferas germinais, que originam embriões de cercárias (Fig. 5.1b), que acabam por atingir o desenvolvimento completo (Fig. 5.1c). Saiem para o exterior por rutura da parede do esporoquisto (Fig. 5.1a). Os esporoquistos formam uma mancha de cor leitosa que encobre toda a glândula digestiva. Esta, quando não parasitada, tem uma cor verde escura característica que sobressai no campo visual amarelado constituído pela massa visceral do lamelibrânquio.

Numa observação mais pormenorizada, à lupa binocular, constata-se que um emaranhado de pequenos sacos filiformes esbranquiçados, os esporoquistos, ocupa todo o tecido da gónada, acabando por se estender às brânquias e à glândula digestiva, donde resulta a destruição da maior parte dos tecidos destes órgãos (Fig. 5.1 d-f).

Cercária

A emissão natural de cercárias deu-se durante 14 e 25 dias, (Março e Junho de 1987). A intensidade de emissão foi, em média, de 600.000 cercárias por dia.

Observada *in vivo*, ao microscópio óptico, a cercária de *M. minutus* é do tipo furcocercária (Fig. 1.4). É formada pelo corpo, oval, onde se encontram os órgãos, e pela cauda. O seu comprimento é de 2/3 do comprimento do corpo (Fig. 5.1c).

A cauda é constituída por duas partes: uma indivisa, o tronco ("stem"), que articula no corpo da cercária, e outra dividida em forma de furca. Pode contrair-se ou

distender-se e adoptar posições diferentes (Fig. 5.2). As mais características são dobrada ortogonalmente em relação ao eixo antero-posterior do corpo ou paralelamente ao mesmo eixo, ao longo da face ventral da cercária. A articulação da cauda imprime à larva um movimento de rotação bastante vigoroso, durante a natação.

A ventosa oral é terminal (Fig. 5.1c), situada na região anterior, onde abre a boca. A esta segue-se a faringe, esférica e bastante musculosa, o tubo esofágico, que abre em dois sacos digestivos cegos, ou ramos intestinais, cujo epitélio de revestimento é constituído por um pequeno número de células, de tipo pavimentoso. Os ramos intestinais situam-se por cima da ventosa ventral ou acetábulo, não ultrapassando o seu bordo anterior. A ventosa ventral está localizada no centro e no início do último terço do corpo da cercária, terminando em fundo cego.

A vesícula excretora da cercária *M. minutus*, de cor preta e situada no extremo posterior do corpo, é constituída por uma massa única central que se prolonga por dois ramos laterais curtos. Está ligada a um canal excretor que atravessa o tronco da cauda, bifurcando-se para os ramos da furca, e abrindo para o exterior por dois poros excretores terminais.

Só foi possível observar, até ao momento, cercárias pertencentes à espécie *M. minutus* em *S. plana* proveniente da estação 3A.

Pelo estudo feito ao longo destes anos, o centro de infestação parece localizar-se na estação 3A, de difícil acesso, único local de proveniência de *S. plana* infectada, apesar do grande número de indivíduos observados originários das outras estações (n=1987 das estações 3B e 2 e n=870 da estação 3A).

Metacercária

A metacercária de *M. minutus* (Fig.5.3a) não é uma metacercária enquistada, como é habitual em grande número de digéneos. Parasita a região extrapaleal subarticular, sob a charneira de *C. edule*.

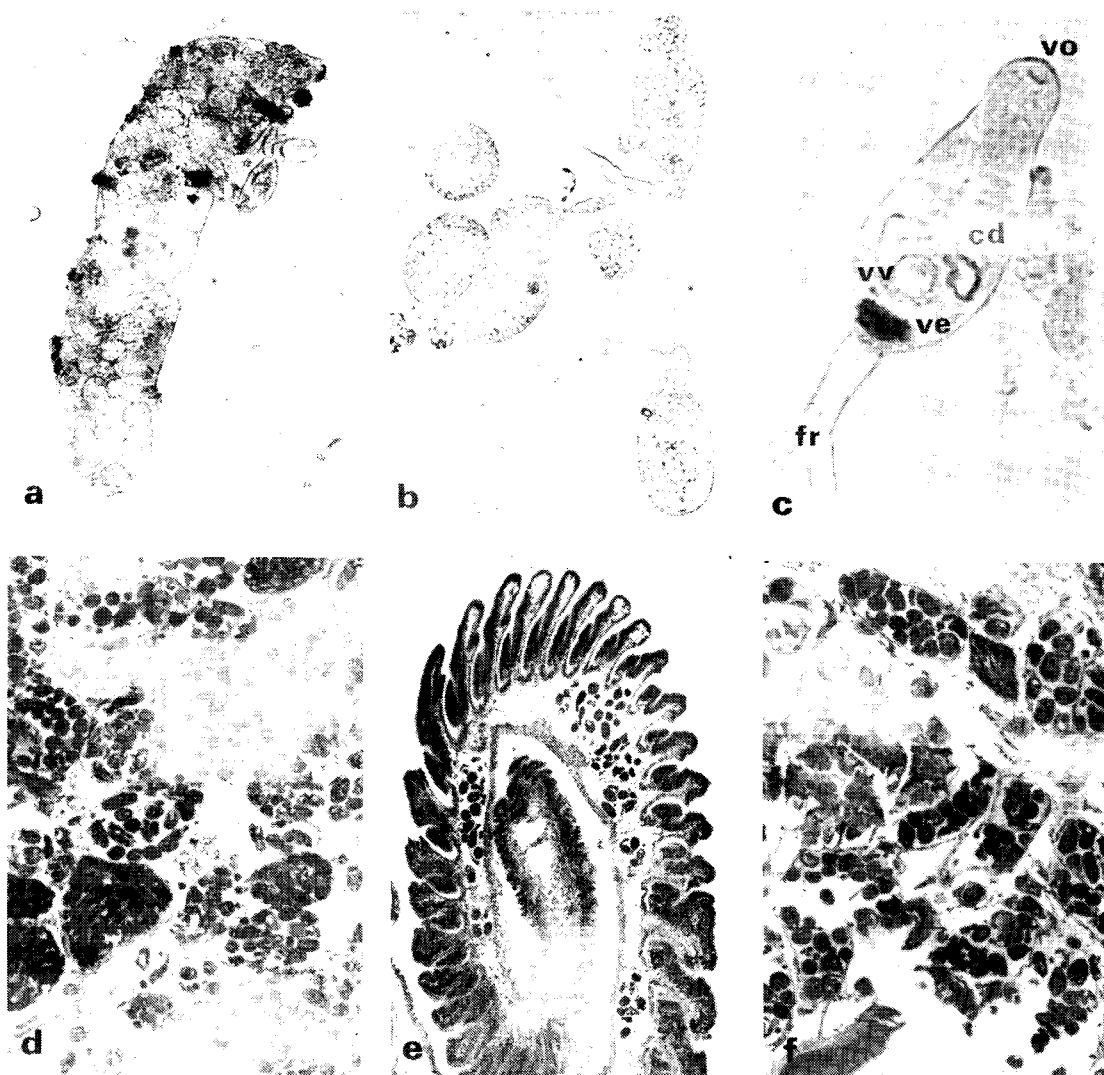


Fig. 5. 1 - Microfotografias de *M. minutus*: - **a** -esporoquisto x 70;- **b** -cercárias em diferentes fases de desenvolvimento x 210;- **c** - cercária x 335; - **d,e,f** - cortes histológicos da infestação da gónada, brânquia e hepatopâncreas de *S. plana* x 40. cd -ramos intestinais, fr -furca, vo -ventosa oral, vv -acetábulo , ve-vesícula excretora.

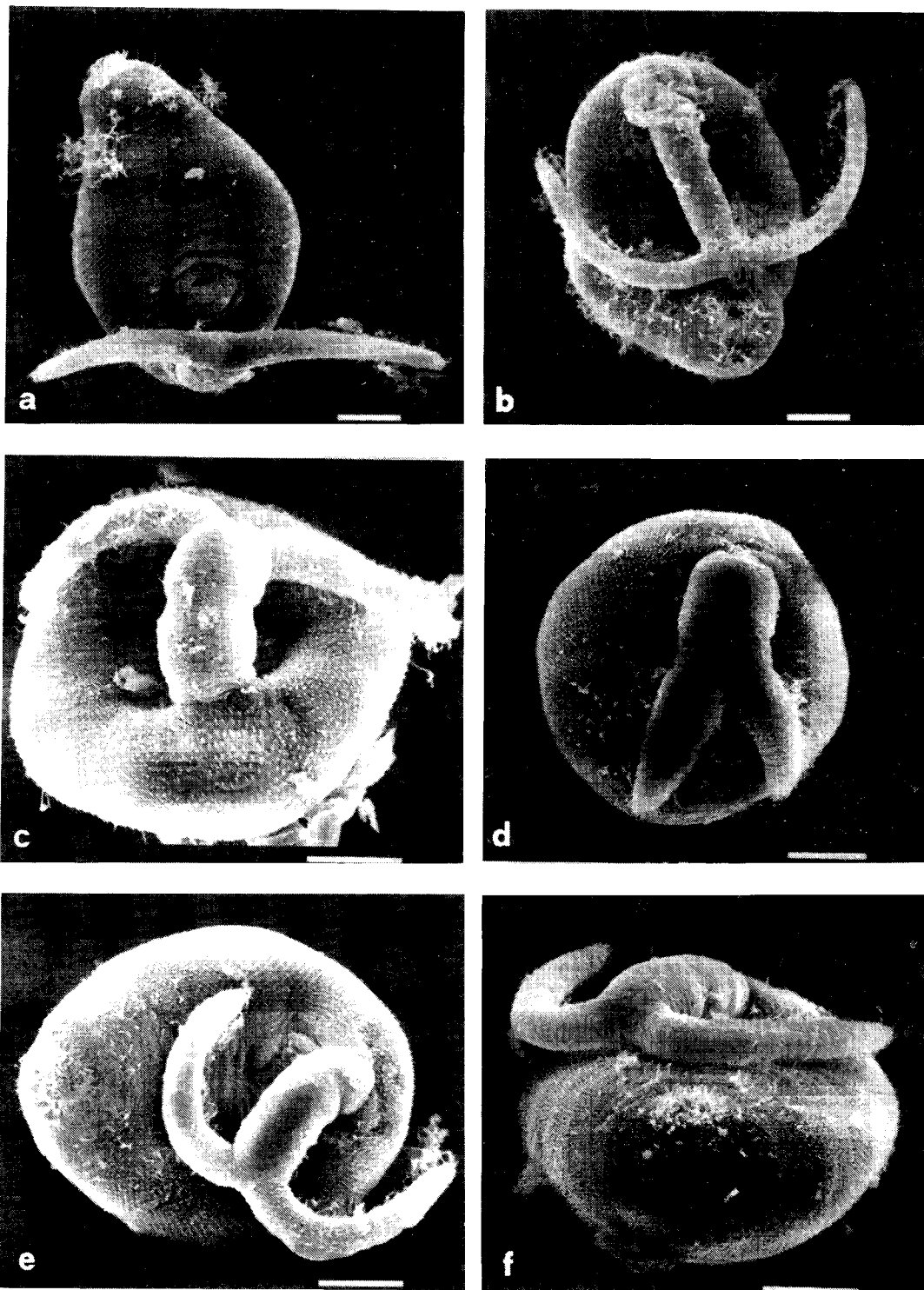


Fig. 5. 2 - Diferentes aspectos da cercária de *M. minutus* durante a fase livre, observadas em MEV (bar. = 10 μ m).

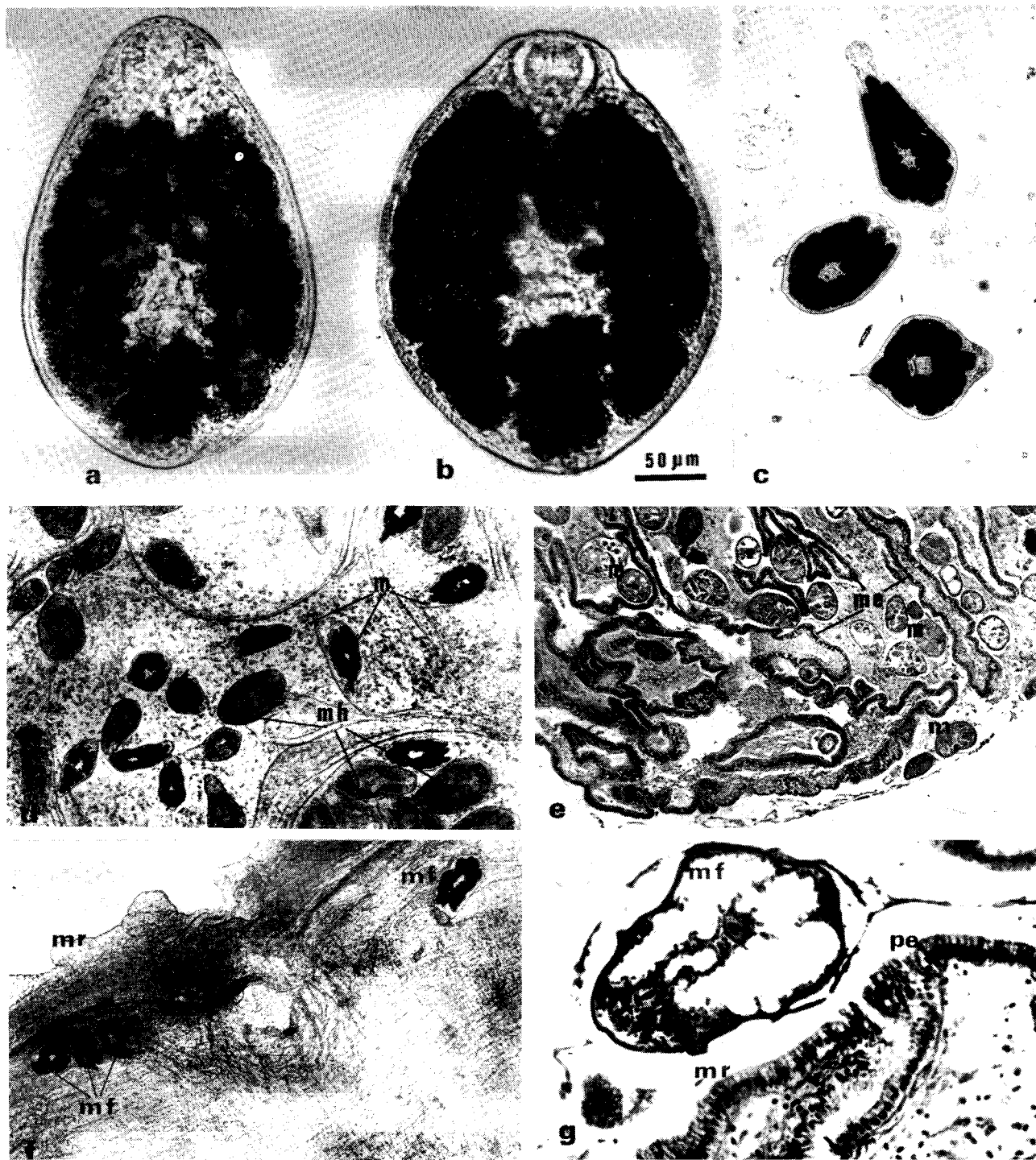


Fig. 5. 3 - Microfotografias de metacercárias de *M. minutus* (a,c,d,e) e de *M. fossarum* (b,f,g). a , b , c -metacercárias (c, x 156); d - metacercárias observadas *in vivo*, x 57; e - Corte histológico de *M. minutus* envolvidos pelo epitélio do manto de *C.edule*, x 57; f - *M. fossarum* observado *in vivo* na margem do manto, x 51; g - Corte histológico de *M. fossarum*, x 260. m - metacercárias, me- manto, mf - *M. fossarum*, mh - metacercárias parasitadas por *U. legeri*. mr -margem do manto, oe -orifício excretor, pe - espaço extrapaleal periférico.

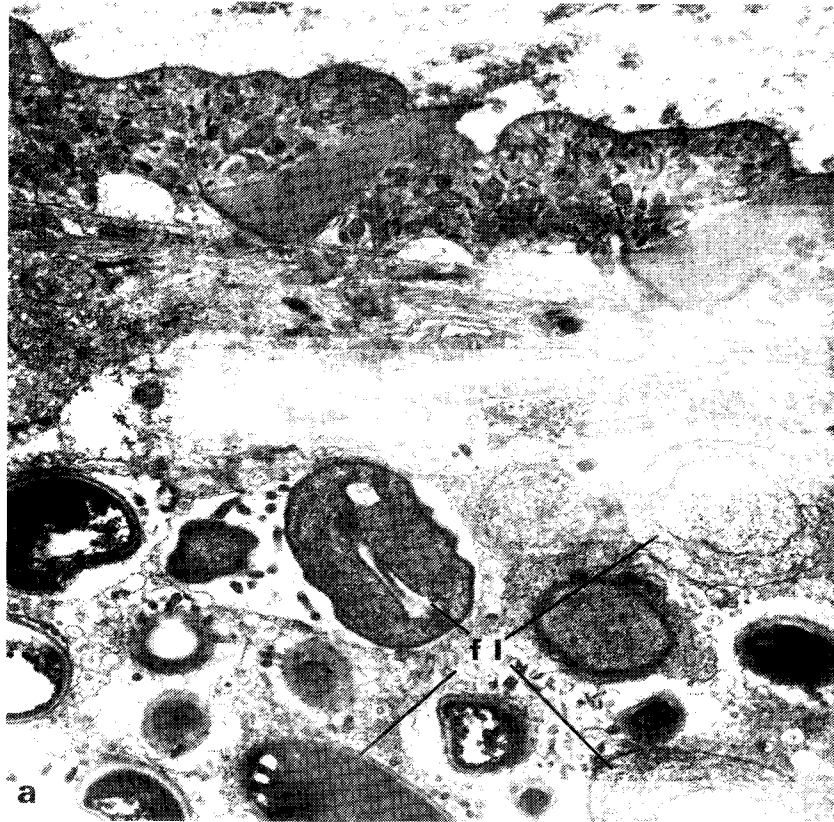


Fig. 5. 4 - *M. minutus* parasitado por *U. legeri* observado em MET. **a** -tegumento de *M. minutus* infestado com fases larvares diferentes (f l) do microsporídeo, x 8.500; **b** -zona parasitada junto à vesícula excretora (ve) cheia de grânulos de excreção (ge), x 4.300; **c** -esporos (es) de *U. legeri*, x 12.800.

As metacercárias são envolvidas pelo epitélio extrapaleal do manto (Fig. 5.3d,e) cujas células proliferam para esse efeito. A metacercária tem a forma dum folha arredondada na região anterior e, por vezes, afinada no extremo posterior.

Quando observada *in vivo*, ao microscópio óptico, apresenta formas variadas provocadas pelos constantes movimentos do corpo, embora estes não provoquem a deslocação do animal (Fig. 5.3c). De notar a permanência dum anel bastante escuro característico, à volta da região central, muito mais clara, onde se localiza o acetábulo. A mancha anelar escura é devida à presença da vesícula excretora.

A ventosa bucal é terminal anterior. À boca segue-se a faringe esférica, de paredes bastante musculosas, e o esófago que se divide em dois ramos intestinais divergentes. Estes não ultrapassam o bordo anterior do acetábulo.

Por baixo da ventosa ventral situa-se a vesícula excretora que se prolonga por dois braços, um da cada lado do corpo, bastante espessos e com a periferia lobulada, cheia de grânulos refringentes, responsáveis pela cor escura que a vesícula apresenta, cuja ultraestrutura pode ser observada na figura 5. 4b. Os braços atingem a base da ventosa oral (Fig. 5.3a). Em metacercárias jovens, a vesícula excretora é pequena e vai-se tornando cada vez mais volumosa à medida que a metacercária se vai tornando infestante, acabando por preencher todo o corpo, impedindo a visualização dos órgãos internos.

O aumento de volume da vesícula excretora é devido à acumulação dos produtos de excreção enquanto as metacercárias permanecem no hospedeiro intermediário, *C. edule*. Se assim não fosse tornariam o meio que as cerca impróprio para o seu desenvolvimento dada a acumulação de detritos no pequeno espaço que as rodeia resultante do seu envolvimento pelo tecido do hospedeiro. Mal as metacercárias são isoladas do manto que as envolve, logo se observa a saída de grânulos pelo poro excretor, que se situa na extremidade posterior do corpo, diminuindo a opacidade da vesícula ao fim dum certo tempo. No desenrolar normal do ciclo evolutivo isto seria

equivalente ao momento em que a metacercária se libertaria dos tecidos do hospedeiro intermediário, após ser ingerida juntamente com ele pelo hospedeiro definitivo.

HIPERPARASITISMO EM *C. EDULE*

Ao dissecar *C. edule* é frequente encontrar a zona do manto, que envolve as metacercárias de *M. minutus*, com uma cor acastanhada, contendo pequenas concreções calcárias de cor semelhante. Nestas condições observam-se sempre metacercárias hiperparasitadas (Fig.5.3d) por um microsporídeo, *Unikaryum legeri* (Dollfus, 1912). Na Figura 5.4 pode ser observada a ultraestrutura de algumas fases do seu ciclo evolutivo.

Este hiperparasitismo provoca um aumento significativo do tamanho da metacercária e a destruição de todos os seus órgãos internos, conservando unicamente o invólucro externo contendo os esporos, não se visualizando qualquer órgão, nem mesmo as ventosas, e a metacercária não mostra qualquer movimento. Quando observadas ao microscópio óptico apresentam uma cor castanha densa.

Em todas as observações feitas entre Outubro de 1991 e Maio de 1992 encontramos metacercárias de *M. minutus* hiperparasitadas, acompanhadas de outras, não hiperparasitadas, com uma morfologia e movimentos normais, que correspondem a uma infecção mais recente.

Foram observados neste período 552 *C. edule*, encontrando-se 131 hiperparasitados. A prevalência de infestação por hiperparasitismo foi de 23,73 %, tendo sido a intensidade mais elevada num só hospedeiro, de 600 metacercárias parasitadas. Neste caso estavam acompanhadas por 37 não parasitadas. O grau de prevalência é mais elevado na estação 3B (37 %) do que nas estações 2 e 1 em que atinge, respectivamente, os valores de 26 % e 12 %.

Os picos de infestação, ao longo dos meses estudados (Fig.5.5), situam-se em Dezembro e Janeiro na estação 3B, em Fevereiro na 2 e em Março na estação 1.

C. edule HIPERPARASITADO POR *Unikaryum legeri*

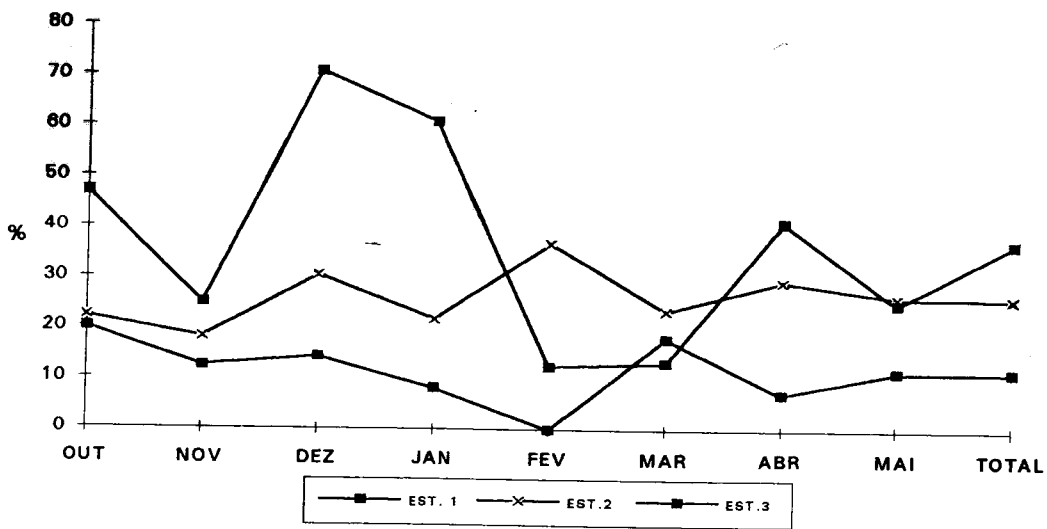


Fig. 5. 5 - Percentagem de *C. edule* hiperparasitado por *Unikaryum legeri*

Dos 131 *C. edule* que foram observados hiperparasitados 20,45 % encontravam-se parasitados (n=27) só com *M. minutus*, 27,2 % só com *M. fossarum* (n=36), 34,09 % com *M. minutus*, *M. fossarum* e *H. quissetensis* (n=45), 15,15 % com *M. minutus* e *H. quissetensis* (n=20) e 0,76 % (n=1) quer com *M. minutus*, *C. cerastodermæ* I, quer com *M. minutus*, *H. quissetensis* e *C. cerastodermæ* I, quer com *M. minutus*, *H. quissetensis* e *L. minimum*. Assim o hiperparasitismo por *U. legeri* foi observado em *C. edule* com infecção simples (*M. minutus*) e múltipla.

Durante este período não foi observado *C. edule* infestado por *G. choledochus*. No entanto em 1987 este digéneo parasitava *C. edule* hiperparasitado, infestado também por *M. fossarum*.

Verificamos que só *M. minutus* se encontrava parasitado por *U. legeri*.

Outros locais : Em amostras recolhidas na Foz do rio Douro em 1987 (Abril e Maio), junto ao Cais Velho, a prevalência média de infestação de *C. edule* por *M. minutus* foi de 72,5 %. Em 40 hospedeiros observados, 29 estavam infectados. A intensidade

média foi igual a 6.8 (198/29), valor bastante menor do que o encontrado na Ria (Cap. 7). Em Novembro de 1992 a prevalência de infestação encontrada foi de 16%, numa amostra de 25 *C. edule*, proveniente do mesmo local, valor muito baixo se comparado com o anterior ou com o valor encontrado na Ria no mesmo mês em 1991 e que foi de 92% .

Também em amostras provenientes dos mercados de abastecimento público da cidade do Porto, foi observada a presença de *M. minutus* com uma incidência de 95% e da Ria de Olhão de 53,85%.

***MEIOGYMNOPHALLUS FOSSARUM* (Bartoli, 1965)**

No decorrer da observação dos diferentes órgãos de *C. edule*, da Ria de Aveiro, foi encontrada uma metacercária morfologicamente muito semelhante à anterior (*M. minutus*) mas localizada no espaço extrapaleal periférico (Fig. 2.4) de *C. edule*, não enquistada, nem envolvida pelo manto, encontrada livre entre as pregas musculares do bordo do manto ou ao longo do istmo paleal da concha. Estas metacercárias livres correspondem à espécie *Meiogymnophallus fossarum* (Fig. 5. 3b) espécie mediterrânica não descrita até agora, como infestante de *C. edule*.

Morfologia das fases do ciclo de vida

Microscopia óptica

metacercária

A metacercaria de *M. fossarum* (Fig. 5.3b) apresenta uma morfologia idêntica à descrita para a sua espécie gémea *M. minutus*. A sua distinção baseia-se em pequenos pormenores. Apesar da semelhança morfológica, as medidas das duas metacercárias são diferentes, sendo *M. fossarum* de menor tamanho. Em *M. minutus* os braços da vesícula excretora não atingem a base da ventosa oral enquanto que em *M. fossarum* a ultrapassam, sendo nesta espécie o seu contorno lobado mais bem definido. A razão

entre as dimensões das ventosas oral/ ventral é igual nas duas espécies - 3/2. No entanto *M. fossarum* ocupa no hospedeiro um microbiótopo completamente diferente de *M. minutus*. O local de infestação das metacercárias é o espaço extrapaleal periférico, ao longo das margens do manto, encontrando-se habitualmente isolada ou em grupos (Fig.5.3f,g), sempre livres e nunca envolvidas pelos tecidos do hospedeiro.

Outros locais: Em Novembro de 1992 foi observada uma pequena amostra de *C. edule* (n=25) proveniente do local junto ao Cais Velho (Foz do rio Douro). A prevalência média de *M. fossarum* encontrada foi de 4 %, valor muito menor do que o encontrado na Ria de Aveiro, 50 %, no mesmo mês de 1991 (Fig.7.7, Cap. 7). *M. fossarum* também foi observado em amostras provenientes dos mercados de abastecimento público da cidade do Porto (70%).

***GYMNOPHALLUS CHOLEDOCHUS* Odhner, 1900**

Os esporoquistos de *G. choledochus* foram observados em *C. edule* provenientes das estações 3A, 3B e 2, desde Junho de 1985 a Setembro de 1991, como se pode ver na tabela 7.3 (Cap. 7). Em Portugal a infestação de *C. edule* por *G. choledochus* não estava referenciada.

Em 189 *N. diversicolor*, observadas entre Janeiro de 1986 e Maio de 1987, foram encontrados três indivíduos parasitados por 9 metacercárias de *G. choledochus*, não enquistadas, usando como microbiótopo a bainha setígera que envolve a acícula dos parápodes, fazendo aumentar o espaço entre a bainha e a acícula, para albergar as larvas. Numa das espécies foi observada a dupla infestação com a presença de *Gymnophallus nereicola* (espécie que usa o mesmo microhabitate), mas em parápodes diferentes.

Na grande maioria dos hospedeiros em que observamos a infestação de *C. edule* por *G. choledochus* verificamos simultaneamente a presença de esporoquistos contendo cercárias e metacercárias enquistadas (Tab. 7.3 ; Fig. 5.6).

Morfologia das fases do ciclo de vida

Microscopia óptica

Esporoquisto

Ao dissecar *C. edule* à lupa, com facilidade nos apercebemos da sua infestação por esporoquistos de *G. choledochus* dada a cor laranja forte que o seu conjunto imprime à região da gónada. Também se encontram esporoquistos disseminados pelo hepatopâncreas. Dado o seu intenso desenvolvimento acabam por destruir os tecidos, principalmente o da gónada.

Os esporoquistos têm a forma de sacos ovóides com 450 µm de diâmetro maior (Fig. 5.5a). Quando observados à lupa sobressaiem algumas dezenas de pequenos pontos no seu interior que assinalam a presença de cercárias. Ao romper o saco, constata-se que estas estão em diferentes fases de desenvolvimento, desde pequenas esferas germinativas até cercárias completamente desenvolvidas, maduras ou infestantes (Fig. 5.5 b,d). Outros esporoquistos contêm só um indivíduo já na fase de metacercária (Fig. 5.6 a). Quando retirados do hospedeiro, facilmente se diferenciam os esporoquistos que albergam as cercárias dos que encerram as metacercárias, que são de menor tamanho e mais opacos.

Cercária

As cercárias (Fig. 5.5 b,c) são do tipo furcocercária (Fig. 1.4) com corpo oval, recoberto de espinhos. O seu comprimento médio é de 170 µm. A ventosa oral é terminal, situando-se o acetábulo no início do terço posterior do corpo. No centro da ventosa oral abre a boca. Segue-se-lhe a faringe, esférica e musculosa, um pequeno

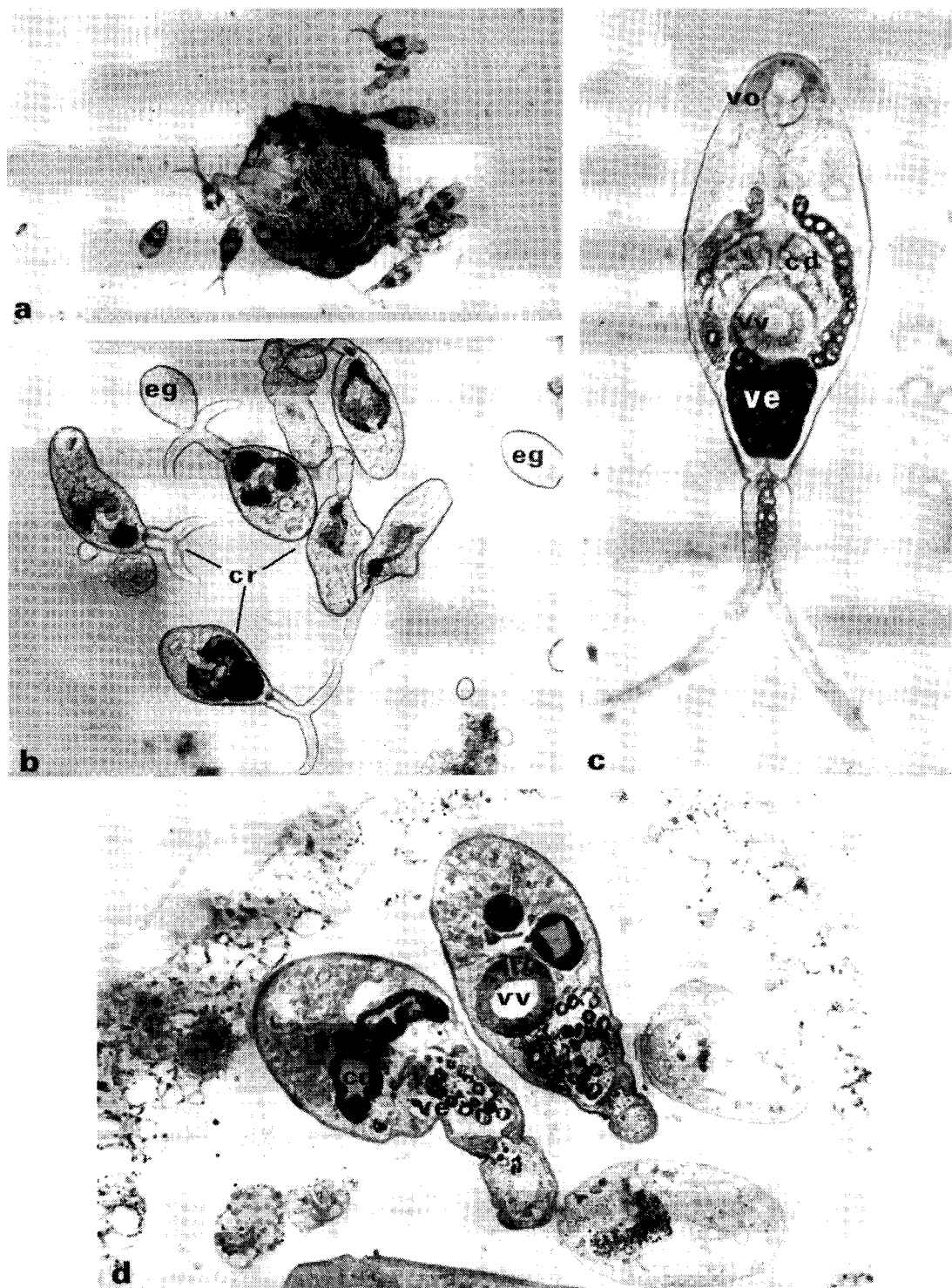


Fig. 5. 5 - Microfotografias das fases larvares de *G. choledochus*. a -esporoquisto, x 55; b -cercárias em diferentes fases de desenvolvimento, x 168; c - cercária, x 550; d - corte semi-fino de esporoquisto e cercárias x 500. cd -ramos intestinais, cr -cercárias, eg -esferas germinais, vo -ventosa oral, vv - acetábulo , ve-vesícula excretora.

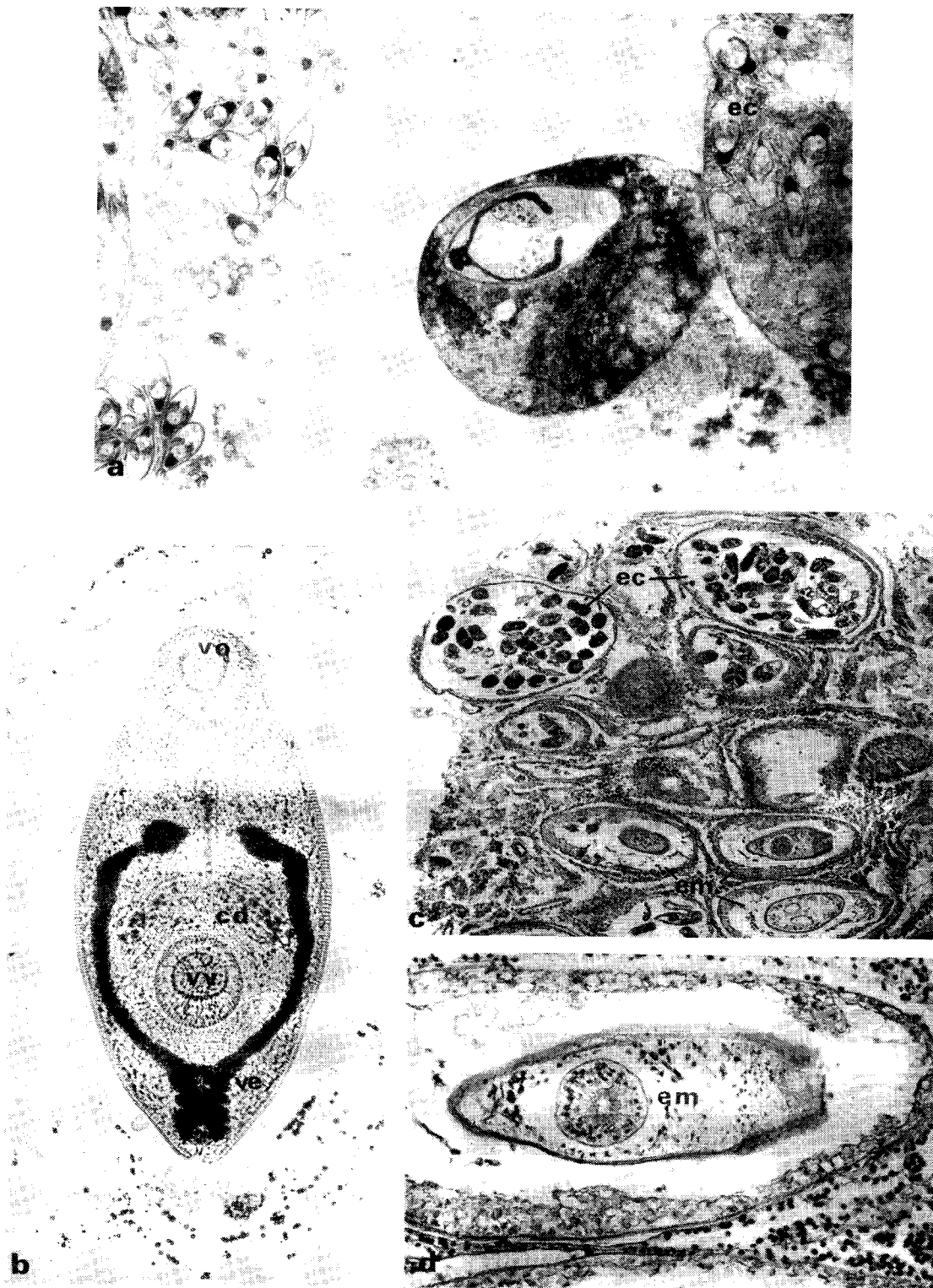


Fig. 5. 6 - Microfotografias de metacercária de *G. choledochus*. **a** - formada no esporoquisto, x 69; **b** - metacercária, x 200 ; **c** - corte histológico da gónada de *C. edule* em que se observam esporoquistos contendo cercárias (ec) e metacercárias (em), x 69 ; **d** - corte histológico duma metacercária, x 230
 cd -ramos intestinais, ve-vesícula excretora, vo -ventosa oral, vv -acetábulo.

esófago, que abre num par de ramos intestinais ovais com igual desenvolvimento e que atingem a zona média de acetábulo (Fig. 5.5 c), um de cada lado.

Em corte semi-fino (Fig. 5.5 d) observa-se que a parede dos ramos intestinais é formada por um pequeno número de células, bastante volumosas.

Não há uma diferença significativa entre os tamanhos das ventosas oral e ventral.

A região pósacetabular é preenchida quase totalmente pelo tronco ímpar da vesícula excretora, em forma de lira, cujos ramos laterais delgados atingem a base da faringe, contornando os ramos intestinais (Fig. 5.5 c,d).

A vesícula excretora está cheia de granulações negras, que são produtos de excreção, e comunica com a cauda através dum canal ventral que se bifurca para os ramos da furca, terminando em dois poros excretores.

Metacercária

Na maior parte de *C. edule* infectado por esporoquistos de *G. choledochus* observa-se o desenvolvimento das cercárias em metacercárias infestantes dentro do esporoquisto, que aí permanecem até que o hospedeiro seja comido pelo hospedeiro definitivo onde a metacercária se liberta, alojando-se na vesícula biliar, e se transforma em adulto, acompanhada também pela maturação do aparelho sexual hermafrodita.

No esporoquisto observamos uma ou mais metacercárias e uma massa amorfa (Fig. 5.6a), possivelmente devida à degenerescência das inúmeras cercárias que nele se encontravam, que talvez contribua para o crescimento e desenvolvimento das metacercárias (Fig. 5.6b).

Como se observa em corte histológico, as cercárias no esporoquisto evoluem para a fase de metacercária (Fig. 5.6c,d). De notar a diferença de tamanhos do corpo das duas fases larvares. Internamente não se observam diferenças significativas na morfologia em relação à descrita para a fase de cercária, nem na relação entre os diferentes órgãos.

Outros locais : Numa das amostras provenientes do mercado da Foz, em que se procurou fazer o despiste parasitário no berbigão de consumo público, também foi encontrado este digénio na fase de esporoquisto (3,33%).

***GYMNOPHALLUS REBECQUI* Bartoli, 1983**

G. rebecqui foi observado em *C. edule* proveniente da Costa Nova, Ilha de Samos, Lagoa do Paraíso (Fig. 2.3) e estação 2 (Fig. 2.2; Tab.5.1).

Foram observadas metacercárias não enquistadas no espaço extrapaleal geral de berbigão que apresentava características de *C. edule* e *C. glaucum*, excepto na estação 2 onde só encontramos *C. edule*. As metacercárias provocam lesões na face interna da concha, endostraco, com a forma de pequenas concavidades, que aparecem na zona de contacto da concha com as metacercárias, onde se alojam. À sua volta nota-se um anel saliente, provocado pelo depósito de material calcário.

***LABRATREMA MINIMUM* (Stossich, 1887)**

Observámos pela primeira vez esporoquistos deste **Bucephalidae** na gónada e glândula digestiva de *C. edule* e de *Spisula solida* (ameijoia branca), em 1985, proveniente do consumo público (mercado da Foz do Douro)

Foram observados esporoquistos contendo cercárias em diferentes estados de desenvolvimento de *L. minimum* em *C. edule* proveniente das estações 3A, 3B, 2, 1 e Lagoa do Paraíso (Figs.2.2 e 2.3).

O microbiótopo escolhido por *L. minimum* é a glândula digestiva e a gónada do hospedeiro, acabando por destruir estes tecidos, o que vai provocar, quando a infestação atinge uma forte intensidade, a castração sexual do bivalve.

As cercárias, quando infestantes, rompem a parede do esporoquisto, migram através dos tecidos do hospedeiro, acumulam-se na cavidade paleal e são lançadas

para o exterior com as correntes de água que saem pelo sifão exalante do lamelibrânquio.

Esta fase larvar também foi encontrada em *C. glaucum* colhido na estação 3A e na Torreira (Fig. 2.2, 2.3).

Morfologia das fases do ciclo de vida de *L. minimum*

Microscopia óptica

Esporoquisto

O esporoquisto de *L. minimum* tem a cor branca leitosa, é saquiforme, bastante longo e ramificado, apresentando, de onde em onde, estrangulamentos (Fig. 5.7 a,b).

Parasita a gónada e o hepatopâncreas de *C. edule*, constituindo um emaranhado bastante denso que acaba por substituir todos os folículos genitais, provocando uma redução na capacidade de reprodução ou até a castração dos bivalves parasitados. Neles se desenvolvem as fases larvares de cercária até à fase adulta infestante (Fig.5.7a).

Cercária

A cercária de *L. minimum* é do tipo gasteróstoma (Fig.1.4) por ter a boca situada no centro duma ventosa, na face ventral (Fig. 5.7 c,d).

O corpo tem uma forma cónica, com a região anterior aguçada, onde se situa o órgão cefálico ou rynchus, e vai alargando para a extremidade posterior onde se encontra a cauda em forma de furca.

O rynchus, órgão característico desta espécie, possui uma depressão central e um grande número de células glandulares que ajudam a penetração no hospedeiro vector. A boca situa-se no centro da ventosa oral, situada na região média da face ventral do digéneo, comunicando com um ramo intestinal único (Fig. 5.7 c).

A vesícula excretora ocupa o espaço pósbucal e nela vêm abrir dois canais excretores longitudinais laterais que se situam ao nível da base do órgão cefálico. Neste canal veem reunir-se os canais colectores protonefridiais.

Na extremidade posterior do corpo está a cauda, com a sua forma de forquilha, constituída por uma base central indivisa, contendo no bordo posterior grande número de células adesivas. A cauda tem lateralmente dois braços extensíveis, finos e longos, que podem atingir um comprimento várias vezes superior ao do corpo da cercária (Fig. 5.7d). Estes apêndices tem pouca utilidade para a locomoção da larva. Desempenham um papel importante na aderência da cercária ao novo hospedeiro.

Tabela 5.3 - Caracterização física de cercária de *Labratrema minimum*

| Cercária | | Média |
|----------|----------------|--------|
| Corpo | comprimento | 483,75 |
| | largura | 113,75 |
| | comp. pósbucal | 242,75 |
| Cauda | comp. da base | 65,98 |
| | largura | 164,45 |
| Rynchus | comprimento | 72,80 |
| | largura | 53,63 |
| Boca | diâmetro | 38,68 |

As dimensões da cercária, referenciadas na tabela 5.3, foram obtidas em oito indivíduos observados *in vivo*, pressionados entre a lâmina e a lamela. Os valores mencionados são valores médios e estão expressos em micra.

Outros locais: uma amostra proveniente do mercado (Fevereiro de 1991) também se encontrava parasitada (5,00%).

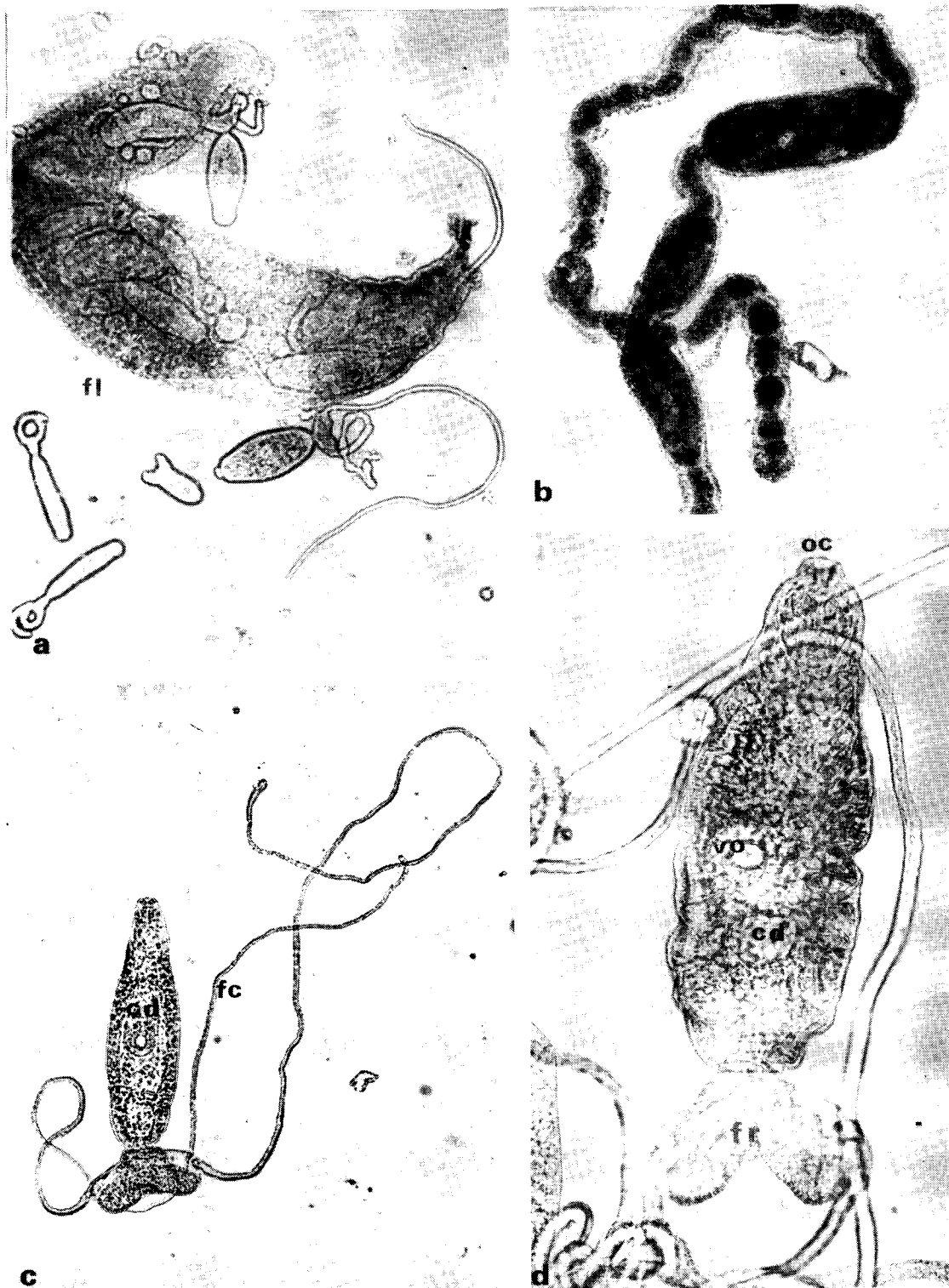


Fig. 5. 7 - Microfotografias das fases de esporoquisto e de cercária de *L. minimum*. a - esporoquisto com cercárias em diferentes fases de desenvolvimento (f l), \times 126; b -esporoquisto com a morfologia característica, \times 60; c -cercária com os filamentos da furca completos (fc) e o ramo do intestino (cd) bem evidente; d - cercária mais ampliada em que se observa o órgão cefálico (oc), o ramo do intestino e a cauda (fr), \times 290.

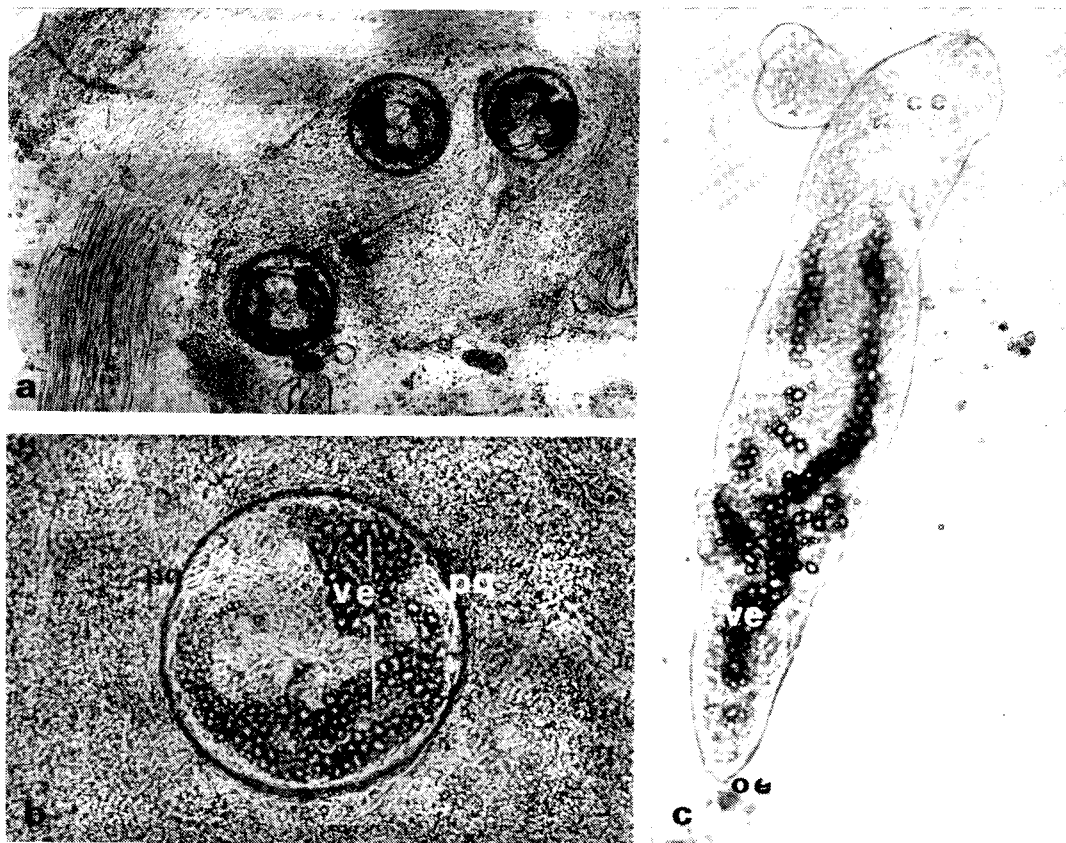


Fig. 5. 8 - Microfotografias das fases larvares de *H. quissetensis*. a e b - esporoquistos, x 78 e x 210; c - metacercária x 180. ce -colar de espículas, oe -orifício excretor, pq - parede do quisto, ve-vesícula excretora .

HIMASTHLA QUISSETENSIS Miller e Northrup, 1926

H. quissetensis foi observada em *C. edule* proveniente das estações 1, 2, 3A e 3B da Ria de Aveiro; em *C. glaucum* e *S. plana* (Ria) desde 1986.

A fase larvar que infesta os lamelibrânquios acima referidos é a de metacercária enquistada. Aqueles bivalves são, em Portugal, hospedeiros vector desta espécie. O possível hospedeiro primário na costa portuguesa deve ser o gastrópode *Nassarius* sp., espécie bastante abundante na Ria, principalmente na estação 1.

Os quistos alojam-se no manto e no pé e por vezes também no hepatopâncreas e na gónada. A maior intensidade de infestação foi observada no manto e no pé. Nos outros órgãos encontram-se quistos dispersos e em pequeno número.

Os quistos foram isolados dos diferentes órgãos do hospedeiro após dissecação. Quando observados por compressão entre duas lâminas, à lupa binocular, alguns quistos apresentavam uma certa opacidade, dado que estavam mortos, não se distinguindo, a maior parte das vezes, a metacercária no seu o interior. Este estava preenchido por pequenos grânulos acastanhados. Esta morfologia faz lembrar a do hiperparasitismo observado na metacercária de *M. minutus*. A incidência dos quistos mortos foi de 17.3%.

Morfologia das Fases do ciclo evolutivo

Microscopia óptica

Metacercária

A metacercária de *H. quissetensis* encerrada num quisto esférico, com 140 µm de diâmetro, encontra-se dobrada em forma de rosca. Na maior parte dos quistos a presença da vesícula excretora é evidenciada pela sua coloração escura e aspecto perolado, em forma de rosário. Por vezes são perceptíveis as espículas que se encontram na região cefálica e as ventosas oral e ventral, quando observados ao microscópio, comprimidos entre lâmina e lamela (Fig. 5.8a,b).

A metacercária, após desenquistamento, tem uma forma alongada mais ou menos cilíndrica, dependendo do seu estado de contracção. Revestiu-se duma certa dificuldade o desenquistamento mecânico e químico das metacercárias.

Na região cefálica tem a forma característica de equinostomatídeos, idêntica a uma gola, (Fig. 5.8c) que envolve a ventosa oral e está interrompida no centro da face ventral. À sua volta encontram-se 31 espinhos em forma de colar, dispostos numa só fiada, excepto na face ventral, dum e doutro lado, em que se nota um agrupamento de quatro espinhos.

A ventosa oral situa-se na extremidade anterior do corpo, é subterminal, arredondada e de menor diâmetro do que a ventosa ventral. O acetábulo situa-se no centro da face ventral.

No extremo posterior do corpo está uma pequena vesícula excretora que se prolonga por dois braços laterais finos, cheios de pequenos corpúsculos pretos, que atingem a base do colar de espinhos. A vesícula excretora abre para o exterior por um poro excretor terminal.

Outros locais: na amostra proveniente da foz do rio Douro foi encontrado *H. quissetensis* em 12% do berbigão observado.

Esta espécie também infesta *C. edule* obtido em locais de abastecimento público. Numa amostra de *C. edule* (Mercado do Bolhão) a metacercária de *H. quissetensis* infestava 48,48% (n = 66) dos hospedeiros.

***CERCARIA CERASTODERMAE* I Sannia, James e Bowers, 1978**

Esta foi a última espécie a ser encontrada como infestante de *C. edule*. Foi detectada em primeiro lugar na glândula digestiva e na gónada de *C. glaucum* apanhado na Torreira (Fig. 2.3), em Maio de 1990. Em Junho e Setembro de 1991 observamos também esporoquistos na brânquia de *C. edule*. *C. cerastodermæ* I

parasita *C. edule* na fase de esporoquisto. Cercárias e metacercárias já enquistadas foram observadas no esporoquisto, o que significa, neste caso, a supressão do hospedeiro intermediário.

Morfologia das fases do ciclo evolutivo

Microscopia óptica

Esporoquisto

Os esporoquistos de *C. cerastodermæ* I têm a forma de saco (Fig. 5.9a), com uma cor rosada, e apresentam uma contractilidade apreciável. Foram observados infestando principalmente a brânquia, a gónada e o hepatopâncreas quer de *C. glaucum* quer de *C. edule*. Os esporoquistos contêm cercárias completamente desenvolvidas, outras fases pré-infestantes e também, por vezes, metacercárias enquistadas (Fig. 5.9b).

O esporoquisto apresenta um órgão, denominado poro de nascimento, que não encontramos nos digénios anteriormente descritos e que parasitam, nesta fase, *C. edule* como *C. choledochus* e *L. minimum*. Como o nome indica é uma abertura de emissão, por onde saiem as cercárias infestantes, deixando o hospedeiro primário para procurar o hospedeiro intermediário.

Cercária

A cercária de *C. cerastodermæ* I (Fig. 5.9b) é do tipo distómio (Fig. 1.4), o mais frequente nos digéneos.

Tem forma oval achatada, com o corpo revestido de espinhos, excepto na cauda. Esta move-se lateralmente, lembrando um chicote. O seu comprimento é ligeiramente superior à metade do comprimento do corpo.

A ventosa oral situa-se na região ventroanterior e o orifício bucal tem uma forma próxima da triangular. À sua volta situam-se as aberturas das glândulas de penetração, em número de oito. A faringe é esférica, de pequeno diâmetro, não

excedendo o da boca. Segue-se o esófago, que se bifurca em dois ramos intestinais longos que atingem a região ímpar da vesícula excretora.

O acetábulo, de diâmetro ligeiramente inferior ao da ventosa oral, situa-se ligeiramente abaixo da linha média da face ventral.

Na região pós-acetabular está situada a vesícula excretora, em forma de V, bilobada, que está preenchida por pequenos grânulos escuros. Dela partem dois ramos laterais finos e curtos, não ultrapassando o acetábulo, onde vêm ligar-se os canais colectores das células flamígeras. Não se observa o canal excretor ao longo da cauda da cercária.

O poro excretor parece situar-se na extremidade posterior do corpo, no início da cauda.

Metacercária

A metacercária de *C. cerastodermæ* I (Fig. 5.9c,d) foi observada enquistada dentro do esporoquisto, no hospedeiro primário *C. edule* e *C. glaucum*.

O corpo é oval e coberto de espinhos que se dispõem em linhas paralelas (Fig. 5.9,d). A disposição dos órgãos é semelhante à da cercária. No entanto a ventosa oral tem um diâmetro quase duplo do da ventosa ventral. Os braços da vesícula excretora, em forma de V (Fig. 5.9,d), são mais longos, atingindo a base da ventosa oral (Fig. 5.9c). O poro excretor localiza-se na extremidade posterior. Em alguns indivíduos observam-se na região anterior, ao nível da base da faringe, glândulas de penetração (quatro pares) que abrem na região cefálica, à volta da ventosa oral (Fig. 5.9d). Noutras metacercárias já não se observam as glândulas de penetração que degeneram durante a maturação desta fase larvar.

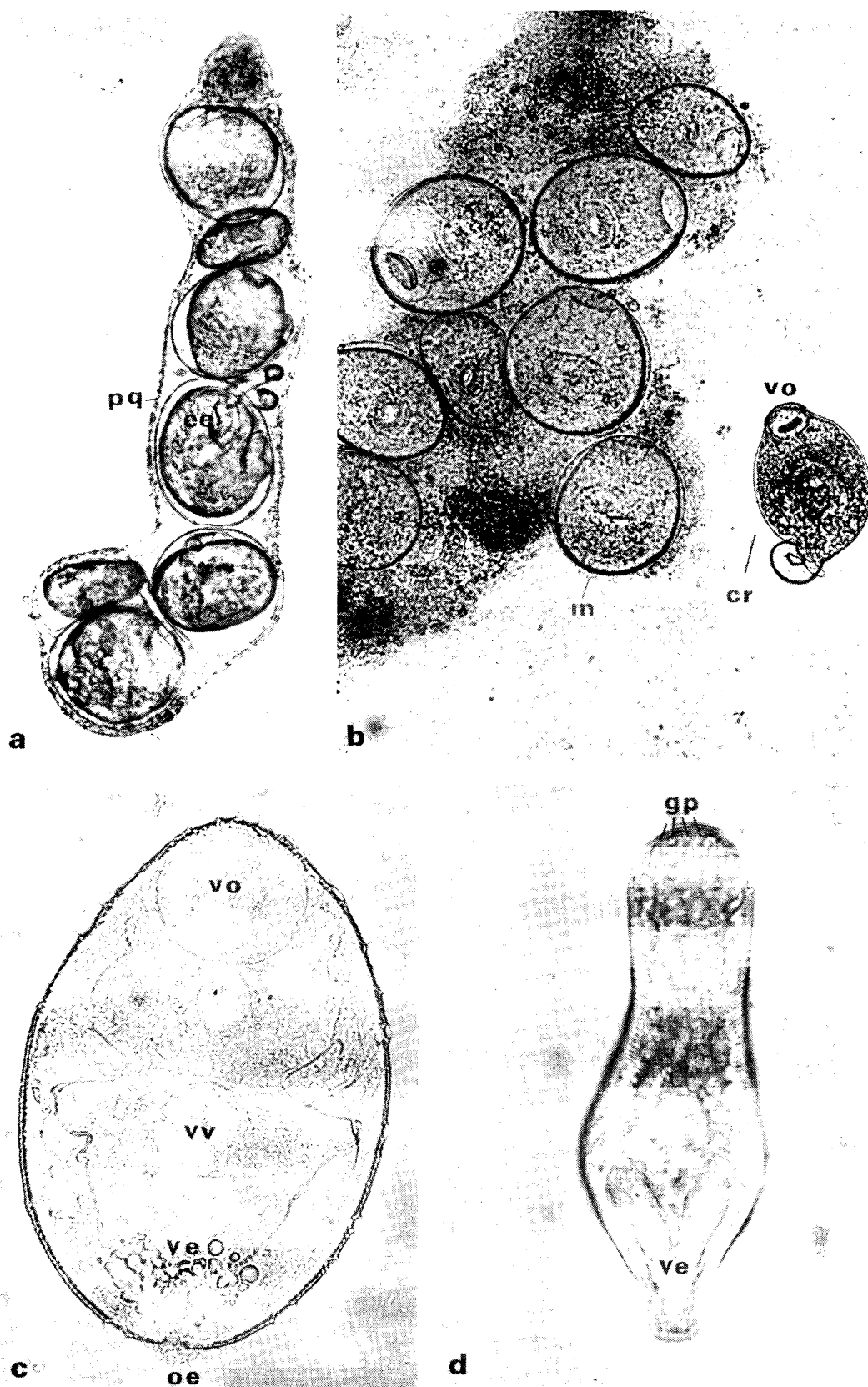


Fig. 5. 9 - Microfotografias das fases larvares de *C. cerastodermæ* I. a - esporoquisto, x 225; b - cercária e metacercárias; c, d - metacercárias ampliadas, x 780 e 480. gp -glândulas de penetração, oe -orifício excretor, pq - parede do quisto, ve-vesícula excretora, vo -ventosa oral, vv -acetábulo.

CAPÍTULO 6

**CARACTERIZAÇÃO ULTRASTRUTURAL DA
MORFOLOGIA DOS DIGENEA PARASITAS DE
*C. EDULE***

**6.1 - ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE DEVELOPMENTAL STAGES
OF *MEIOGYMNOPHALLUS MINUTUS* (DIGENEA: GYMNOPHALLIDAE)
IN *CERASTODERMA EDULE* IN PORTUGAL**

Fernanda Russell-Pinto

Aquatic Zoology, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences.

University of Oporto, 4000 Porto.

Aknowledgments: This work was supported in part by grant 87 203/Mar from Junta Nacional de
Investigação Científica e Tecnológica (JNICT).

ABSTRACT

Sporocysts containing cercariae of *Meiogymnophallus minutus* occurred in *Scrobicularia plana* collected in Ria de Aveiro estuary (Portugal).

The ultrastructure of the tegument in sporocyst and cercaria are described, observed under scanning and transmission electron microscopy. On the cercaria surface the tegumental processes shape were papillate. The surface of the body was covered densely with pointed tegumental spines. By TEM, in the matrix of the tegument, besides the spines and several mitochondria, was mainly seen translucent and electron dense spherical secretory vesicles that were not seen on the sporocyst tegument.

On the lip of the ventral sucker, large and strong spines were arranged in concentrical rows, and two groups of 6 sensory papillae were arranged concentrically and equidistantly. The oral sucker was surrounded by a crown of dense and long microvilli and by a ring of unciliated sensory papillae. The structural differences observed between the oral and ventral sucker suggest that the former are involved in feeding functions and the latter acting as a holdfast organ.

The surface morphology of *M. minutus* cercaria compared with other **Gymnophallidae** cercaria was discussed.

INTRODUCTION

The life cycle of the digenea *Meiogymnophallus minutus* (Cobbold, 1859) **Gymnophallidae**, develops in the peppery furrow-shell, *Scrobicularia plana* (Da Costa, 1778) as primary host, in *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758), the edible cockle, as intermediate host and in the oystercatcher *Haematopus ostralegus occidentalis* Neumann, 1905 as final host (Bowers and James, 1967; Loos-Frank, 1971; James *et al*, 1977).

As far as I am aware few reports exist in the literature on the surface ultrastructure of *Gymnophallidae* cercariae. Studies in *Lacunovermis macomae* and *Gymnophallus gibberosus* in *Macoma balthica* were done by Pekkarinen (1986, 1987a, 1987b). The origin and development of the tegument in daughter sporocyst and cercarial embryos of *M. minutus* were discussed at ultrastructural level by Al-Salman and James (1988).

In Portugal it was recently reported the presence of *M. minutus* cercaria in *S. plana* from Ria de Aveiro; the physical characterization and the prevalence of the cercaria and metacercariae of *M. minutus* in *C. edule* were studied (Russell-Pinto, 1990; Russell-Pinto and Bartoli, 1992). Related with these results it is of interest to observe the ultrastructure of the body surface of the larval stages of these species, as the ultrastructural study of the tegument may contribute to a better understanding of the phylogeny of the Platyhelminthes (Watson and Rohde, 1992) and host parasite relationships.

The present paper is a further ultrastructural characterization of the tegument morphology of the sporocyst and infecting cercariae of *M. minutus* by scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).

MATERIALS AND METHODS

Cerastoderma edule, Bivalvia, was collected at Ria de Aveiro (Canal de S. Jacinto) (Russell-Pinto, 1990).

The sporocysts were obtained from the digestive gland and gonada of *S. plana*. Cercariae were isolated under a binocular microscope (Nikon SMZ-2T) from the sporocysts and washed several times in filtered brackish water. Other cercariae were obtained by natural emission from infected *S. plana* kept alive for many days in small glass containers in local brackish water at room temperature (Russell-Pinto, 1990).

The isolated parasites were then placed in a small glass bowl, maintained in and washed several times with filtered brackish water.

Transmission electron microscopy

For the transmission electron microscopy (TEM) small pieces of infected organs or isolated worms were fixed for 2 to 4 hours at 4^o C in 3% glutaraldehyde buffered with 0.1M sodium cacodylate to ph 7.4, washed for 2 hours at 4^o C in the buffer, post-fixed for 1 to 2 hours in 1% osmium tetroxide in the same buffer at room temperature, and dehydrated through a graded ethanol series (50% to 100%), transferred to propylene oxide and finally embedded in Epon. Semithin sections were cut for light microscopy and then stained with methylene blue-Azur II. Ultrathin sections were double stained with aqueous uranyl acetate followed by lead citrate. The micrographs were obtained with a Jeol Jem 100CXII transmission electron microscope operating at 60 KV.

Scanning electron microscopy (SEM)

Isolated worms were processed for scanning electron microscopy (SEM) as described previously (Russell-Pinto, 1990).

RESULTS

Ultrastructural study

SEM observations:

Sporocysts

The furcocercariae of *M. minutus* (Fig. 1) develop in whitish, cylindrical, long sporocysts observed on the digestive gland, gills and gonad tissues of *S. plana* (Fig. 2).

In addition to a large number of fully developed cercariae, the sporocysts contained germinal balls and cercarial embryos at different developmental stages. The sporocysts showed a lace-trimmed surface ultrastructure resulting from the agglomeration of the cuticle microvilli (Fig. 3).

Cercariae

The mouth opening was terminal (Fig. 1). The oral sucker of the cercaria was less developed and showed thinner lips than the ventral one. It was surrounded by a ring of unciliated papillae with a protruding long cillium and some strong spines are seen dorsally. The main structure that envelops the mouth was a crown of dense and long microvilli (more than 2 μm) (Figs. 4, 5) that also appeared on the ventral sucker lip although in small number, and sparsely on the body and tail surfaces. There was a heavy contrast between the oral and ventral suckers.

The acetabulum was larger and much more powerful and it could be seen on the inner (Fig. 6) or outer body surface, having in both cases a plait of the body wall surrounding it near the ring of microvilli (Fig. 7). It possesses four concentric rows of large and strong spines, in contrast with the body ones, pointing to the sucker center (Figs. 6, 7 and 8). These spines were double in size when compared to the body ones. There were two groups of six unciliated papillae on the ventral sucker, one external (Fig. 6) and the other internal to the sucker spine rows (Fig. 8). The ultrastructure of the lip and the cavity of the acetabulum was different from that of the body. It showed an enfolded structure and the lip spines protruded by the rounded orifices (Figs. 7, 8).

The surface morphology of the cercariae (body and tail) (Figs. 9, 10) was pearled, formed by short tegumental papillae, from where overtop pointed and smooth spines with approximately 1.2 μm . They were inserted in regular rows more evident when the animal was enlarged: in this situation the tegument surface lost partially its pearled aspect and the insertion of the spines in the tegument cavities could be better

observed. The tegumental spines were more protruding at the anterior region and lain in the middle and posterior region of the body and furcae. The tail stem and furcae were also covered with sparse spines (Fig. 6). The tail was maintained mainly perpendicular to the body. The cercaria swims by rotation of the body and tail, which can stay forwards and upwards. Long microvilli sparsered on the body (Fig. 4) and on the tail were seen.

Scattered on the body there were papillae shaped sensory organs, smaller than those on the ventral sucker, with a central cilium which was more or less protruded (Figs. 9, 10). On the dorsal surface at the begining of the last third of the body two papillae beared a long cilia, 5 μ m (Fig. 10). Other papillae were situated symetrically into two longitudinal rows beside the dorsal side.

TEM observations

Sporocyst

The wall of the sporocyst shows an outer tegument from which surface microvilli extend (Fig. 11). It contains vacuoles, a few mitochondria, membranous bodies and vesicles of pinocytosis. Below this tegument lies the basal lamina and the subtegument. The latter has subtegumentary cells with few mitochondria, golgi complex, rough endoplasmic reticulum, glycogen granules and free ribosomes in the cytoplasm. Junctional structures between subtegumentary cells was observed. These cells remain connected to the outer tegument by cytoplasmic bridges. The broad chamber seems separated from the subtegument by a layer of thin cells. The germinal balls that latter develop into cercariae, in the lumen of the sporocyst are surrounded by a thin tegument, and filled by somatic and germinal cells with a large nucleus. In the cytoplasm, different cytoplasmic organelles could be seen. Flame cells could be observed in early and mature stages of cercaria development in the subtegumental cell layer (Fig. 12)

Cercaria

The tegument of fully developed cercaria (Fig. 13) shows an increased development when compared to the tegument of the germinal balls. Three layers are present: the anucleated surface tegument with typical lobulated shape, under which the basal lamina lays, followed by an extensive layer of longitudinal and circular muscles which contribute to the invagination of the basal lamina (Figs. 13, 14) and finally the tegumentary cell layer. The tegument surface (Fig. 13) contains pointed spines, among the folds, which are covered by apical and basal syncytium plasmalema, as well as sensory unciliated receptors sheathed by tegument processes.

The tegumental matrix is filled with a great number of a type of translucent and electron dense spherical membrane bound vesicles with granular content as well as a few mitochondria. These vesicles migrate from the tegumentary cells through cytoplasmic channels across the muscular layer and basal lamina, to the surface syncytium.

The tegumental unciliated papillae seem to have different morphologies. The commonly sensory receptors described in **Gymnophallidae** (Figs. 14, 15) have a central cilium more or less protruded, sheathed by the tegument. Its basal body is continued by a conical ciliary root. It is inserted in a nerve bulb, containing numerous vesicles, and is anchored to the lateral tegument by a circular septate desmosome (Fig. 14). Along the adjacent plasma membrane of the bulb, there is a dense fibrous ring. In the sensory organ observed in fig. 16 the cillium is not surrounded by a tegument sheath, the septate desmosome seems to be absent and three dense rings can be observed. In the unciliated sensory structure seen in fig. 17, there was no implating bulb a anelar desmosome could be seen at the cillium basal bodie level

LEGENDS*

- Fig. 1-** Scanning electron photomicrograph of the cercaria of *Meiogymnopallus minutus* , x 800. Ac-acetabulum, F-furcae, Os-oral sucker.
- Fig. 2-** Scanning ultrastructure of the sporocyst of *Meiogymnopallus minutus* , x 300.
- Fig. 3-** Scanning ultrastructure of the sporocyst surface, x 1,300.
- Fig. 4, 5-** Scanning electron photomicrograph of the oral sucker of *Meiogymnopallus minutus* , x 5,000- x 5,500. Bs-body spines , Ci-sensory receptor cilia, Mi-microvilli.
- Figs. 6, 7, 8-** Scanning electron photomicrographs of the acetabulum of *Meiogymnopallus minutus* x 4,000- x 9,000- x13,000. Ac - acetabulum, As - Acetabulum spines, Bs-body spines, Mi-microvilli, Sr-sensory receptor.
- Figs. 9, 10-** Scanning ultrastructure of the tegument of *Meiogymnopallus minutus* cercaria. 9-ventral view, x 11,000; 10-dorsal view, x 5,000. Bs-body spines, Ci-sensory receptor cilia, Sr-sensory receptor.
- Fig. 11-** Transmission electron photomicrograph of the sporocyst and germinal ball of *Meiogymnopallus minutus* , x 7,800. Bl basal lamina, Gb-germinal ball, Ic-investing cyncytium, Mi-microvilli, St-subtegument, T-tegument.
- Fig. 12-** Transmission electron photomicrograph of cercaria embryo tegument, x 15,100. Fc-flame cell, Is-investing syncytium, Mu-muscle.
- Fig. 13-** Transmission electron photomicrograph of the tegument of *Meiogymnopallus minutus* cercaria, x 15,650. Mu-muscle, S-spines, Tc-tegumental cell, Ty-tegumental syncytium, Ve-secretory vesicles.
- Fig. 14 - 17-** Ultrastructure of unciliated sensory receptors of *Meiogymnopallus minutus* cercaria , x 26, 000- x 20,800- x 12,950-x 25,660. **Fig. 15-**sucker sensory receptor. Bb-basal body, Ci-cilium, Cd-circular desmosome, Dc-dense collars, Nb-nerve bulbs, Nv-neurovesicles.

* - Nesta dissertação a "planche" 6. 1 corresponde às Figs. 1-8 do artigo submetido; a "planche" 6. 2, às Figs. 9-12; a "planche" 6.3, às Figs. 13-17.

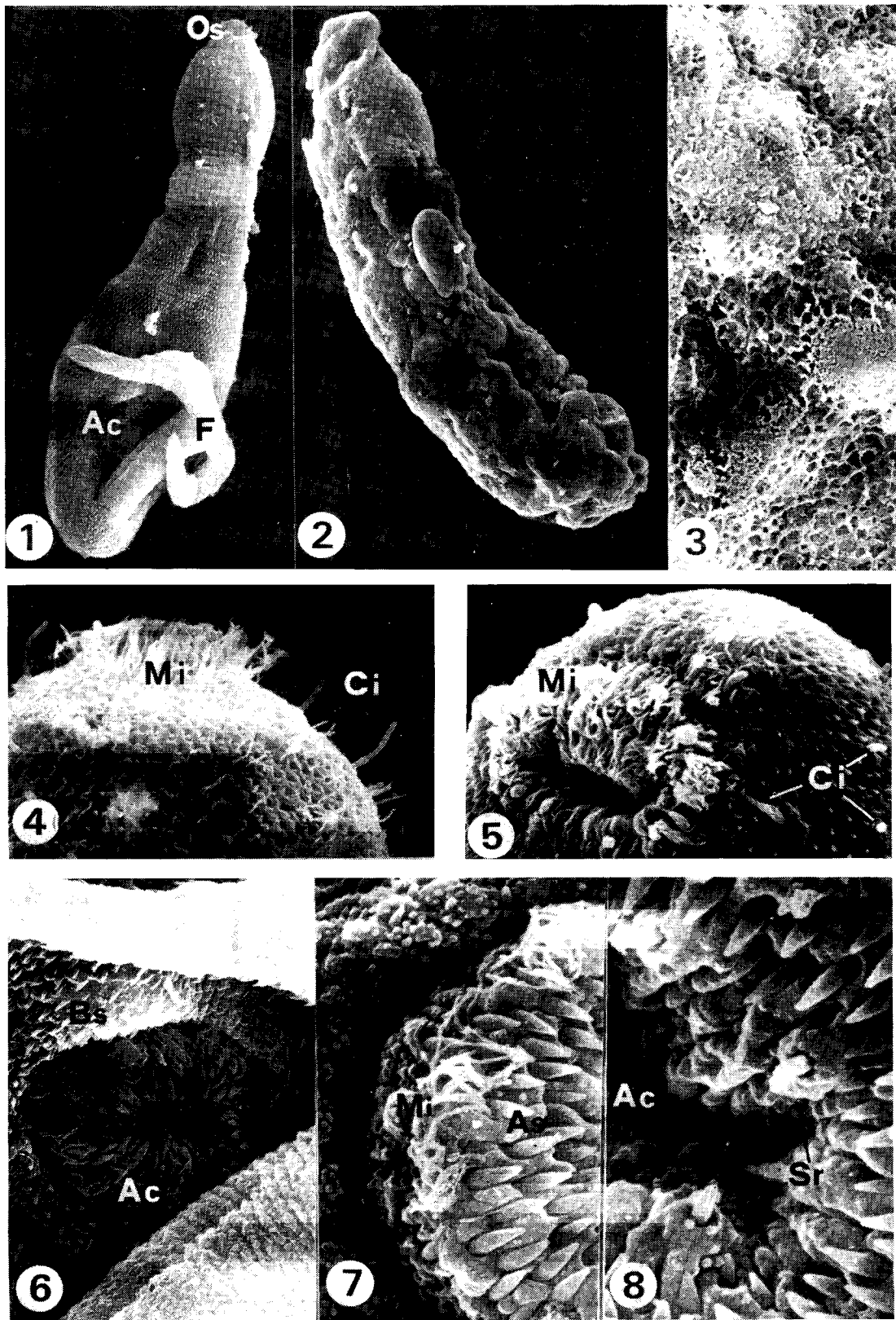


Fig. 6.1

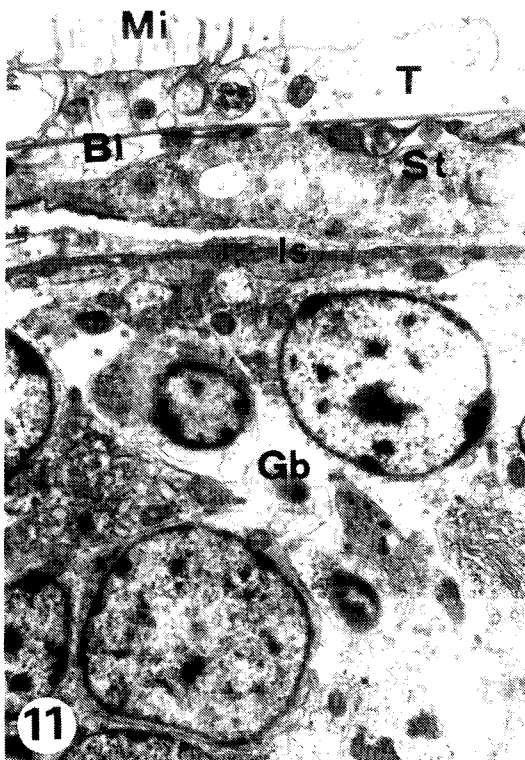
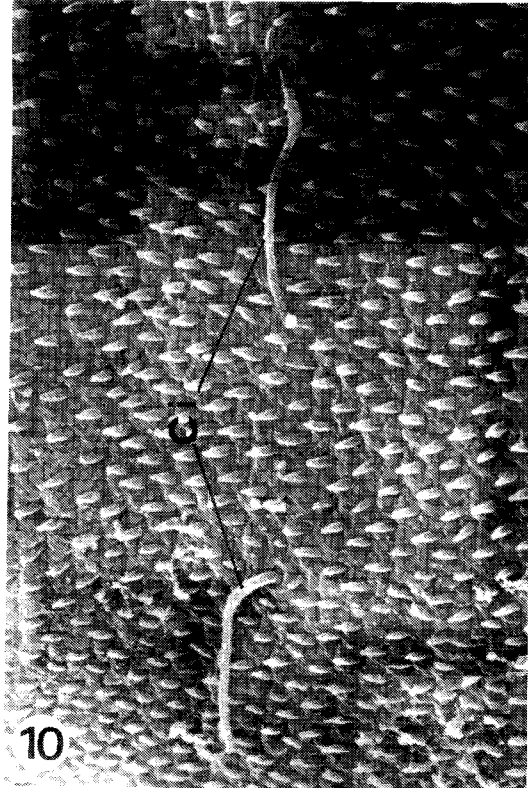
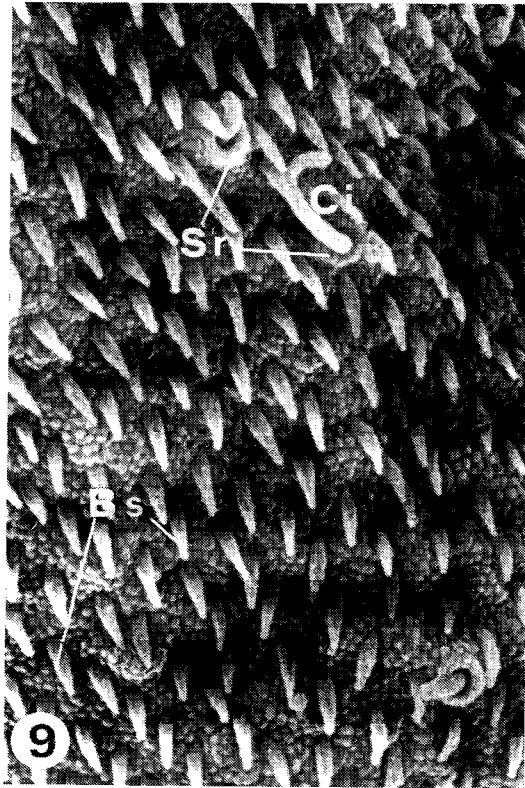


Fig. 6. 2

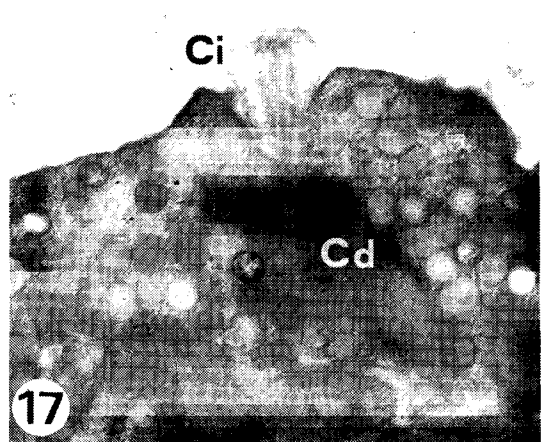
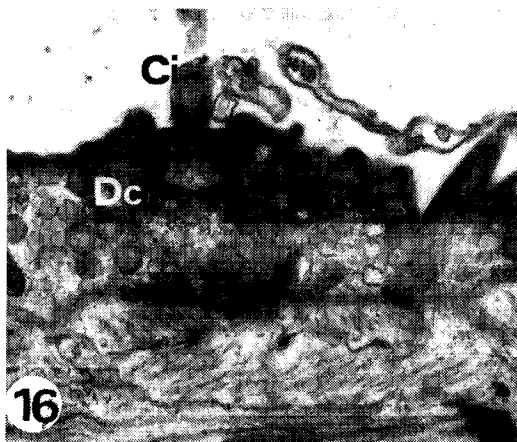
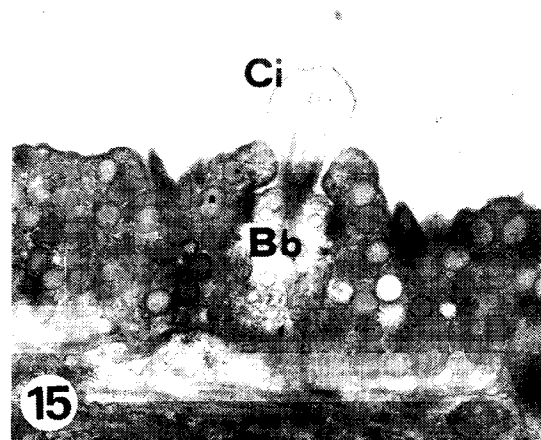
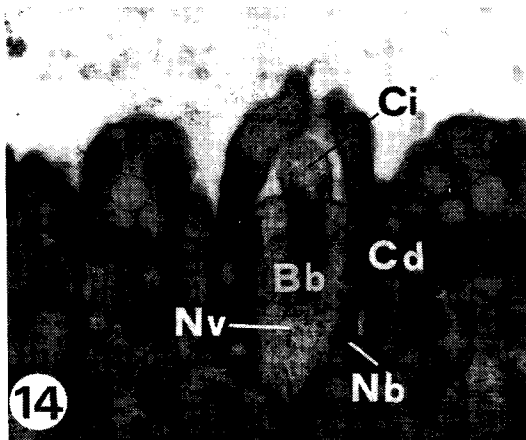
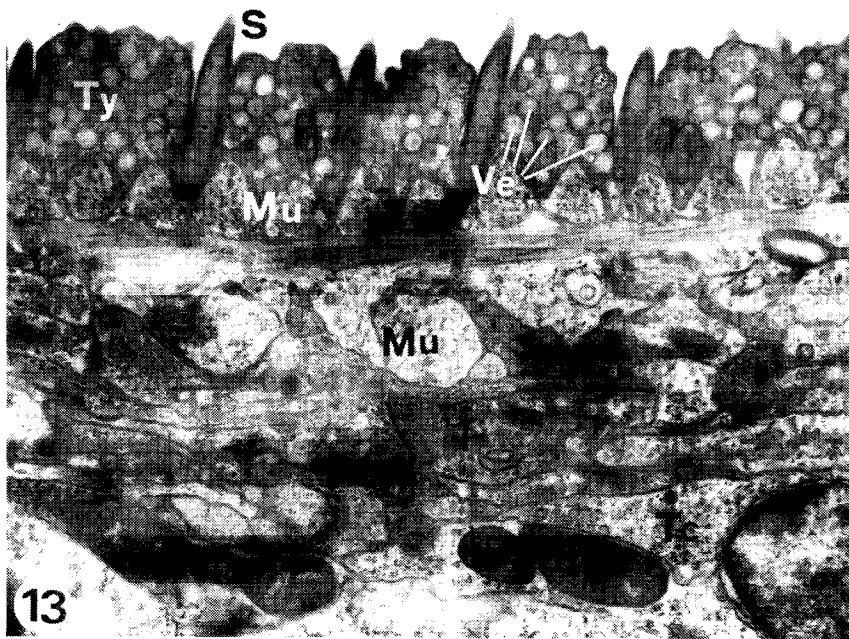


Fig. 6.3

DISCUSSION

The sporocyst of *Meiogymnophallus minutus* observed by scanning has an indifferiated surface ultrastructure. The syncytial tegument of sporocysts observed by TEM, possessing numerous microvilli must be specialized for absorption of nutrients from the host through its wall. The adjacent host tissue, digestive gland and gonada appear lysed by the histolytic enzymes released by pinocytic vesicles from the sporocyst tegument. The host organ space is substituted by the net of sporocysts inducing in the case of the gonade tissue, the parasitic castration of *S. plana*. The normal function of the digestive gland is also affected.

The furcocercaria of *M. minutus* observed by SEM shows a clear pearled surface morphology different from that described in other **Gymnophallidae** as *Lacunovermis macomae* (Pekkarinen, 1987a) but very similar to that of *Gymnophallus gibberosus* (Pekkarinen, 1987b). As in *L. macomae*, and *G. gibberosus* the cercaria of *M. minutus* has pointed spines and sensory organs with a long cillium as well as identical crowns of long microvilli around the suckers, mostly around the oral ones. Nevertheless the ventral sucker of *M. minutus* cercaria with several rows of strong spines, was more vigorous than the oral sucker, which is similar to that of *L. macomae* with its dense surrounding microvillies. The presence of microvilli is common on the cercariae suckers of different species related to different families but are sparse on the surface of the body and tail, (Loos Frank 1971; Koie, 1985; Campbell, 1985; Pekkarinen, 1987a, 1987b). In agreement with Koie (1985) they help the migration of the worm in the molluscan hosts and are involved in increasing the surface in nutrient absorption.

The distribution and the size of the spines in the ventral sucker is very different between *M. minutus* and the two **Gymnophallidae** species studied by Pekkarinen (1987a, 1987b). Although the three species have the same microhabitat in the host, the

differences observed, could be related with the necessity for strong anchorage: 1) during migration in the primary host along their extended siphons; 2) during the free swimming stage in the bottom of the estuary; 3) in the penetration and migration in the intermediate host helped by the pointed tegumental spines. The several rows of robust and pointed spines in the acetabulum of *M. minutus*, may contribute to the firm attachment to the extrapalleal epithelium of the mantle during the migration to the subarticular extrapalleal space under the hinge, the place where the cercariae will develop the following stage of metacercaria.

The long microvilli surrounding the suckers can be implicated in nutrient absorption and digestion during migration in the first and second intermediate hosts.

The spherical structures of the tegument shape of *M. minutus* cercaria are identical to those of *G. gibberosus* (Pekkarinen, 1987b). This morphology observed by SEM and TEM that increase the surface area, associated with the quantity of vesicles observed in the outer tegument layer, may facilitate the functions of the tegument absorption, transport of nutrients, osmoregulation and protection (Halton and McCrae, 1985) in this developmental stage.

The pointed spines of the tegument are characteristic in many trematode cercariae (Koie, 1992) that have a free living stage as occurs in *M. minutus*. The cercaria uses the spines to disrupt the wall of the sporocysts, for the anchorage to the host tissue, and dilaceration of the host cells to obtain the nutrients during the penetration and migration period.

The recognition of the second host is improved mainly by the numerous sensory papillae around the oral sucker of the cercaria. The oral spines then to help pierce the host wall beginning the penetration.

The ultrastructure of the body surface of the cercaria of *M. minutus* has a similar morphology only to that of *G. gibberosus* (Pekkarinen, 1987b). Although there seems to be significant differences in the ultrastructure of the oral and ventral sucker

between these two species. It seems that the surface morphology of **Gymnophallidae**, seen under SEM, is not the same in all species.

The different morphological aspects of the sensory papilla of the *M. minutus* cercaria observed under TEM, need further studies to elucidate whether these are due to the serial sections performed or to the existence of more than one type of sensory papilla.

REFERENCES

- AL-SALMAN, H. A. and JAMES, B. L. 1988 Ultrastructure of the tegument in daughter sporocyst and cercarial embryos of *Meiogymnophallus minutus* (Digenea: **Gymnophallidae**). *Int. J. Parasitol.* **18** (2) : 231-242.
- BOWERS, E. A. and JAMES, B. L. 1967. Studies on the morphology, ecology and life-cycle of *Meiogymnophallus minutus* (Cobbold, 1859) comb. nov. Trematoda: **Gymnophallidae**. *Parasitology.* **57** : 281-300.
- CAMPBELL, D. 1985 The life cycle of *Gymnophallus rebecqui* (Digenea: **Gymnophallidae** and the response of the bivalve *Abra tenuis* to its metacercaria. *J. Mar. Ass. U. K.* **65** : 589-601.
- HALTON, D. W. and McCRAE, J. M. 1985. Development of the tegument and alimentary tract in a digenetic trematode, *Fellodistomum fellis*. *Parasitology* **90** : 193-204.
- JAMES, B. L., SANNIA, A. and BOWERS, E. A. 1977 Parasites of birds and shellfish. In: Nelson - Smith A. & Bridges E. M. (Eds.). Problems of a Small Estuary Swansea Quadrant Press Ltd. 16 pp.
- KOIE, M. 1985. The surface topography and life-cycles of digenetic trematodes in *Limanda limanda* (L.) and *Gadus morhua* (L.). D. Sc. Thesis, University of Copenhagen, Denmark, 20 pp.

- KOIE, M. 1992 Scanning electron microscopy of cercaria, metacercariae and adults of *Pygidiosis ardeae* Koie, 1990 (Digenea, Heterophyidae). *Parasitol. Res.* **78** : 469-474.
- LOOS-FRANK, B. 1971 Zur kenntnis der gymnophalliden trematoden des Nordseeraumes. *Z. Parasitenk.* **36** : 206-232.
- PEKKARINEN, M. 1986. Development of the cercaria of *Lacunovermis macomae* (Trematoda: **Gymnophallidae**) to the metacercaria in brackish-water *Macoma balthica* (Bivalvia). *Ann. Zool. Fennici.* **23** : 237-250.
- PEKKARINEN, M. 1987a. The cercaria of *Lacunovermis macomae* (Lebour, 1908) (Trematoda: **Gymnophallidae**), and its penetration into the bivalve *Macoma balthica* (L.) in experimental conditions. *Ann. Zool. Fennici.* **24** : 101-121.
- PEKKARINEN, M. 1987b. The cercaria and metacercaria of *Gymnophallus gibberosus* Loos-Frank, 1971 (Trematoda: **Gymnophallidae**) in *Macoma balthica* (L.) (Bivalvia) in the Baltic brackish water (southwestern Finland). *Ann. Zool. Fennici.* **24** : 123-136.
- RUSSELL-PINTO, F. 1990. Differences in infestation intensity and incidence of hinge and mantle margin *Meiogymnophallus minutus* metacercariae (**Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* (Bivalvia): possible species coexistence in Ria de Aveiro. *The Journal of Parasitology.* **76** : 653-659.
- RUSSELL-PINTO, F. and BARTOLI, P. 1992. Sympatric distribution of *Meiogymnophallus minutus* and *M. fossarum* (Digenea: **Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* in the Ria de Aveiro estuary in Portugal. *Parasitol. Res.* **78** : 617-618.
- WATSON, N. A. and ROHDE, K. 1992 Ultrastructure of the flame bulbs and protonephridial capillaries of *Rugogaster hydrolagi* (Platyhelminthes, Trematoda, Aspidogastrea). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **67** (3) : 67-74.

**6. 2 - ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE
TEGUMENT OF *MEIOGYMNOBALLUS MINUTUS*
METACERCARIA (DIGENEA:GYMNOBALLIDAE)
IN *CERASTODERMA EDULE* (BIVALVIA) IN
PORTUGAL**

**ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE TEGUMENT OF
MEIOGYMNOPHALLUS MINUTUS METACERCARIA
(DIGENEA:GYMNOPHALLIDAE) IN *CERASTODERMA*
EDULE (BIVALVIA) IN PORTUGAL**

Fernanda Russell-Pinto

Aquatic Zoology, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences

University of Oporto, 4000 Porto.

Aknowledgments: This work was supported in part by grant 87 203/Mar from Junta Nacional de
Investigação Científica e Tecnológica (JNICT).

ABSTRACT: *Cerastoderma edule* is the host, in Portugal, of both the unencysted metacercaria of *Meiogymnophallus minutus* and the free metacercaria of its sibling species *M. fossarum*. Observations of the tegument of these two **Gymnophallidae** were made. Scanning and transmission electron microscopy revealed an alveolar shape of the tegument characterized by surface invaginations of the tegument. Inside these tegumental processes inserted multipointed scale like spines. Uniciliated sensory papillae with or without a long protruding cillium (Type I and Type II) were abundant, surrounding the suckers and distributed over the body surface. Transmission electron microscopy revealed the presence of a significant number of three types of secretory vesicles suggesting an intense metabolic activity of the tegument that covers the body and lines the digestive system. The presence of thin cysternae in the tegumental syncytium of the digestive organs was observed. Based in these results it seems that the change on the morphology of the body surface can't be related to the encystement or unencystement of the metacercaria in the intermediate host, at least in some species.

These results also confirm that no significant differences exist in the surface ultrastructure morphology of *M. minutus* and *M. fossarum* metacercariae.

INTRODUCTION

The large majority of the Digenea species in their development from the cercaria to the metacercaria stage encyst in the intermediate host (Fried and Aseeb, 1991). In the case of the metacercariae of *M. minutus* and *M. fossarum* they remain unencysted in the host .

There are reports based on the study of the cercaria to free metacercaria development in Digenea indicating that no changes occur in the surface of the tegument. Previous studies of Koie (1985, 1992) have led to the general conclusion

that in species where the metacercariae are encysted there are changes in the structure of the surface of the parasite, in the cercaria to metacercaria transition; changes are not observed in species that remain unencysted.

Recently we reported the coexistence of two distinct species of **Gymnophallidae** in the same host, the bivalve *C. edule* in Portugal (Russell-Pinto, 1990). Both *Meiogymnophallus minutus* and *M. fossarum* remain unencysted at the metacercaria stage albeit occupying distinct sites within the host (Russell-Pinto and Bartoli, 1992).

The ultrastructure of the tegument of these two digenea has not been studied but could be important to analysis of species differentiation. The present paper is mainly an ultrastructural characterization of the morphology of *M. minutus* metacercariae surface by scanning and transmission electron microscopy. A comparative analysis with *M. fossarum* is also reported.

MATERIALS AND METHODS

Cerastoderma edule, bivalvia, were collected at Ria de Aveiro (Canal de S. Jacinto) (Russell-Pinto, 1990). In the laboratory the unencysted metacercariae of *M. minutus*, enveloped by the host mantle tissue in the extrapallial subarticular space below the hinge, were dissected after an incision into the shell ligament of *C. edule*. The valves were kept open by finger pressure and the enveloping mantle with the parasites was removed using a binocular microscope (Nikon SMZ-2T). Then the isolated metacercariae were placed in a small glass bowl, held in filtered brackish water obtained from the sampling site. Free *M. fossarum* metacercariae were searched for along the mantle margins, that had been cut around the shell periphery placed between two glass slides, gently pressed and then observed under a binocular microscope. After the

worms were found, the coverslip was removed and the parasites were isolated by means of dissection needles and kept as described above. All worms were maintained and washed three times in filtered brackish water.

For transmission electron microscopy (TEM), small pieces of infected organs or isolated worms were fixed for 2 to 4 hours at 4° C in 3% glutaraldehyde buffered with 0.1M sodium cacodylate to pH 7.4 washed for 2 hours at 4° C in the same buffer, postfixed for 1 to 2 hours in 1% osmium tetroxide in the same buffer at room temperature, dehydrated through a graded ethanol series, transferred to propylene oxide and finally embedded in Epon. Semithin sections were cut for light microscopy and stained with methylene blue-Azur II. Ultrathin sections were double stained with aqueous uranyl acetate, followed by lead citrate. The photomicrographs were obtained with a Jeol Jem 100CXII transmission electron microscope operating at 60 KV.

For scanning electron microscopy (SEM), isolated worms were treated as previously described by Russell-Pinto (1990).

RESULTS

Morphological characterization of the metacercaria.

Because there are no reports of the morphology surface of the metacercaria of *M. minutus* and *M. fossarum* we included in this study a detailed ultrastructural description of the tegument.

SEM observations: In figure 1 a) and b) the morphological similarity between the metacercariae of *M. minutus* and *M. fossarum* is evident. The metacercariae of *M. minutus* are cylindrical, slightly dorso-ventrally flattened, conical at the cefalic region and tapered at the posterior end of the body (Fig.1a, c), similarly to *M. fossarum*

(Fig. 1b). Slight differences in the tegumental morphology were seen when the animal was distended or contracted.

Tegumental processes give to the ventral and dorsal face of the body of both species an alveolar shape with prominent ridges (Figs. 2, 3), from the center of which protrude the tegumental spines uniformly distributed. The alveoli become longer when the enlargement of the body takes place. In distended animals the depth of the alveoli decreases and sometimes the ridges completely disappear (Fig 4); under these circumstances the insertion of the spines in regular rows in the tegumental cavities can be easily observed (fig. 5). Normally at the anterior region of the body the spines are scale-like, digitated into 4-5 points, arched back, inserted in short alveoli, densely distributed and similar to those that cover the posterior tapered portion of the body where the excretory pore is situated. On the remainder of the metacercaria body the spines are scale-like, broadly round, bear 4-8 points and less dense.

Scattered along the body surface as well as concentrated near the suckers unciliated sensory organs, with a papillary shape, are observed (Fig. 6). Sensory papillae are formed by a bulbous structure with a central opening, from which a cilium may or may not protrude. The tegument situated in the anterior part in relation to the oral sucker, is devoid of spines and instead has grouped unciliated sensory papillae surrounding a ruffled zone (Figs. 7,8).

The oral sucker is situated on the ventro-anterior region of the animal (Fig. 1). The tegument of the lip (Figs. 7, 9) is wrinkled and devoid of spines. Between its folds lie sensory papillae, approximately 1,5 μ m in diameter. They are arranged in two concentric rings, and many others are distributed along the body. A papillous morphology could be seen in the wall of the oral cavity (Fig.9).

The ventral sucker (Fig. 9) is in a median position and located at two-thirds of the body length from the anterior end of the animal. The acetabulum has an irregularly folded tegument covering a thick and salient lip. On the lip six unciliated sensory

papillae are placed equidistantly. Six others were observed in a concentrical arrangement inside the acetabulum. A small triangular zone above the ventral sucker was aspined and folded, sometimes covering the sucker partially, in contrast to the posterior region where there are concentric rows of strong and prominent multipointed spines showing a well defined semi-circular disposition (Fig 9).

M. fossarum metacercaria (Fig. 1b): The tegument morphology of *M. fossarum* metacercaria (Fig. 3) with its alveolar shape and scale-like tegumental spines is similar to the one exhibited by *M. minutus* metacercaria (Fig. 2). Differences in tegument shape as disappearance of the alveoli can be observed between contracted and distended regions of the body. The same similarity with *M. minutus* was seen in the localization (Fig. 1a,b) and ultrastructure of the suckers and in sensory organs distribution (Figs.7,8).

TEM observations: The ultrastructure of the metacercariae surface (Figs. 11,13) of *M. minutus* consists of an outer tegument layer, followed by a muscular layer composed of longitudinal and transversal muscle fibres. The two layers are separated by the basal lamina. The tegumental cells are situated under these layers. The body surface is deeply folded and serrated spines extend from its interior (fig. 11). The outer and inner surface of the tegumental syncytium and the extremities of the spines are covered by the apical and basal plasmalema. In some few places the basal plasma membrane folds and enters into the matrix reaching different depths but never seen in connection with the outer plasmalema. Just beneath the outer membrane lies a band of electron dense material about 160 Å wide that also outlines the apex and the base of the spines (fig. 11). The tegument syncytium is about 3µm thick and is connected to the tegumental cell layer by cytoplasmic extensions that cross the muscle layer and the basal lamina. The appearance of electron-translucent spaces beneath the tegument

depends on the degree of the body wall musculature contraction giving the appearance of variable thickness to the syncytial tegument.

The syncytial matrix exhibits an important electron density and contains several types of cytoplasmic organelles (Figs. 11, 13) as mitochondria ($\approx 0.530\mu\text{m}$ larger diameter), cuticular spines, ciliary sensory structures and electron dense discoid as well as spherical vesicles. The long multipointed spines with $3\mu\text{m}$ longer show a regular striate structure with alternating white and dark elements, 55 \AA and 51 \AA thick respectively.

The tegument matrix is filled by three different types of secretory membrane bound vesicles (Fig. 13). The first type is formed by larger spherical vesicles, from 1660 \AA to 3060 \AA in diameter, that show a more or less granular electron dense content. The second type consisted of groups of little spherical osmophilic vesicles (830 \AA to 1390 \AA ϕ) showing a distinct granular pattern from the former one's. This type constitutes the majority of the vesicles observed in the tegument that line the lumen of the digestive system (Fig. 14) A third type observed are biconcave discs vesicles. The contents are very electron dense, they are about 2400 \AA in length and 294 \AA in width. These elongated vesicles are often concentrated on the extremity of the tegumental folds perpendicularly to the apical plasma membrane and open to the external space where their content is released. They contribute to the formation of the glycocalyx which is frequently observed. The tegument is connected to tegumentary cells, located below the basal lamina, and to muscular stratum by cytoplasmic extensions, like channels. It is common to observe numerous secretory vesicles passing through one layer to another. Similar vesicles were seen in the cytoplasm of the tegumental cells.

The tegumental syncytium, lining the suckers (fig. 12), the pharynx (fig. 14), the digestive cecum and the excretory opening is more folded and more electron dense. In the pharynx the syncytium tegument (Fig. 14) is penetrated by many membranous folds, tubules-like (740 \AA ϕ), that are originated in the basal membrane, and filled with

a dense material. Often they are connected with a thin cysternae (ϕ 296 Å) that frequently finishes in bulbous ends. Similar cysternae appear scattered or in little groups; they could be the way to distribute the nutrients through the fluke body. The membranous tubular structures also make their way through the muscular layer and are attached to them by hemidesmosomes (Fig. 14).

The sensory receptors (Figs. 15, 16) that were observed are unciliated organs and show two distinct morphologies. Their ultrastructure shows that the cilium is embedded in a membrane bound nerve bulb. The outer membrane of the tegument invaginates around it to form an opening at the body surface connecting at its end with the basal tegumental membrane. The nerve bulb matrix contains numerous small neurovesicles, relatively uniform in size, that are seen escaping through the tegument opening. The base of the nerve bulb is connected to the tegumental cell stratum, below the basal lamina, by a cytoplasmic extension where some microtubules and neurovesicles were seen (Fig. 15). It is attached anteriorly to the tegument by a circular septate desmosome. Four electron dense collars can be seen in the internal desmosome zone. The sensory cilium is covered by the bulb membrane but stands out at a short distance below the tegument surface, through the aperture in the syncytial layer. It is anchored by the rootlet and in its basal body two lateral electron dense plates are observed in the direction of the peripheral ciliary microtubules. In figure 16 another type (type II) of sensory unciliated receptor observed in *M. minutus* metacercaria seems to be represented. The sensory cilium pass through the opening and is exposed to the exterior. Beyond the peripheral ciliary microtubules a central one can be observed. A septate desmosome is placed at the base of the ciliary structure.

LEGENDS*

Fig. 1- Metacercariae of *Meiogymnophallus minutus* (a and c) and *M. fossarum* (b) seen under scanning electron microscopy. a and b- ventral view, x 600; c- dorsal view, x 900 - Ac- acetabulum; Ep-excretory opening; Os-oral sucker; Sp- sensory papillae.

- Figs. 2, 3** - Scanning electron photomicrographs of the tegumental surfaces of *Meiogymnophallus minutus* (2) and *M. fossarum* (3) x. metacercaria (2-x 6,500; 3-x 10,000); Av-Alveolar structures; S- multipointed spines.
- Figs. 4, 5** - Scanning electron photomicrographs of the tegument morphology of extended metacercaria (4) and the neck regions of *Meiogymnophallus minutus* (4-x 9,500; 5-x 2,850). S- multipointed spines, Sr- sensory receptors, Tc-tegument cavities.
- Fig. 6** - Scanning electron photomicrograph of unciliated sensory papillae, X 12,000; Ci-cilia ; Sp- sensory papillae.
- Figs. 7, 8** - Morphology of the oral suckers of *Meiogymnophallus minutus* (7) and *M. fossarum* (8) seen under scanning electron microscopy; x 4,800; Os-oral sucker, S-spines, Sp- sensory papillae.
- Fig. 9**- Inward ultrastructure of the oral sucker of *Meiogymnophallus minutus* metacercaria, x 4,300 . Pa-papillae, Sp-unciliated sensory papillae.
- Fig. 10**- Ventral sucker morphology of *Meiogymnophallus minutus* metacercaria under SEM, x 4,300; Ac-Acetabulum, As- aspinous zone, Sp-unciliated sensory papillae.
- Fig. 11**- Transmission electron photomicrograph of *Meiogymnophallus minutus* tegument, x 20,000: Mu-muscle, S-multipointed spines, V1-secretory Type I, V2-Type II, V3- biconcave disc vesicles.
- Fig. 12**- The ultrastructure of the oral sucker of *Meiogymnophallus minutus* metacercaria, x 10,800; Mr-radial muscle fibres, Sv-secretory vesicles in tegument cell, Tc- tegumental cells, Ts- tegumental syncytium.
- Fig. 13**- Transmission electron photomicrograph of the tegumental syncytium magnification of *Meiogymnophallus minutus* , x 27,800. S- spine, V1-secretory Type I vesicles, V2-Type II, V3- biconcave disc vesicles.
- Fig. 14**- Ultrastructure of the tegument of the pharynx x 18,000. Ce-cisternae, Hd -hemidesmosome, Js-junctional structures, Mu-muscle, Mr-radial muscle fibres, V2-Type II, V3- biconcave disc vesicles, Tu- tubules.
- Figs. 15, 16**- Transmission electron photomicrograph of sensory receptors Type I and Type II of *Meiogymnophallus minutus* metacercaria, x 25,780 and x 22,500. Bd-basal body, Ci- cilium, Cd-circular desmosome, Dc-dense collars, Ro-rootlet, Nb-nerve bulb, Nv-neurovesicles.

* - Nesta dissertação à "planche" 6.4 correspondem as figs.1-3; à "planche" 6.5, as figs.4-8; à "planche" 6.6, as figs.9-11; à "planche" 6.7, as figs.12-14; à "planche" 6.8, as figs.15-16.

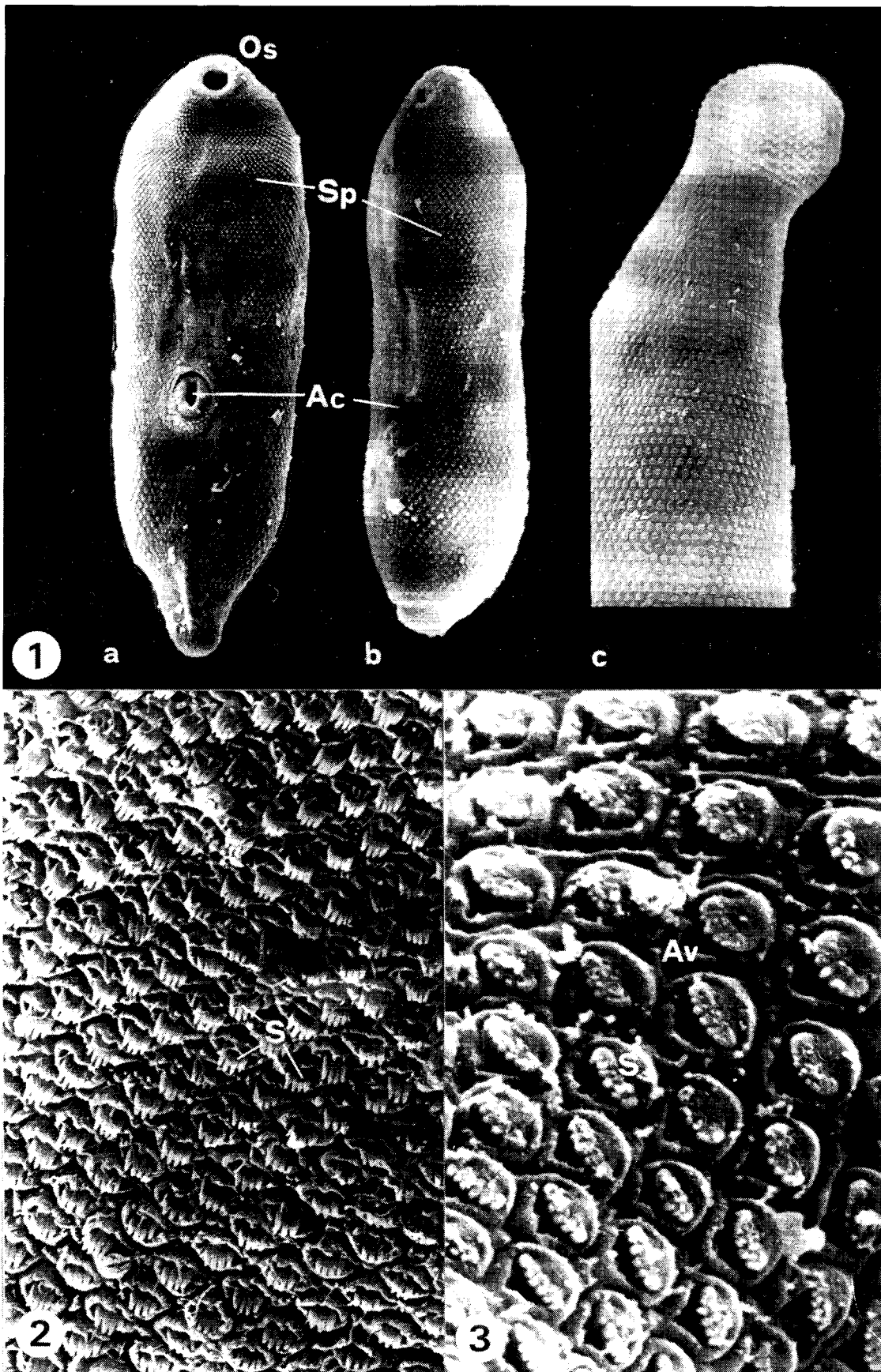


Fig. 6.4

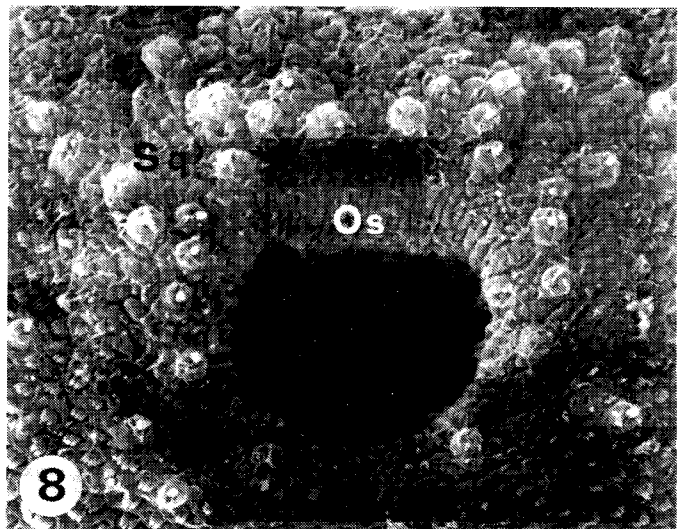
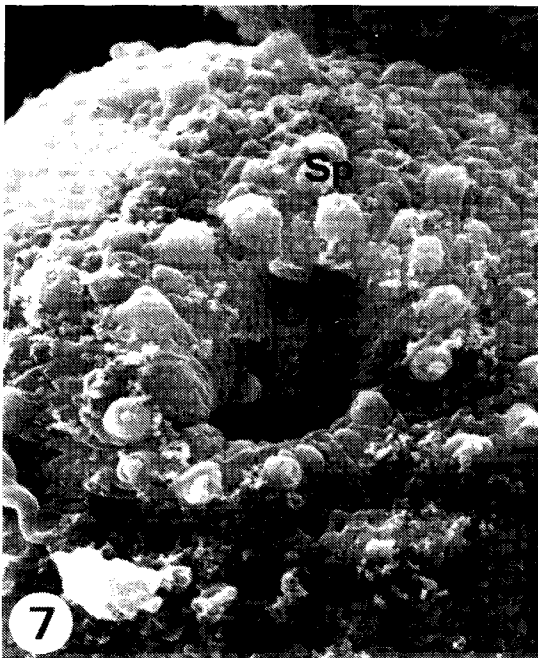
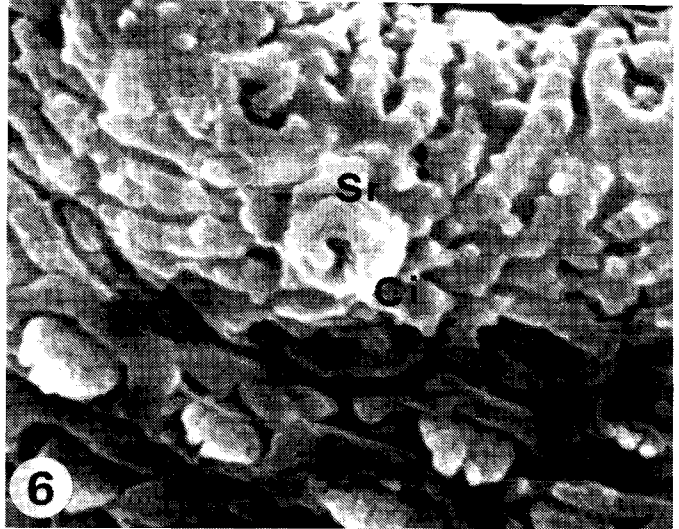
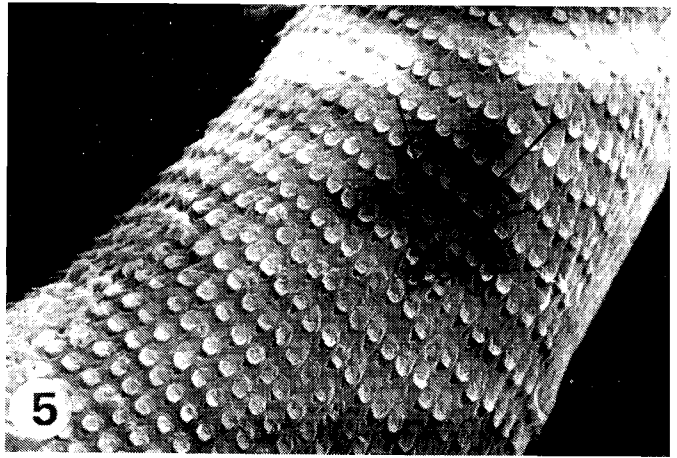
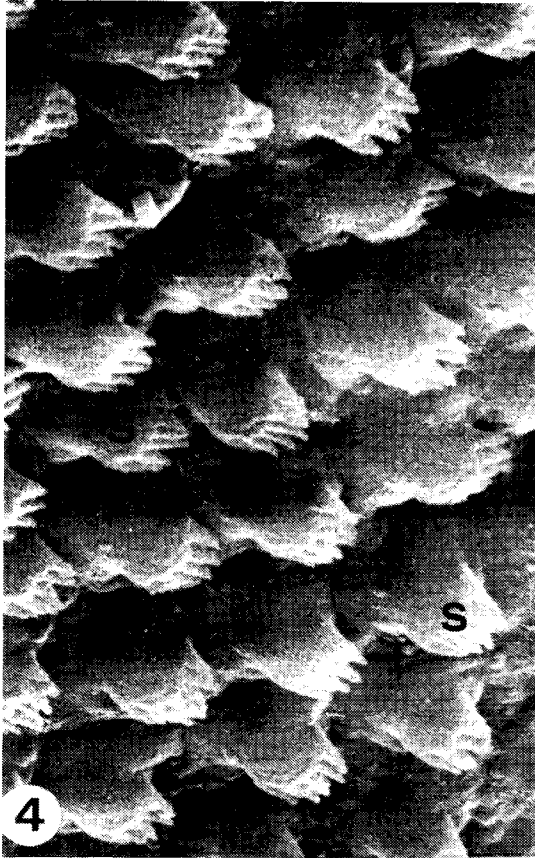


Fig. 6.5

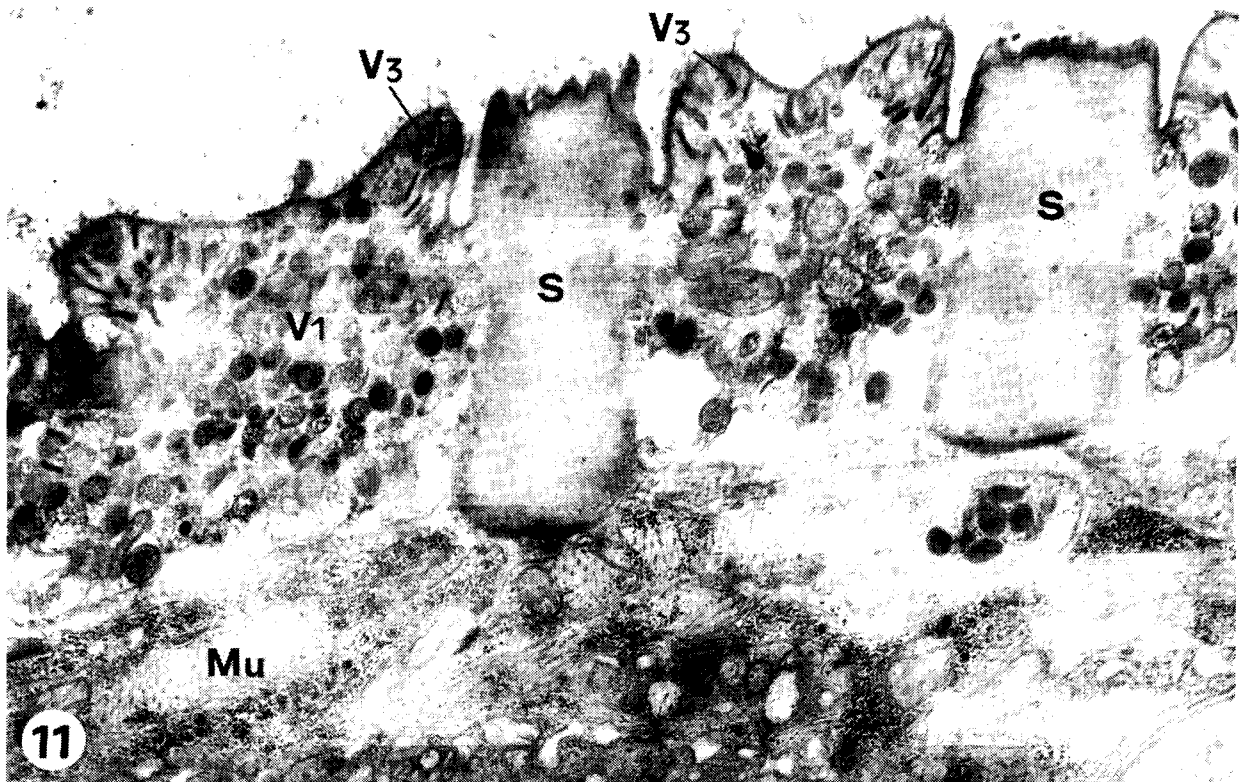
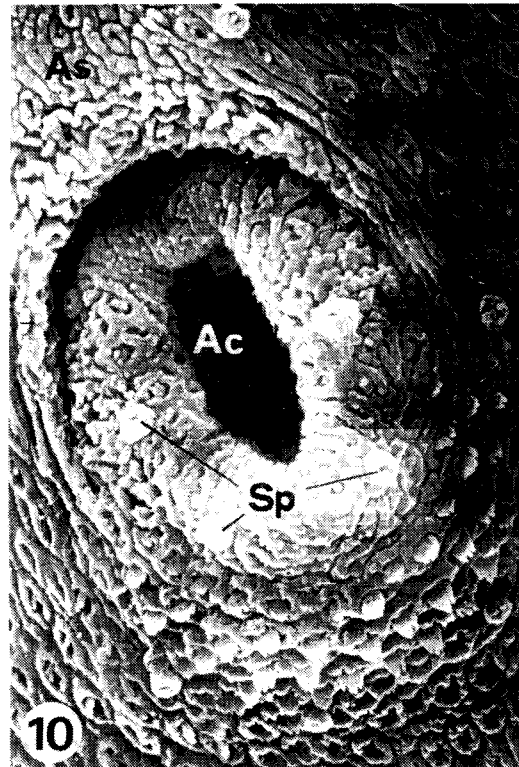
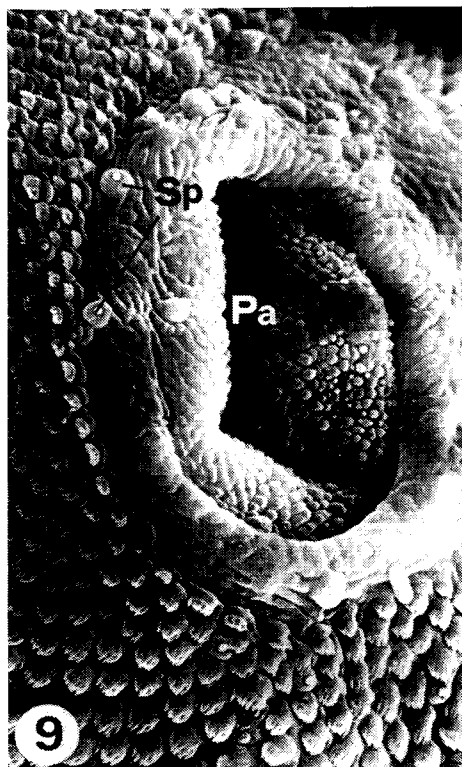


Fig. 6.6

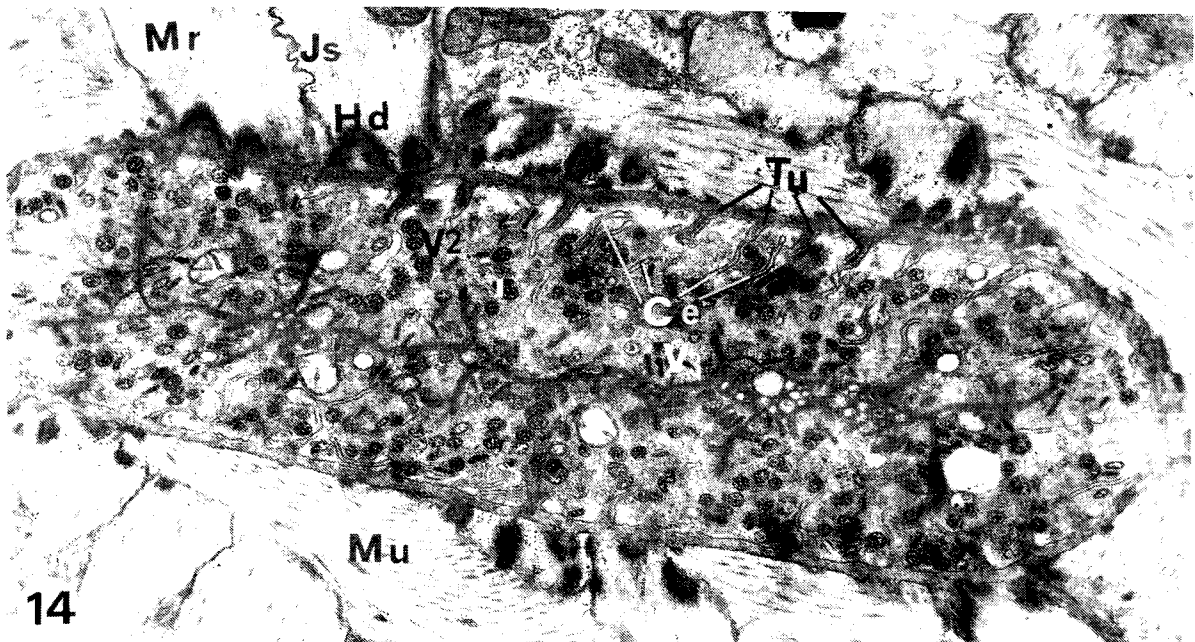
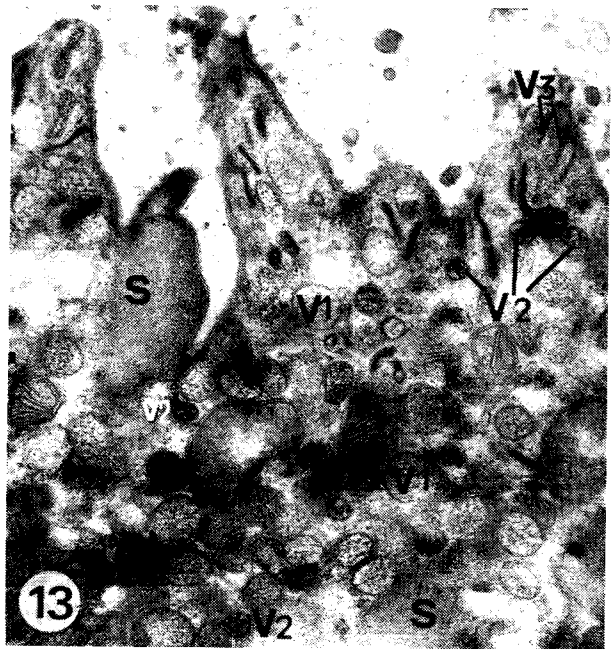
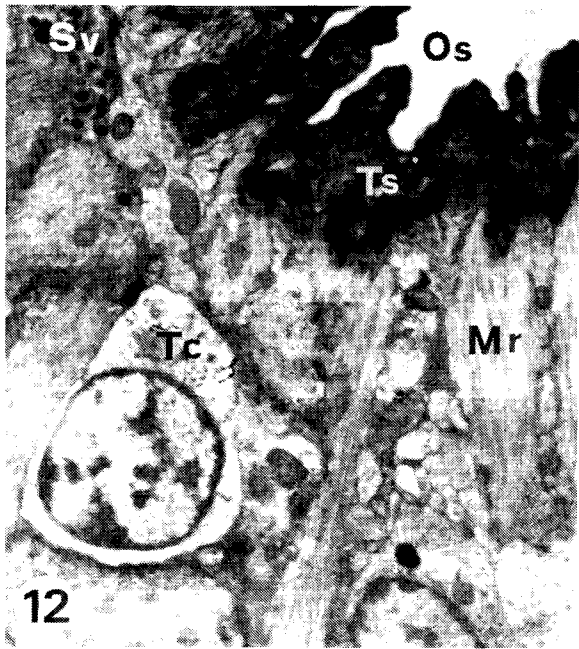


Fig. 6.7

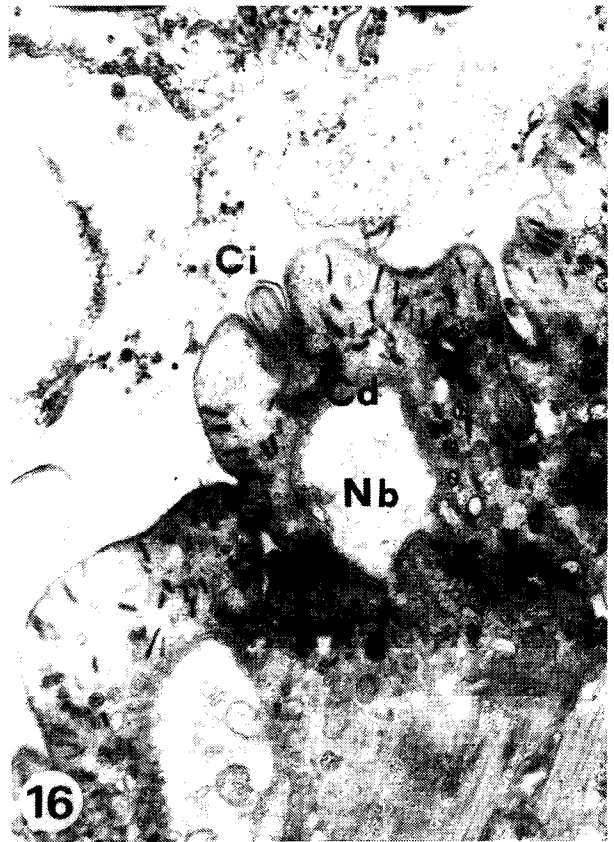
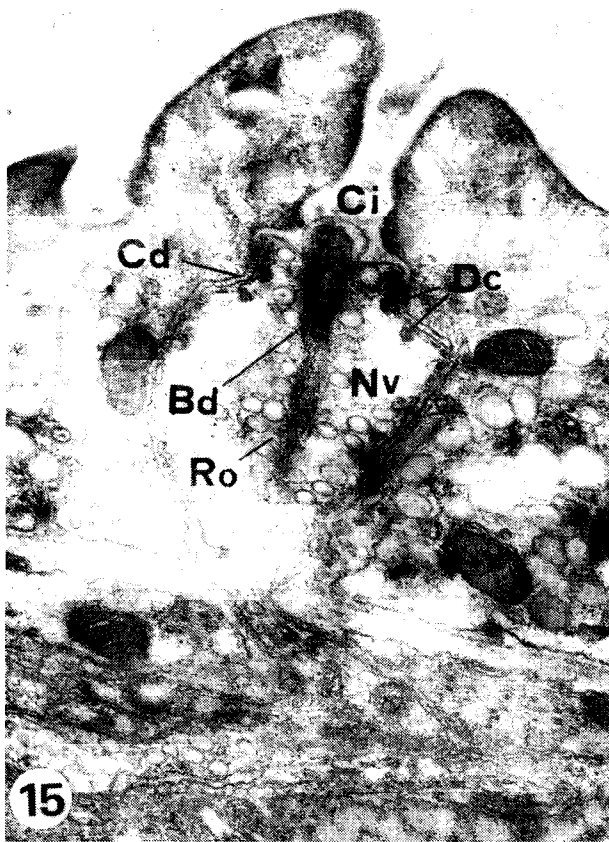


Fig. 6.8

DISCUSSION

M. minutus metacercaria was described by Bowers and James (1967) infecting the bivalve *C. edule*; *M. fossarum* metacercaria was described by Bartoli (1973) in *C. glaucum*. These two allopatric sibling species (Atlantic and Mediterranean) have been sympatric on Portuguese coast after Russell-Pinto (1990) and Russell-Pinto and Bartoli (1992) observations, infecting the same intermediate host *C. edule*. Each one keeps its own microhabitat in the host. The metacercariae of *M. minutus* do not encyst. They are found in the extrapallial wedge shaped cavity of the shell below the hinge, completely enveloped by the extrapallial surface of the mantle of *C. edule* that grows up to enclose them. This unusual growth of the host tissue may act as a defense mechanism of *C. edule* against the infection by *M. minutus* metacercariae. *M. fossarum* metacercariae remain free along the peripheral extrapallial space or between the folds of the mantle margins of *C. edule* on the extrapallial side of the mantle epithelium. As for the SEM and TEM morphology of the tegument of these two species, they are identical as well as when observed by light microscopy. The convoluted apical anucleated surface of the tegument moreover contributes to surface area amplification for nutrient absorption, function usually related with trematode tegument (Dunn et al., 1987). Its constitution takes advantage of the fact that the tegument cell layer is far distant from the hostile influence products against the parasite (Halton and McCrae, 1985) facilitating its adaptation to the environmental changes.

It is current opinion that the metacercaria change the surface morphology when it encysts (Koie, 1985; 1990; 1992). This opinion may be based on the existence of more data about encysted metacercaria because of their numeric majority.

During the permanence of *M. minutus* metacercariae in the intermediate host different stages of development can be observed. First, the differentiation of tegumental processes, that contribute to the changing of the surface's pearled appearance of the

cercaria (personal observation-Russell-Pinto 1993, submitted) into the alveolar shape characteristic of the metacercaria tegument. This differentiation seems to increase the body surface area. Second, the growth from 132 μm to 295 μm (cercaria and metacercaria body length respectively) (Russell-Pinto,1990). Third, the excretory vesicle of recently infecting metacercaria, which is not completely developed suffers a significant increase in size during the maturation of the metacercaria, containing blackish excretory granules, that when seen under light microscopy fill the entire body. So that in full developed metacercaria only the oral and ventral suckers can be visualized. This third point suggest that the digestive system may not function while the worms are enclosed in the host mantle and that it is useful only to collect the excretory products; this is confirmed by Koie's observations (1990 b) in *Pygidiopsis ardae*, encysted metacercaria. However, Bowers and James (1967) suggest that the excretory vesicle of *M.minutus* remains empty until the parasite reach the gut of the final host after it is liberated from the tissue of the intermediate host. In the laboratory, when *M.minutus* metacercaria are isolated from the mantle tissue, excretory granules escaping through excretory pore can be seen under LM and SEM microscopy. The same should happen when the encapsulated parasites escape from the host tissue. When *M. minutus* founds the intestine of the final host, it develops in adult showing a thin Y shaped excretory vesicle (Bowers and James, 1967).

The tegumental projections formed during non migratory stages of life cycle (metacercaria), increase the tegumental area reflecting the need of absorption of nutrients necessary to the growth and maturation required to the infection of the final host.

So the second point focused above confirms that in this specie the phase of metacercaria is a development stage. It is known that metacercaria stage of most species encyst in a second intermediate host and some cercariae undergo transformation in the intermediate host , but do not encyst (the so called free or unencysted

metacercaria) (Fried and Haseeb, 1991). It seems that the change of the tegument shape, is not related with the fact of the metacercaria being encysted or unencysted. In this study we are in presence of one completely free metacercaria *M. fossarum* and another unencysted but enclosed only by the host tissue; the characteristic morphological and fisiological transformations, usually related with the encysted metacercaria (Koie, 1992; Hong et al. 1991), are evident in the two species and seem related with parasitic and environmental survival conditions.

The scale like and multipointed spines usually occur in non migratory stages of the life cicle as in *M. minutus* and *M. fossarum* metacercaria that are eaten together with the cockle tissues by the final host. Serrated spines have been observed in other gymnophalids (Pekkarinen, 1986a; 1987b), but having a distinct tegument morphology from *M. minutus* and *M. fossarum*, and non gymnophalids, in encysted and free metacercaria. This structure of fluke spines is related to abrasion of host tissue for feeding and for anchorage (Hong et al., 1991; Koie, 1973; 1992).

Sensory unciliated papillae have been observed over the body surface in great number of digenea life cicle stages (Fugino et al. 1979). The unciliated sensory receptores observed thus far are concentrated principally around the oral opening and the acetabulum, and a smaller number is scattered more ventrally than dorsally along the body surface of *M. minutus* and *M. fossarum*. It seems on base of TEM results that *M. minutus* metacercaria has two different unciliated sensory organs. Type I exhibits the current ultrastructure of these organs discribed in gymnophallids (Pekkarinen, 1987c) an in others Digenea exception to the non protruding cilium through the tegument that seems different from Type II. Different functions such as tango, chemo and mechanic have been attributed to them by several authors (Morris and Threagold, 1967; Erasmus, 1970; Fugino et al, 1979; Ip and Dresser, 1984; Halton and McCrae, 1985; Pariselle and Matricon-Gondran, 1985; Dunn et al., 1987b; Pekkarinen, 1987c; Hong et al., 1991; Rohde and Watson, 1992). They are essential to the recognition of the

substratum, of the specific site within the host, of the degree of attachment of the host, of the proximity of alimentary particles and perception of environmental condition changes as well as the presence of noxious substances. All this information is essential to the survival of the worm and can contribute to the existence of different types of unciliated sensory receptors.

The ventral sucker appears more powerful than the oral sucker because of its distinct and prominent enfolded lip and the semilunar disposition of aggressive scale-like serrated spines around the posterior end of the acetabulum while in the oral sucker surpasses the great number of sensory papillae around and inside the mouth not forgetting the concentration on a little space of the cepalic region. These reported structures suggest that its principal function is feeding and to obtain information of environmental conditions; this is also related with the sensilla distributed on the body surface. The ventral sucker shows all conditions to be an attachment organ exerting a sucking force to attach the fluke to the host tissue.

The structures of the tegument that cover the body and line the suckers and the alimentary system of *M. minutus* and *M. minutus* metacercariae, observed by transmission electron microscopy, are similar to that of other digenetic trematoda studied by several authors, such as *Schistosoma mansoni* (Morris and Threadgold, 1968); *Neophasis langeniiformis* (Koeie, 1973); *Fellodistomum fellis* (Halton and McCrae, 1985); but show a great difference in relation to Hemiuridae (Matthews and Matthews, 1988). However little differences were observed. Note the granular contents in the spherical vesicles as in paramphistomes (Dunn et al., 1987c) and non a lamellated structure as in *S. mansoni* (Morris and Threadgold, 1968 ; Wilson and Barnes, 1974).

Type II vesicles, to our knowledge have not been related before; they are different structured in size and granules distribution. They could be considered tranverse section of biconcave ones (Type III), but their dimensions are different and their not uniformly electron density may defeat this hypothesis. It seems to be other

type of tegumental secretory bodies . The presence of these secretory vesicles in the tegument that lines the digestive system, where also amounts of RER thin cisternae were observed in tegumentary cells and in cytoplasmic extensions that are in connection with the tegumental syncytium, and the presence of mitochondriae are compatible with the possibility that the tegument assume an important metabolic activity as in absorptive function and in an antigenic protection of the digenians against host defense mechanisms.

It seems that the use of both techniques, SEM and TEM, can contribute to a detailed knowledge of the surface morphology of digenean developing phases as *M. minutus* metacercaria and its sibling specie *M. fossarum*, and to a better understanding of the relationship among the digenea group.

REFERENCES

- BARTOLI, 1973. La pénétration et l'installation des cercaires de *Gymnophallus fossarum* P. Bartoli, 1965 (Digenea, **Gymnophallidae**) chez *Cardium glaucum* Bruguière. Bulletin du Musée d'Histoire Naturelle. **117**: 319-334.
- BOWERS, E. A. and B. L. JAMES. 1967. Studies on the morphology, ecology and life-cycle of *Meiogymnophallus minutus* (Cobbold, 1859) comb. nov. (Trematoda: **Gymnophallidae**). Parasitology. **57**: 281-30
- DUNN, T. S., R. E. B. HANNA, and W. A. NIZAMI. 1987a. Sensory receptors of the miracidium of *Gigantocotyle explanatum* (Trematoda: Paramphistomidae). International Journal for Parasitology. **17**: 1131-1140.
- _____, R. E. B. HANNA, and W. A. NIZAMI. 1987b. Ultrastructural and cytochemical observation on the tegument of three species of paramphistomes (Platyhelminthes: Digenea) from the Indian water Buffalo, *Bubalus bubalis*. International Journal for Parasitology. **17**:1153-1161.

- ERASMUS, A. D. 1970. The host-parasite interface of srigeoid trematodes. IX. A probe and transmission electron microscope study of the tegument of *Diplostomum phoxini* Faust, 1918. *Parasitology*. **61**: 35-41.
- FRIED, B. and M. A. HASEEB. 1991. Platyhelminthes: Aspidogastrea, Monogenea, and Digenea. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, F. W. Harrison and B. J. Bogitsh (eds.). Wiley-Liss, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, pp. 141-209.
- FUJINO, T., Y. ISHII, and D. W. CHOL. 1979. Surface ultrastructure of the tegument of *Clonorchis sinensis* newly excysted juveniles and adult worms. *The Journal of Parasitology*. **65**: 579-590.
- HALTON, D. W. and J. M. McCRAE. 1985. Development of the tegument and alimentary tract in a digenetic trematode, *Fellodistomum fellis*. *Parasitology*. **90**: 193-204.
- HONG, S. J., J. Y. CHAI, S. H. LEE. 1991. Surface ultrastructure of the developmental stages of *Heterophyopsis continua* (Trematoda: Heterophyidae). *The Journal of Parasitology*. **77**: 613-620.
- IP, H. S. and S. S. DESSER. 1984. Transmission electron microscopy of the tegumentary sense organs of *Cotylogaster occidentalis* (Trematoda: Aspidogastrea). *The Journal of Parasitology*. **70**: 563-575.
- KOIE, M. 1973. The host-parasite interface and associated structures of the cercaria and adult *Neophasis lageniformis* (Lebour, 1910). *Ophelia*. **12**: 205-219.
- _____, 1985. The surface topography and life-cycles of digenetic trematodes in *Limanda limanda* (L.) and *Gadus morhua* (L.). Ph. D. Thesis. University of Copenhagen 20 pp.
- _____, 1990. The life cycle of *Pygidiospsis ardeae* Koie, 1990 (Digenea, Heterophyidae). *The Journal of Parasitology*. **76**: 537-541.

- _____, 1992. Scanning electron microscopy of cercariae, metacercariae and adults of *Pygidiospsis ardeae* Koie, 1990 (Digenea, Heterophyidae). *Parasitology Research*. **78**: 469-474.
- MATTHEWS, B. F. and R. A. MATTHEWS. 1988. The tegument in hemiuridae (Digenea: Hemiuroidea) structure and function in the adult. *Journal of Helminthology*. **62**: 305-316.
- MORRIS, G. P. and L. T. THREADGOLD. 1967. A presumed sensory structure associated with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*. **53**: 537-539.
- _____, and L. T. THREADGOLD. 1968. Ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*. **54**: 15-27.
- PARISIELLE, A. and M. MATRICON-GONDRAN, 1985. A new type of ciliated sensory receptor in the cercariae of *Nicolla gallica* (Trematoda). *Zeitschrift fur Parasitenkunde*. **71**: 353-364.
- PEKKARINEN, M. 1986. Development of the cercaria of *Lacunovermis macomae* (Trematoda: **Gymnophallidae**) to the metacercaria in brackish-water *Macoma balthica* (Bivalvia). *Ann. Zool. Fennici*. **23**: 237-250.
- _____, 1987a. The cercaria and metacercaria of *Gymnophallus gibberosus* Loos-Frank, 1971 (Trematoda: **Gymnophallidae**) in *Macoma balthica* (L.) (Bivalvia) in the Baltic brackish water (southwestern Finland). *Ann. Zool. Fennici*. **24**: 123-136.
- _____, M. 1987b. The cercaria of *Lacunovermis macomae* (Lebour, 1908) (Trematoda: **Gymnophallidae**), and its penetration into the bivalve *Macoma balthica* (L.) in experimental conditions. *Ann. Zool. Fennici*. **24**: 101-121.
- RUSSELL-PINTO, F. 1990. Differences in infestation intensity and prevalence of hinge and mantle margin *Meiogymphallus minutus* metacercariae

- (**Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* (Bivalvia): possible species coexistence in Ria de Aveiro. *The Journal of Parasitology*. **76**: 653-659.
- _____, F. and P. BARTOLI. 1992. Sympatric distribution *Meiogymnophallus minutus* and *M.fossarum* (Digenea: **Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* in the Ria de Aveiro estuary in Portugal. *Parasitology Research*. **78**: 617-618.
- WATSON, N. A. and ROHDE, K. 1992. Ultrastructure of the flame bulbs and protonephridial capillaries of *Rugogaster hydrolagi* (Platyhelminthes, Trematoda, Aspidogastrea). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **67**: 67-74
- WILSON, R. A. and BARNES, P. E. 1974. The tegument of *Schistosoma mansoni* observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. *Parasitology*. **68**: 239-258.

CARACTERIZAÇÃO ULTRASTRUTURAL DOS DIGENEA PARASITAS DE *C. EDULE*

6.3 - ULTRASTRUTURA DAS FASES DO CICLO EVOLUTIVO DE *G. CHOLEDOCHUS*

Microscopia electrónica de varrimento

Esporoquistos

Os esporoquistos de *G. choledochus* são ovóides (Fig. 6.9a) e a superfície é enrugada apresentando caneluras com uma dispersão bastante regular. Contém grande número de cercárias em diferentes estados de desenvolvimento (Fig. 6.9 b).

Apesar de ainda não apresentar a diferenciação morfológica do tegumento, no embrião da cercária observa-se já a boca, a ventosa ventral em formação e a existência dos poros excretores nos extremos dos ramos da furca (Fig. 6.9 c).

Cercaria

O tegumento da cercária é espinhoso (Fig. 6.9 d).

A ventosa oral é subventral (Fig. 6.10a), quase circular, com $13,4\mu\text{m} \times 14,9\mu\text{m}$, estando o seu lábio rodeado internamente por uma densa franja de longas microvilosidades (Fig. 6.10b), por entre as quais sobressaiem quatro fiadas de espículas semelhantes às que revestem o corpo. Na face externa do lábio observam-se dois anéis de papilas sensoriais uniciliadas (Figs. 6.10 a, b).

O acetábulo, de forma oval (Figs. 6.10c,d), é um pouco mais pequeno do que a ventosa oral, $8,6\mu\text{m} \times 13,8\mu\text{m}$, com o lábio revestido, também por longas microvilosidades e espículas. Sobre o lábio da ventosa observam-se seis papilas sensoriais, esféricas, volumosas, destacando-se um orifício central por onde sai o cílio sensitivo, por vezes bastante longo (Figs. 6.10b,e). Na parede interna do acetábulo

observam-se órgãos sensoriais de menor tamanho dispostos em anel. Dispersas pelo corpo da cercária, em maior número na face ventral, observam-se numerosas papilas sensoriais idênticas às que envolvem a ventosa oral (Fig. 6.10d). As papilas sensoriais da cercária de *G. choledochus* são constituídas por um amontuado de esferas tegumentares (Fig. 6.10d, e) que envolvem o orifício por onde sai o cílio, com $0,3 \mu\text{m}$ de diâmetro. Os comprimentos dos cílios são variáveis podendo atingir mais de $3 \mu\text{m}$ (Fig. 6.10e).

A superfície do corpo da cercária tem o aspecto perolado, formado por papilas esféricas muito regulares (Fig. 6.10f). Está recoberto de espículas cuticulares pontiagudas alinhadas em linhas transversais concêntricas, com uma disposição bastante regular (Fig. 6.10a), levantadas na região pré-acetabular anterior e junto às ventosas. São de menor tamanho, $0,8 \mu\text{m}$, em maior número e mais próximas umas das outras na face ventral e anterior do corpo. Nas faces ventral posterior e dorsal as espículas são mais longas, $1,4 \mu\text{m}$, e mais dispersas. Só na face ventral do tronco ímpar da cauda e nas faces laterais da furca se observam espículas (Fig. 6.9 d).

Metacercária

As metacercárias observadas em M. E. (Fig. 6.11a) são provenientes dos esporoquistos dissecados do hospedeiro primário, *C. edule*, como referido no Cap. 5. A ventosa oral (Fig. 6.11 b), com o lábio pouco diferenciado, possui numerosas espículas pequenas se comparadas com as que revestem o corpo (Fig. 6.11 e). Na sua face externa observa-se um anel de papilas sensoriais ciliadas, volumosas, em forma de cúpula com $5 \mu\text{m}$ de diâmetro e na face interna seis papilas de $2,2 \mu\text{m}$. A superfície do lábio é rugosa, com numerosas espículas. À sua volta, e também dispersas pela face ventral préacetabular, localizam-se grande número de papilas sensoriais uniciliadas, com $2,2 \mu\text{m}$ e inúmeras com $1 \mu\text{m}$ de diâmetro. Estes órgãos sensoriais também se encontram dispersos por outras regiões do corpo.

No lábio do acetábulo (Fig. 6.11 c), com ultraestrutura semelhante à descrita para a ventosa oral, evidenciam-se seis papilas em forma de cúpula e na parede do corpo da metacercária que o envolve, grande número de papilas sensoriais uniciliadas de menor tamanho. As ventosas da metacercária de *G. choledochus* não se encontram envolvidas por microvilosidades como foi observado na fase de cercária.

O poro excretor situa-se na extremidade posterior do corpo da metacercária (Fig. 6.11 d).

Os órgãos secretores uniciliados encontram-se, por vezes, com os cílios retraídos na abertura central e outras vezes com os cílios completamente desenvaginados, o que modifica completamente a morfologia da base do órgão, tornando-se neste último caso esférica e podendo o cílio atingir 4 μm de comprimento (Fig. 6.11 f).

A morfologia do tegumento da metacercária de *G. choledochus* é diferente da observada na fase de cercária. Perdeu o aspecto perolado homogénio e à volta das espículas ponteagudas sobressaiem umas concavidades em forma de meia lua que as envolvem, dispostas em linhas paralelas (Fig. 6.11 e). Entre estas situam-se estruturas papilares. Esta morfologia corresponde a uma fase de desenvolvimento da metacercária. Quando a metacercária se encontra em fase de distensão observa-se a inserção das espículas, desaparecendo as invaginações do tegumento (Fig. 6.11f). Na cercária infestante, a morfologia mostra quase só as concavidades semicirculares, desaparecendo a maioria das papilas tegumentares (Fig. 6.11g).

Microscopia electrónica de transmissão

Cercária

A ultraestrutura da camada sincicial do tegumento da cercária de *G. choledochus* observada em MET mostra a morfologia papilar da superfície do corpo (Fig. 6.12a) como observada em MEV. É bastante pobre em organelos, predominando

mitocôndrias e algumas vesículas discóides bicôncavas, semelhantes às observadas no tegumento da metacercária de *M. minutus* (Fig. 6.6). À camada sincicial segue-se a camada muscular do tegumento e, por fim, a camada celular do tegumento.

As papilas sensoriais (Fig. 6.12b) possuem um só cílio, inserido num bolbo nervoso cuja membrana se une à membrana sincicial por um desmossoma circular septado. A base do bolbo nervoso prolonga-se por entre as outras camadas do tegumento.

As ventosas caracterizam-se pela sua forte musculatura, distribuída principalmente em feixes radiais (Fig. 6.12 c)

Metacercária

A ultraestrutura do tegumento da metacercária de *G. choledochus* está representada na Fig. 6.13 a.

Na matriz sincicial, além das espículas e mitocôndrias, observam-se vesículas esféricas (Tipo I) e discóides bicôncavas (Tipo III) muito semelhantes às descritas anteriormente em *M. minutus* (Fig. 6. 6).

Estas vesículas também são observadas no citoplasma das células tegumentares (Fig. 6. 13a). Aliás, como se pode observar na mesma figura, a camada sincicial liga-se à zona celular do tegumento por canais citoplasmáticos. Nesta zona do tegumento é frequente observar grande número de mitocôndrias e células excretoras ou flamíferas (Fig. 6. 13b). Também as vesículas, com a forma de discos bicôncavos, se situam junto à membrana externa da camada sincicial do tegumento e quase sempre perpendiculares a ela.

Fig. 6. 9 - Esporoquisto e cercária de *Gymnophallus choledochus* observados em MEV. **a, b**- esporoquisto, x 2.700, x 110; **c**-embrião da cercária, x 1.200; **d**-cercária infestante, x 1.000; E-esporoquisto, Fl-cercária e embriões de cercária, Fr-furca, Oe-orifício excretor, Vo-ventosa oral, Vv-acetábulo.

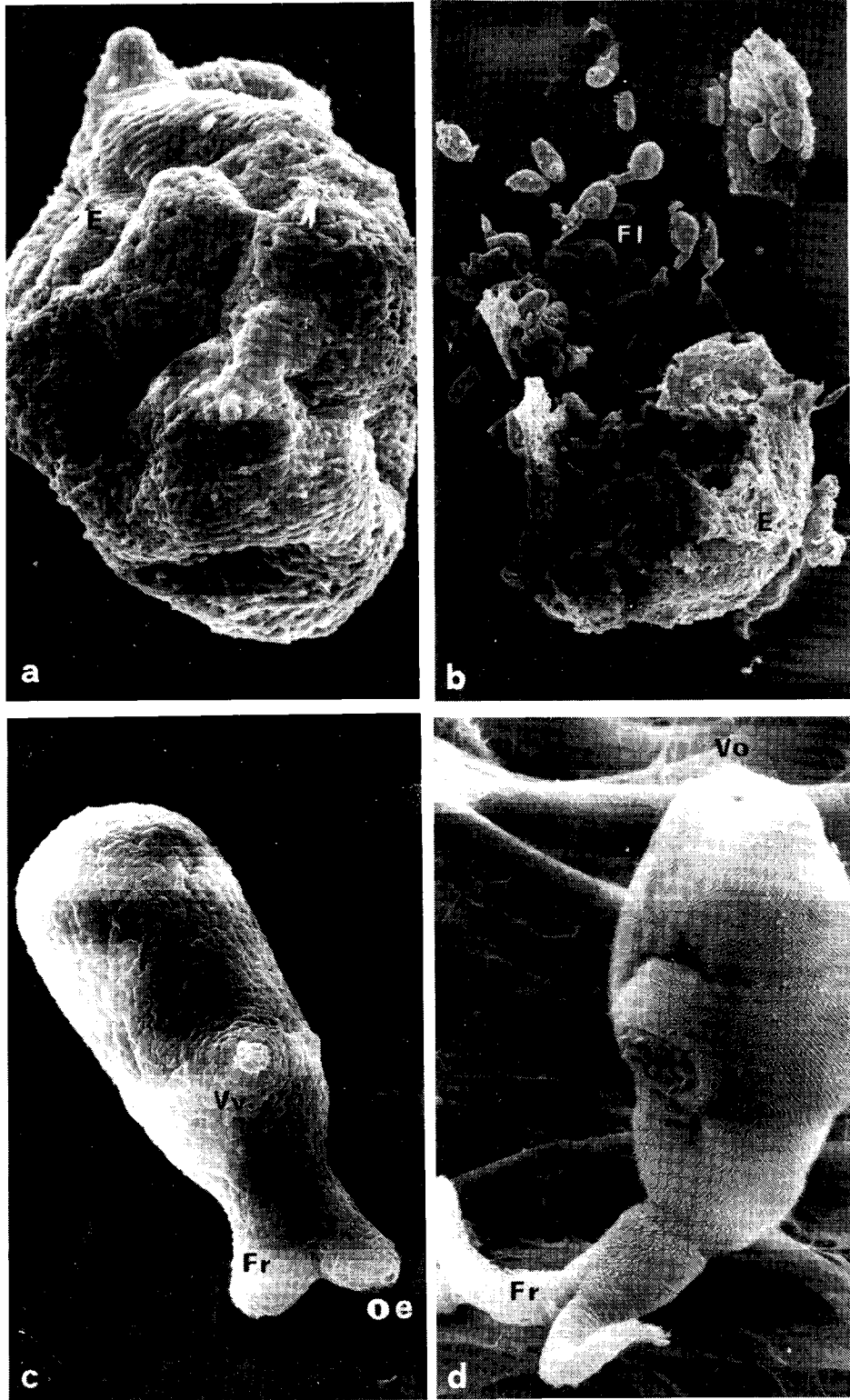


Fig. 6.9

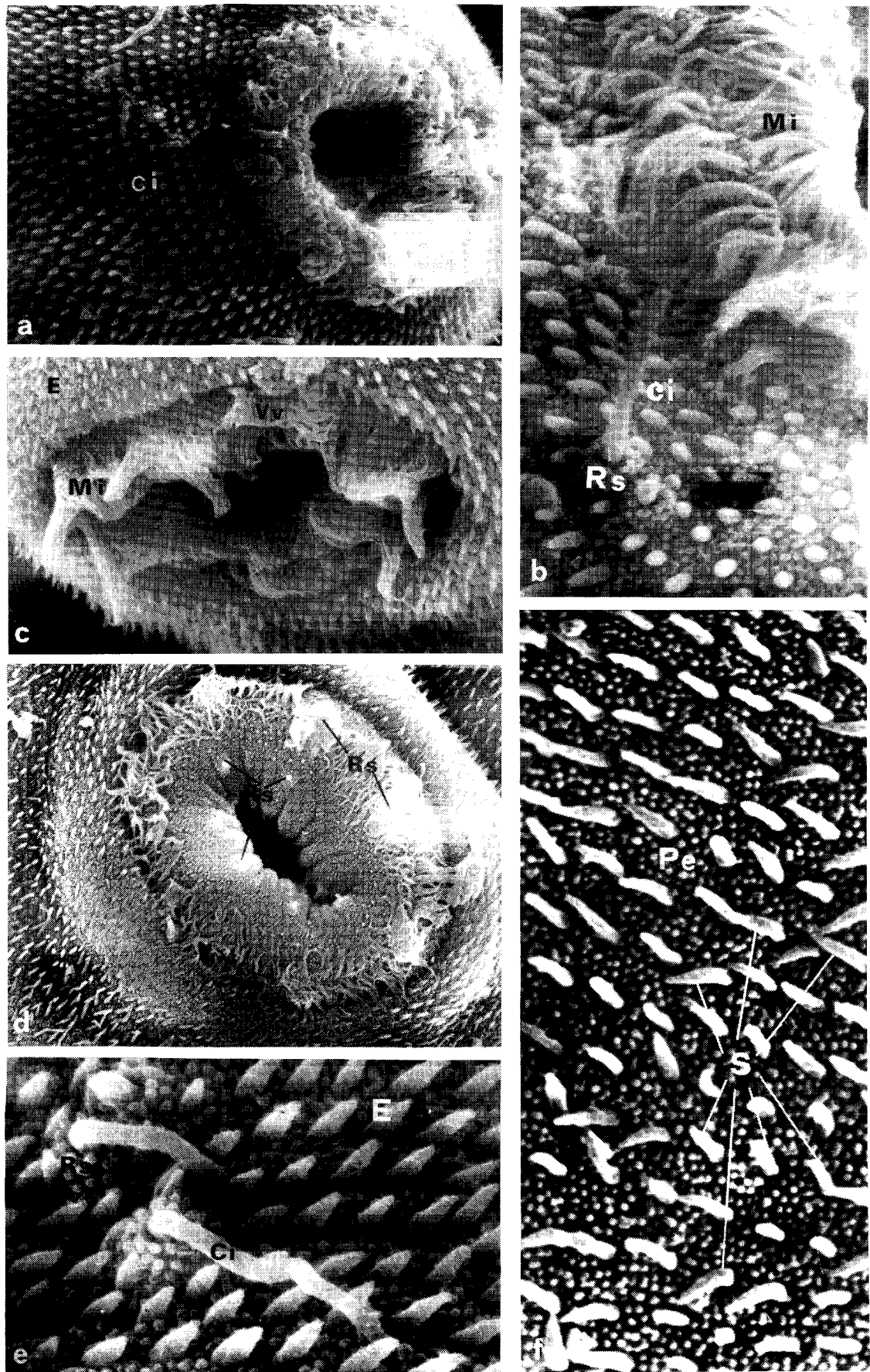


Fig. 6.10

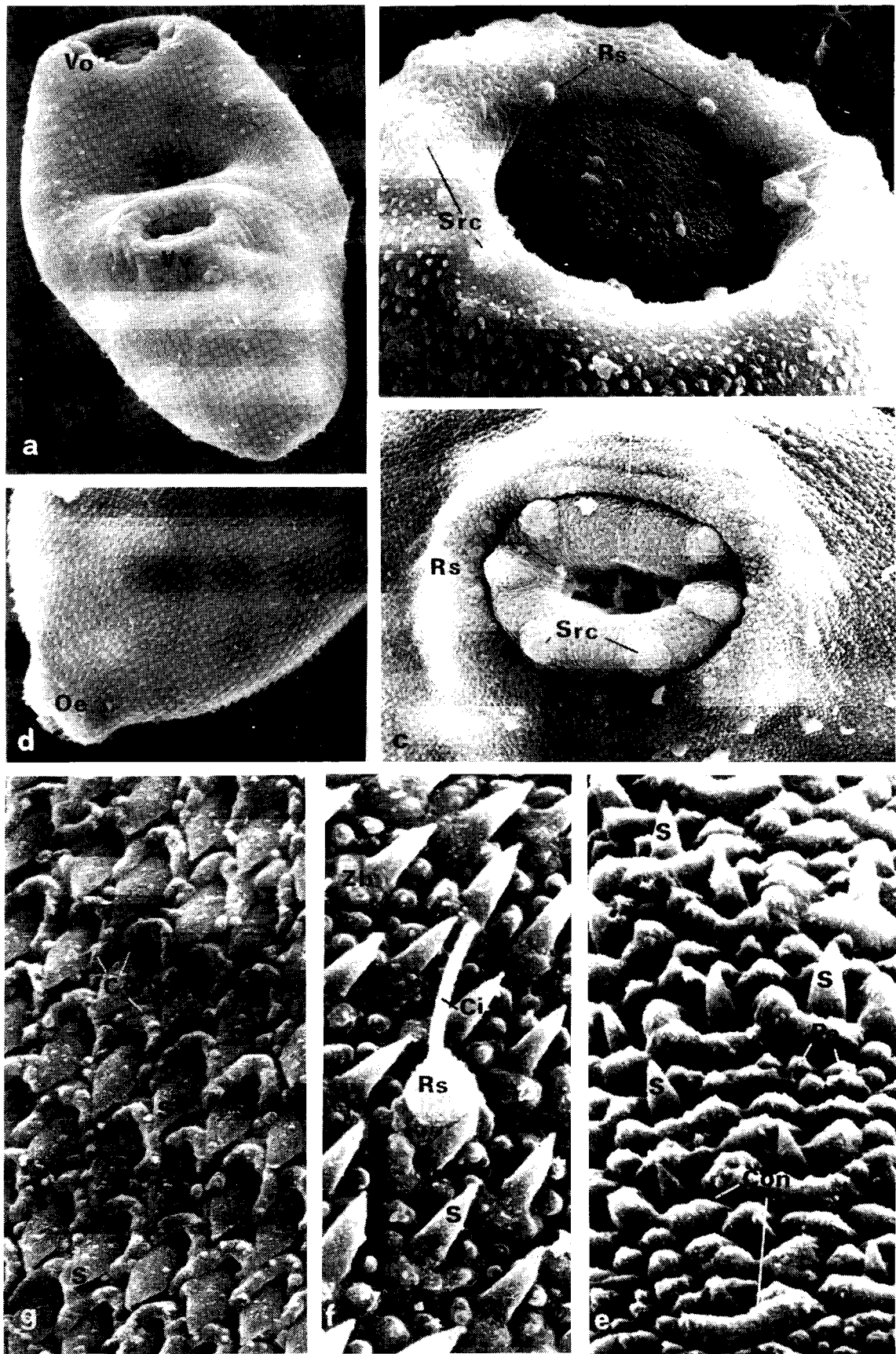


Fig. 6.11

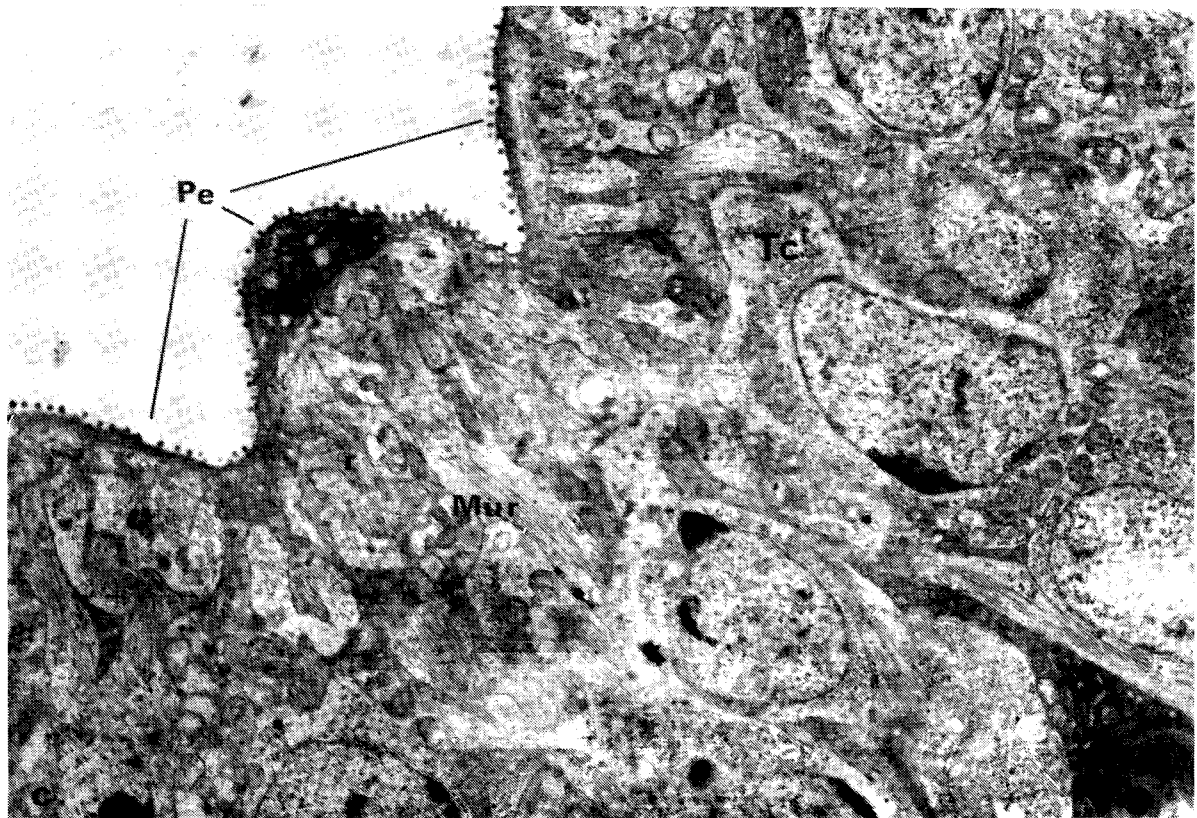
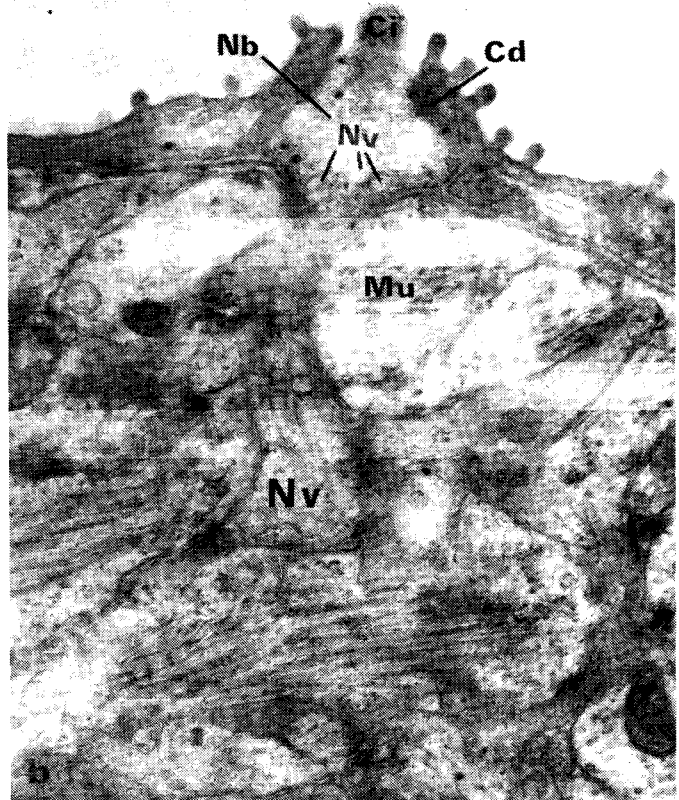


Fig. 6.12

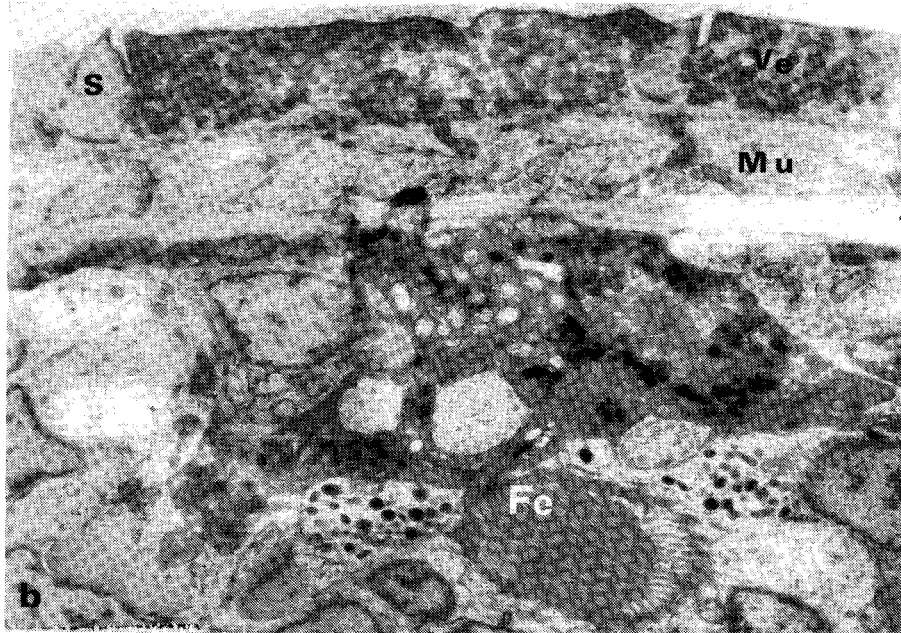
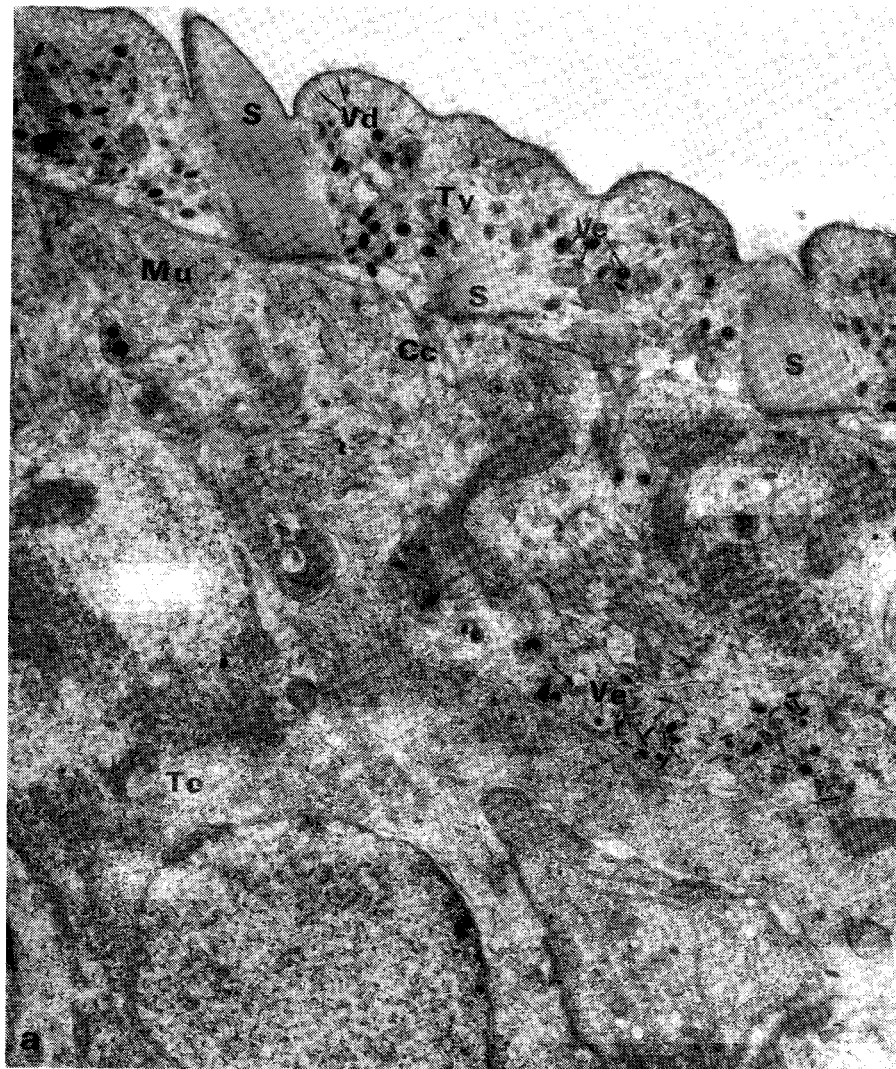


Fig. 6. 13

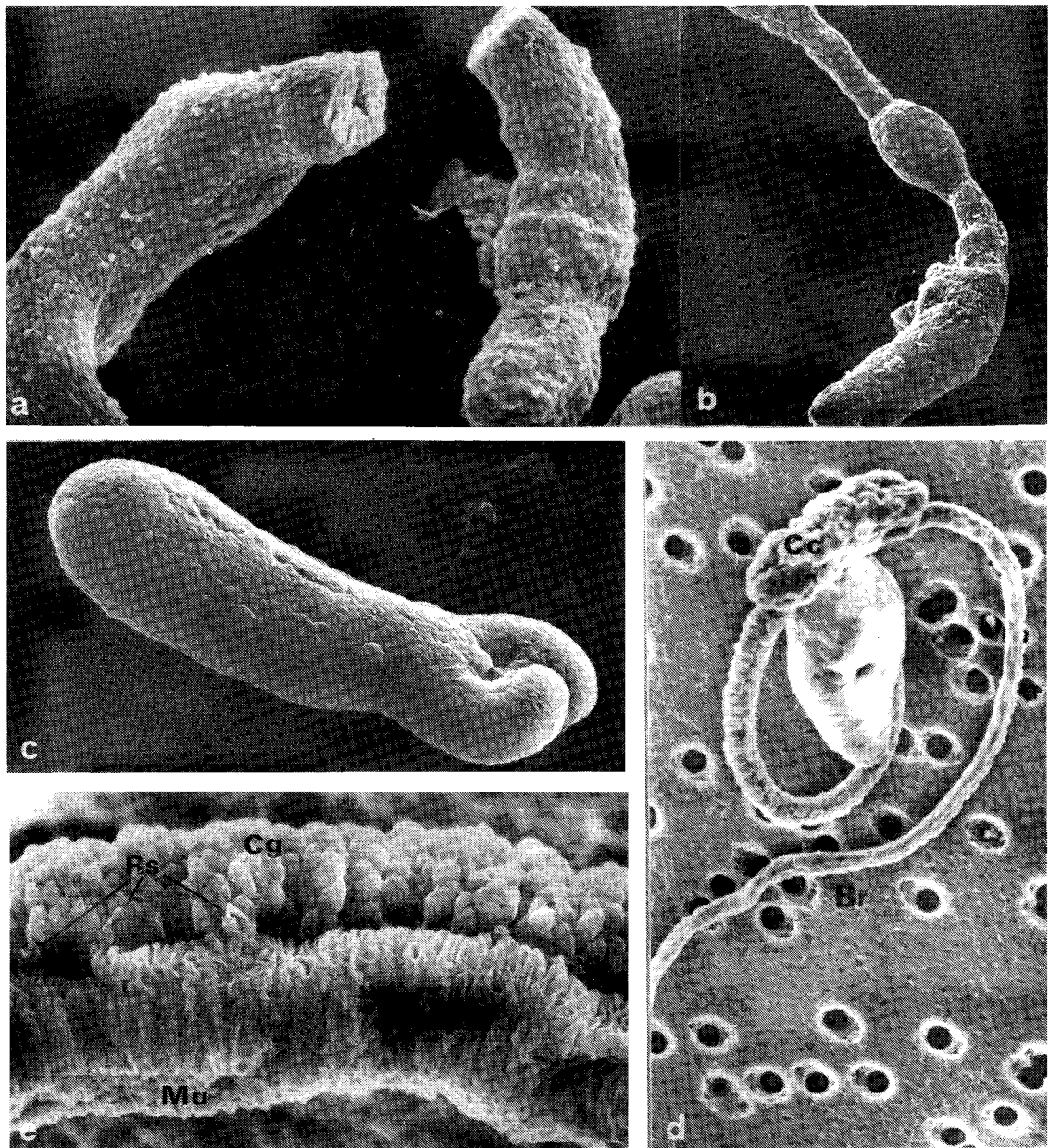


Fig. 6. 14

Fig. 6. 10- Ultraestrutura de varrimento da cercária de *Gymnophallus choledochus*. **a**-ventosa oral, x 5.000; **b** ampliação da ventosa oral, x 110; **c** e **d**-acetábulo, x 6.000, x 3.000; **e**-ampliação das papilas sensoriais, x 17.000; **f**-morfologia do tegumento de cercária, x 15.000. Ci-cílio

Fig. 6. 11- Ultraestrutura de varrimento da metacercária de *Gymnophallus choledochus*. **a**-metacercária, x 400; **b**-ventosa oral, x 2.400; **c**-acetábulo x 1.300; **d**-região posterior do corpo da metacercária,x 700; **e**-ultraestrutura do tegumento em fase de transição da cercária para a metacercária, x 10.000 **f** -morfologia observada em MEV, do tegumento da metacercária distendida e de um receptor sensorial, x 8.000.**g**-ultraestrutura do tegumento da metacercária infestante, x 6.000. Ci-cílio, Co-concavidades semicirculares, Oe-poro excretor, Pe-papila tegumentar, Rs-receptor sensorial, S-espículas, Rsc-papila sensorial em forma de cúpula, Zb-zona basal de inserção das espículas, Vo-ventosa oral, Vv-acetábulo.

Fig. 6. 12- Microscopia eletrônica de transmissão da cercária de *Gymnophallus choledochus* a- ultraestrutura do tegumento, x 25.600; b-receptor sensorial uniciliado, x 28.000 c- ultraestrutura de uma ventosa, x 5.250. Pe-papilas tegumentares, Mu-feixes musculares, Mur - feixe muscular radial, Ci-cílio, Cd-desmosoma anelar, Nb-bolbo nervoso, Nv - neuro-vesículas.

Fig. 6. 13-Microscopia eletrônica de transmissão da metacercária de *Gymnophallus choledochus*. a- ultraestrutura do tegumento, x 12.000; b-ultraestrutura duma célula flamígera, x 7.550. Ty-cincício, Tc-células tegumentares, Ve-vesículas Tipo I, Vd-vesículas em forma de disco bicôncavo, S-espículas, Mu-músculo, Lb-lâmina basal, Cc-pontes citoplasmáticas, Fc - célula flamígera.

Fig. 6. 14- Microscopia eletrônica de varrimento do esporoquisto e cercária de *Labratrema minimum*. a,b-esporoquisto, x 250, x 170. c-embrião de cercária, x 900. d-cercária, x 400. e- ampliação de uma parte de um braço da furca, x 4.700. Cc-corpo central da cauda, Cg-células glandulares, Br-braços da furca, Mu-camada de células musculares, Rs- papilas sensoriais.

6.4 ULTRASTRUTURA DAS FASES DO CICLO EVOLUTIVO DE

L. MINIMUM

Microscopia electrónica de varrimento

Esporoquisto

O esporoquisto de *L. minimum* tem a superfície rugosa (Fig. 6.14a), notando-se, de onde em onde, constrictões (Fig. 6.14b). As cercárias em embrião têm um formato de cauda característico, em forma de furca, como se observa na figura 6.14c. Nesta fase não se observa a diferenciação morfológica do tegumento nem do órgão cefálico.

Cercária

A morfologia da cercária observada em microscopia electrónica de varrimento está representada na figura 6.14d, 6.15a, com o corpo cônico e a cauda em furca (Fig. 6.14,d). No centro da face ventral situa-se a boca (Figs. 6.14,d; 6.15 c). Do corpo central da cauda, com a superfície bastante rugosa, partem lateralmente os braços da

furca, filamentosos e bastante longos (Fig. 6.14,d), cuja face externa tem uma morfologia estriada, constituída por camadas de células musculares, e a face interna com uma estrutura globosa constituída principalmente por células adesivas que contribuem para que a cauda seja o principal órgão de fixação da cercária ao hospedeiro (Fig.6.14 d). Podemos observar a presença de um sulco que separa as duas camadas celulares e nesse sulco a presença de papilas sensoriais uniciliadas (Fig. 6.14 e 6.15d). Na região anterior do corpo situa-se o órgão cefálico (Fig. 6.15 b), constituído por numerosas células glandulares desenvaginadas que imergem numa abertura central. Na base deste órgão, assim como dispersos pela superfície do corpo, observam-se órgãos sensoriais papilares uniciliados (Fig. 6.15 d). O tegumento tem uma estrutura papilar (Fig. 6.15e) e papilar com espículas ponteadas na face ventral (Fig. 6.15 c), na região preacetabular.

6.5 ULTRASTRUTURA DAS FASES DO CICLO EVOLUTIVO DE *H. QUISSETENSIS*

Microscopia electrónica de varrimento

O desenquistamento da metacercária só foi possível num pequeno número de indivíduos, o que não permitiu completar a observação da sua morfologia em ME.

Metacercária

A ultraestrutura da superfície do corpo da metacercária de *H. quissetensis* é caracterizada pela disposição imbricada das protuberâncias do tegumento, que se distribuem regularmente em linhas longitudinais, como se pode observar nas figuras 6.16 a e b. No tegumento não se observaram espículas. A ventosa oral não tem um lábio diferenciado no entanto observam-se algumas papilas sensoriais distribuídas pelo corpo, do tipo cúpula (Fig.6.16a).

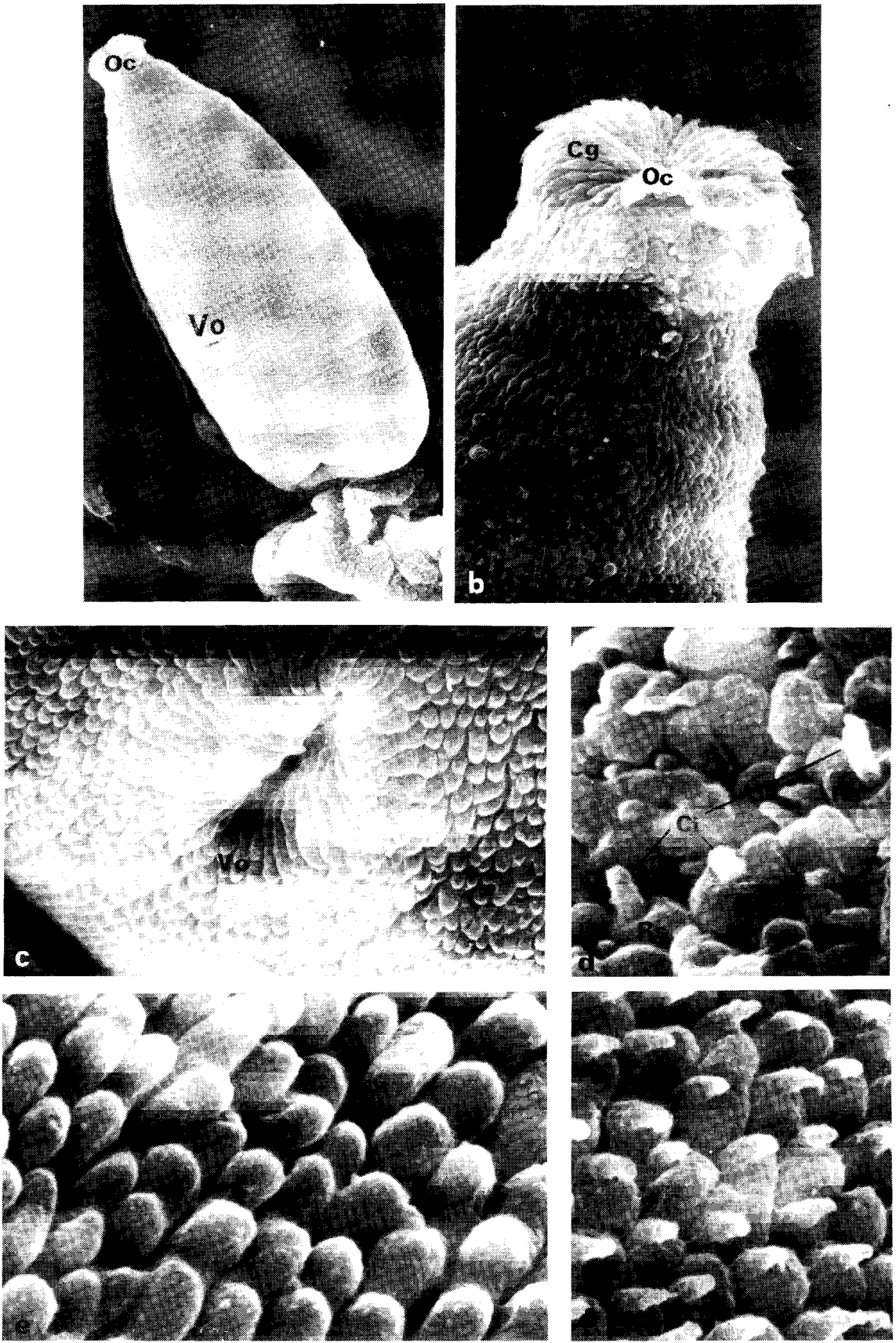


Fig. 6.15

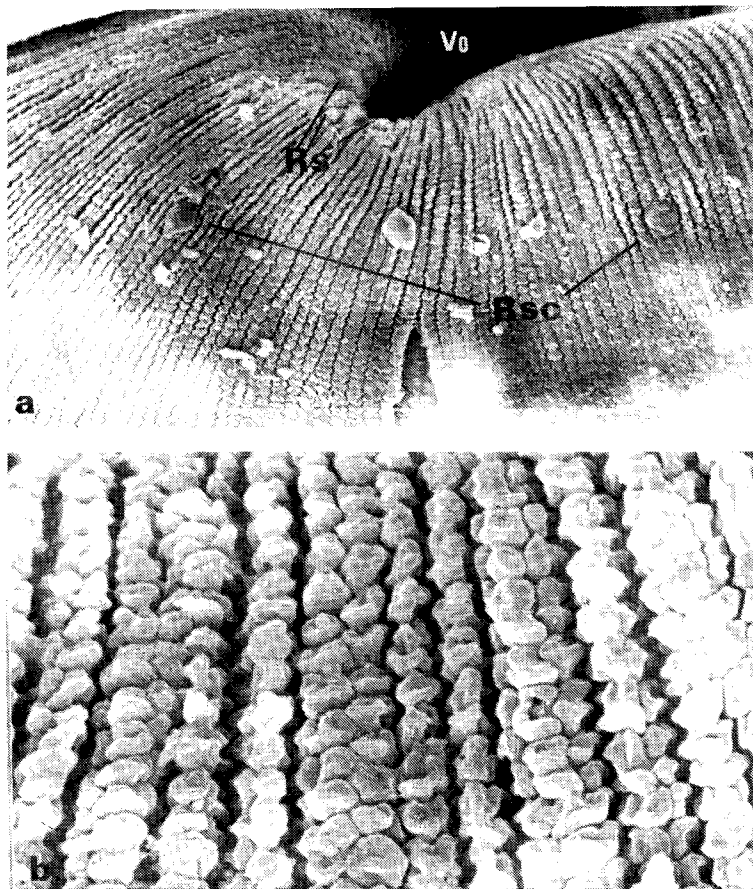


Fig. 6.16

Fig. 6. 15-Microscopia eletrônica de varrimento da cercária de *Labratrema minimum*. a-cercária, x 8.000; b-orgão cefálico, x 4.000. c-ventosa oral, x 5.000 d-papilas sensoriais uniciliadas (Rs), x 17.000; e-morfologia do tegumento, x 17.000; f-zona do tegumento com espículas, x 17.000. Oc-orgão cefálico, Vo-ventosa oral, Cg-células glandulares, C-cílio.

Fig. 6.16-Microscopia eletrônica de varrimento da metacercária de *Himasthla quissetensis*, desenquistada. a-ultraestrutura da região cefálica, x 900. b-ampliação da morfologia do tegumento, x 5.000. Vo-ventosa oral, Rs-papilas sensoriais, Rsc-papilas sensoriais em forma de cúpula.

CAPÍTULO 7

DISTRIBUIÇÃO DA INFECCÃO DE *C. EDULE* POR DIGENEA.

PREVALÊNCIA, INTENSIDADE E EFEITO INTERACTIVO DA PRESENÇA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PARASITAS.

DISTRIBUIÇÃO DA INFECCÃO EM *C. EDULE* POR DIGENEA

7. 1. - Parâmetros físicos da água nas estações de colheita

Durante o período entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992 foram medidos os valores da temperatura, salinidade e pH nas estações 1, 2 e 3B, durante o período final da vazante (Tab. 7. 1; Fig.7. 1).

Tabela 7. 1 - Parâmetros físicos da água nas estações de colheita de *C.edule* na Ria de Aveiro (1991-92)

| MÊS | ESTAÇÃO | TEMPERATURA o C | SALINIDADE ‰ | pH |
|-----------|---------|--------------------|-----------------|------|
| OUTUBRO | 1 | 19.0 | 31.5 | 7.97 |
| | 2 | 18.0 | 30.5 | 6.69 |
| | 3 | 19.5 | 31.0 | 7.66 |
| NOVEMBRO | 1 | 14.0 | 30.0 | 7.87 |
| | 2 | 13.0 | 27.5 | 7.89 |
| | 3 | 14.0 | 27.0 | 8.42 |
| DEZEMBRO | 1 | 10.0 | 30.5 | 7.77 |
| | 2 | 10.5 | 28.2 | 7.76 |
| | 3 | 10.0 | 28.2 | 7.68 |
| JANEIRO | 1 | 10.0 | 29.0 | 6.68 |
| | 2 | 10.0 | 27.5 | 6.92 |
| | 3 | 10.5 | 28.5 | 8.37 |
| FEVEREIRO | 1 | 12.0 | 29.5 | 6.96 |
| | 2 | 12.0 | 28.0 | 7.14 |
| | 3 | 13.0 | 28.5 | 7.83 |
| MARÇO | 1 | 14.0 | 36.0 | 7.56 |
| | 2 | 14.0 | 35.0 | 7.77 |
| | 3 | 14.5 | 36.5 | 8.92 |
| ABRIL | 1 | 16.0 | 34.0 | 8.01 |
| | 2 | 16.0 | 31.5 | 7.70 |
| | 3 | 16.0 | 32.0 | 8.66 |
| MAIO | 1 | 15.0 | 34.0 | 8.06 |
| | 2 | 15.0 | 34.8 | 7.93 |
| | 3 | 16.0 | 34.8 | 8.13 |
| JUNHO | 1 | 18.0 | 34.0 | 7.96 |
| | 2 | 20.0 | 32.0 | 8.10 |
| | 3 | 18.0 | 32.0 | 8.10 |
| JULHO | 1 | 18.0 | 35.0 | 7.01 |
| | 2 | 18.5 | 34.8 | 8.20 |
| | 3 | 19.0 | 34.8 | 8.21 |
| AGOSTO | 1 | 18.0 | 34.5 | 8.00 |
| | 2 | 18.0 | 35.0 | 8.10 |
| | 3 | 20.0 | 34.5 | 8.31 |
| SETEMBRO | 1 | 17.0 | 35.0 | 7.21 |
| | 2 | 19.0 | 35.0 | 7.80 |
| | 3 | 19.0 | 35.0 | 8.20 |

A temperatura varia entre 10° C e 20° C. A diferença de temperatura entre as estações é pequena, verificando-se contudo diferenças máximas de 2° C nos meses de Junho, Agosto e Setembro (Tab. 7.1). As estações com temperaturas mais elevadas foram em Junho a estação 2 e em Agosto a estação 3b.

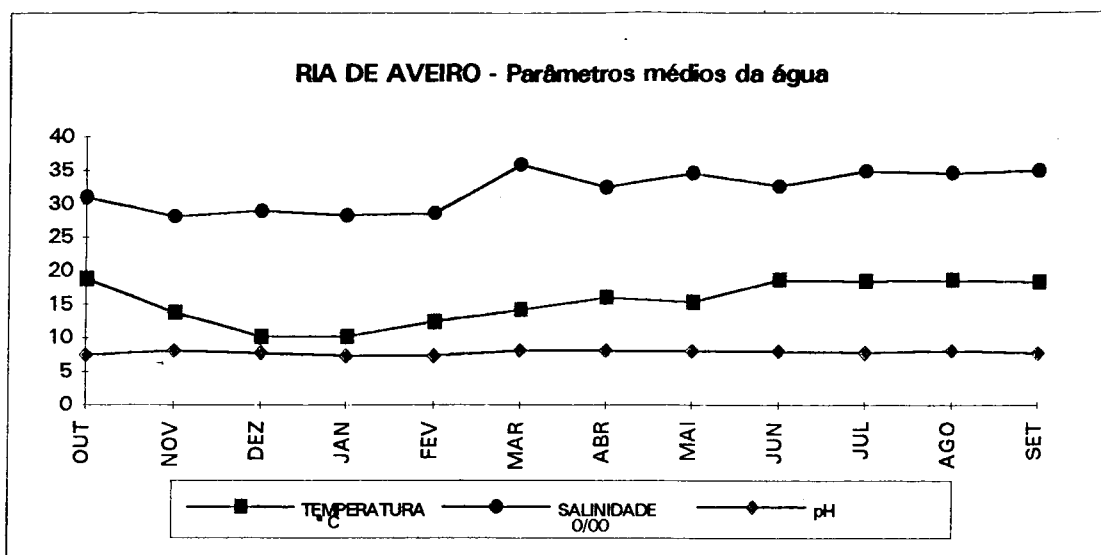


Fig. 7. 1

A salinidade neste troço da Ria (Estrada nº 327, Kms 46 a 54) é bastante alta, situando-se entre 28 ‰ e 36 ‰. No entanto para norte, no local denominado Areinho (Km. 34) a salinidade mantém-se semelhante à das outras estações. Entre as três estações, é a estação 1 que apresenta a salinidade mais alta na maior parte dos meses, para o que deve contribuir a proximidade da barra, portanto do mar.

Quanto aos valores médios de pH (Fig.7.1) apresentam variações muito ligeiras sendo o valor médio de 7,81. Dos resultados obtidos constata-se que ao longo do ano e entre as três estações é a estação 3B a que apresenta valores de pH mais elevados, com excepção dos meses de Outubro e Dezembro em que o maior valor foi encontrado na estação 1.

Estes parâmetros, pela sua pequena variação, não parecem ter grande influência na distribuição dos hospedeiros e dos parasitas. No entanto, os valores da salinidade nos meses de Março, Maio, Julho, Agosto e Setembro poderão ter proporcionado a penetração, até mais a norte da foz da Ria, de teleósteos marinhos, hospedeiros definitivos de algumas das espécies de digéneos em estudo (Tab. 3.2).

7.2. - Caracterização da infecção de *C. edule* por Digenea

Prevalência, intensidade e efeito interactivo da presença simultânea de diferentes parasitas.

Os números totais de *C. edule* (n=848) dissecados ao longo dum ano, entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992 provenientes das estações 1, 2 e 3 B são dados na tabela 7.2.

Tabela 7.2: Distribuição do número de *C. edule* observados entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992 na Ria de Aveiro, nas diferentes estações.

| | OUT | NOV | DEZ | JAN | FEV | MAR | ABR | MAI | JUN | JUL | AGO | SET | TOTAL |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| EST 1 | 23 | 30 | 48 | 43 | 34 | 26 | 24 | 36 | 21 | 22 | 20 | 23 | 350 |
| EST 2 | 27 | 23 | 24 | 23 | 19 | 20 | 18 | 20 | 16 | 16 | 16 | 20 | 242 |
| EST 3B | 24 | 32 | 24 | 23 | 16 | 20 | 19 | 19 | 18 | 20 | 17 | 23 | 256 |
| número total de <i>C. edule</i> estudados | | | | | | | | | | | | | 848 |

Esta parte do trabalho incidiu no estudo em *C. edule*, hospedeiro primário e intermediário, da prevalência das espécies diferentes de digéneos infestantes, intensidade de infestação, sua relação com a estação de colheita e época do ano.

Prevalência e Intensidade de Infestação por *M. minutus*

A prevalência de infestação de *C. edule* por *M. minutus*, ao longo dum ano, por mês e estação, é dada na figura 7.2.

A prevalência de infestação é determinada pelo número de hospedeiros que foram encontrados parasitados na amostra (749/848)

A prevalência média anual mais elevada situou-se na estação 2 com 93,83 % seguida da estação 3B com 89,78% e a menor observou-se na estação 1 com 82,52% , podendo concluir-se que existe uma dependência significativa ($\chi^2 = 17,78$, $P < 0,005$) entre a prevalência de infestação anual por *M. minutus* e a estação de proveniência de *C. edule*.

Embora tenha havido uma diminuição na prevalência média na estação 3B em relação ao resultado obtido para a mesma estação (93,3 %) entre Outubro de 1987 e Abril de 1989, esta não é significativa (Russell-Pinto, 1990). A prevalência anual nas três estações foi de 88,71%.

A intensidade de infestação é determinada pelo número de digéneos encontrados por *C. edule* parasitado.

Na figura 7.3 estão representados os intervalos de confiança de 95% para a intensidade média de infestação de *C. edule* por *M. minutus* (n=749) ao longo dos 12 meses e para as três estações estudadas.

Na mesma amostra a intensidade média anual de infestação foi mais elevada na estação 3B com 81,87 metacercárias por *C. edule* (n=230), atingindo os valores de 65,95 e 31,65, respectivamente na estação 2 (n=228) e 1 (n=291), .

As intensidades médias mensais de infestação de *C. edule* por metacercárias de *M. minutus* nas estações 3B e 2 apresentam uma grande variabilidade, em relação à quase uniformidade, em níveis bastante mais baixos, das intensidades médias mensais na estação 1 (Fig.7.3)

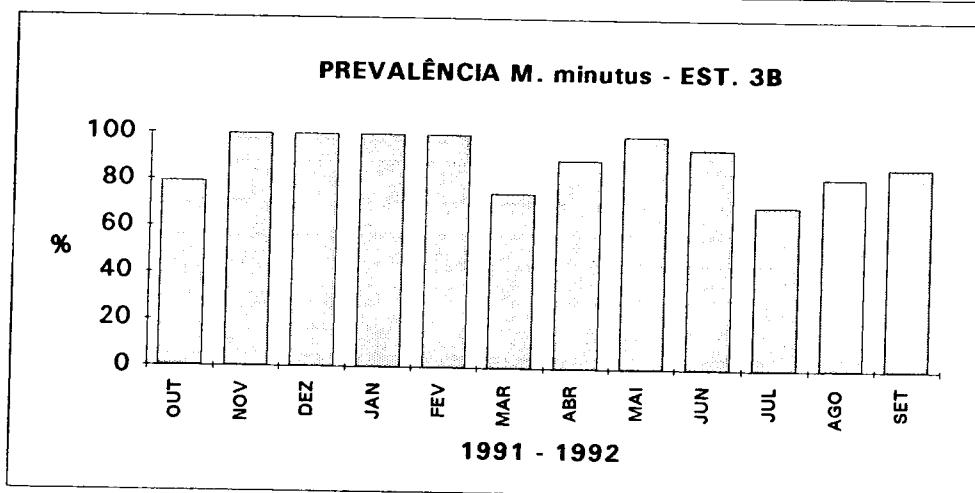
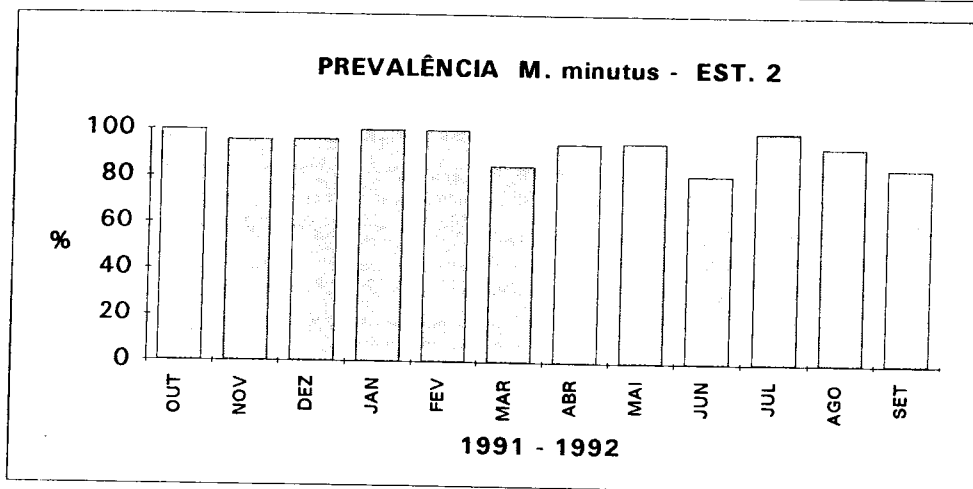
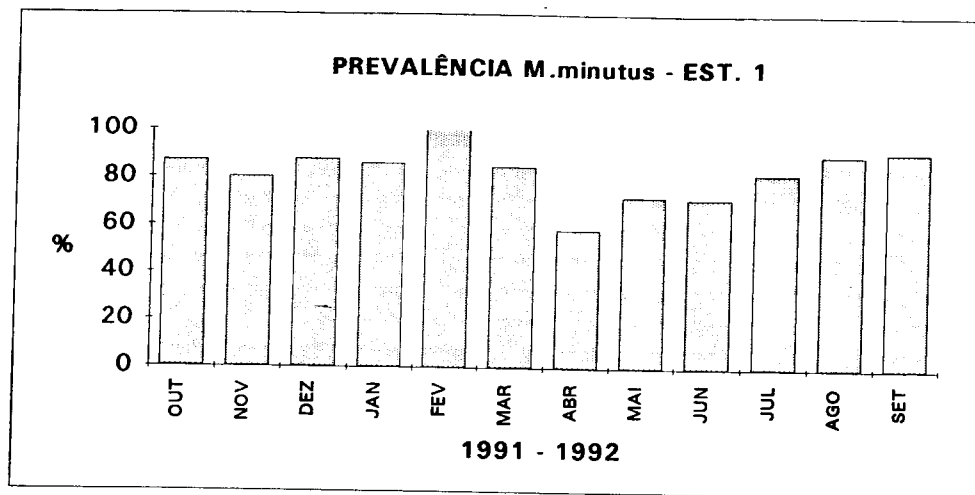


Fig. 7. 2- Distribuição da prevalência de infestação de *C. edule* por *M. minutus* de Outubro de 1991 a Setembro de 1992.

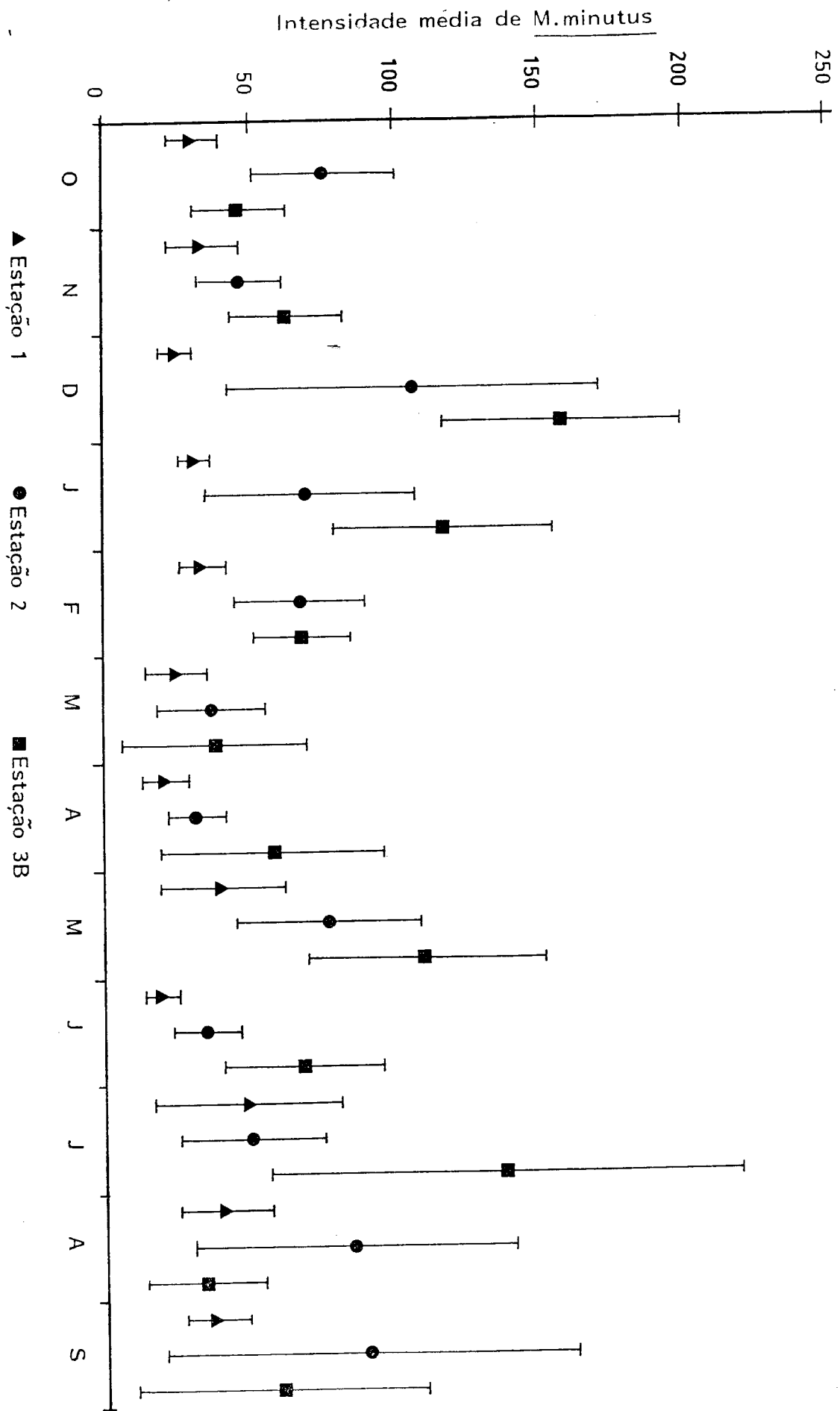


Fig. 7. 3 - Distribuição da intensidade da infestação de *C. edule* por *M. Minutus* ao longo do ano nas estações 1, 2 e 3B (O-Out., 91; S-Set., 92)

O pico de intensidade mais elevada situa-se no mês de Dezembro, na estação 3B ($157,83 \pm 19,90$; $n=24$)* logo seguido pela da estação 2 ($106,26 \pm 31,07$; $n=23$), observando-se picos menores em Janeiro, Maio e Julho na estação 3B ($116,78 \pm 18,29$; $n=23$); ($110,00 \pm 19,67$; $n=20$); ($137,14 \pm 37,86$; $n=14$) e em Maio, Agosto e Setembro na estação 2 ($76,21 \pm 15,30$; $n=19$); ($84,73 \pm 25,92$; $n=15$); ($90,29 \pm 33,49$; $n=17$). Na estação 3B a menor intensidade observa-se em Março e Agosto ($37,40 \pm 14,85$; $n=15$); ($33,14 \pm 9,39$; $n=14$), meses que devem corresponder ao início e fim da infestação.

Na estação 2 os valores mais baixos foram observados em Abril e Junho ($31,00 \pm 4,58$; $n=17$); ($34,07 \pm 5,35$; $n=13$). Observa-se um pico de intensidade elevada em Julho ($48,11 \pm 15,40$; $n=18$). O valor mais baixo observou-se em Junho ($18,87 \pm 2,73$; $n=15$).

A estação 1 apresenta uma intensidade média de infestação de *C. edule* por *M. minutus* significativamente mais baixa ($P < 0,05$) do que nas outras estações.

Apenas nas estações 2 e 3B existem diferenças significativas entre as médias de intensidade de infestação ao longo do ano.

A presença ou a ausência de *M. fossarum* em *C. edule* tem influência significativa na intensidade de infestação de *C. edule* por *M. minutus* (Fig. 7.4). A intensidade é menor na ausência de *M. fossarum* e aumenta significativamente na sua presença ($55,74 \pm 4,81$, $n=169$; $102,91 \pm 9,56$, $n=128$; $P < 0,05$). A intensidade de infestação de *C. edule* por metacercárias de *M. minutus* aumenta em animais parasitados também por *M. fossarum*. No entanto a presença ou a ausência de *H. quissetensis* em *C. edule* parece uma influência de sinal contrário na intensidade de infestação de *C. edule* por *M. minutus* (Fig. 7.4). A intensidade de *M. minutus* é maior na ausência de *H. quissetensis* e diminui significativamente na sua presença ($55,74 \pm 4,81$, $n=169$; $38,32 \pm 2,52$, $n=241$; $P < 0,05$).

Nota : * (média \pm EP); n =dimensão da amostra.

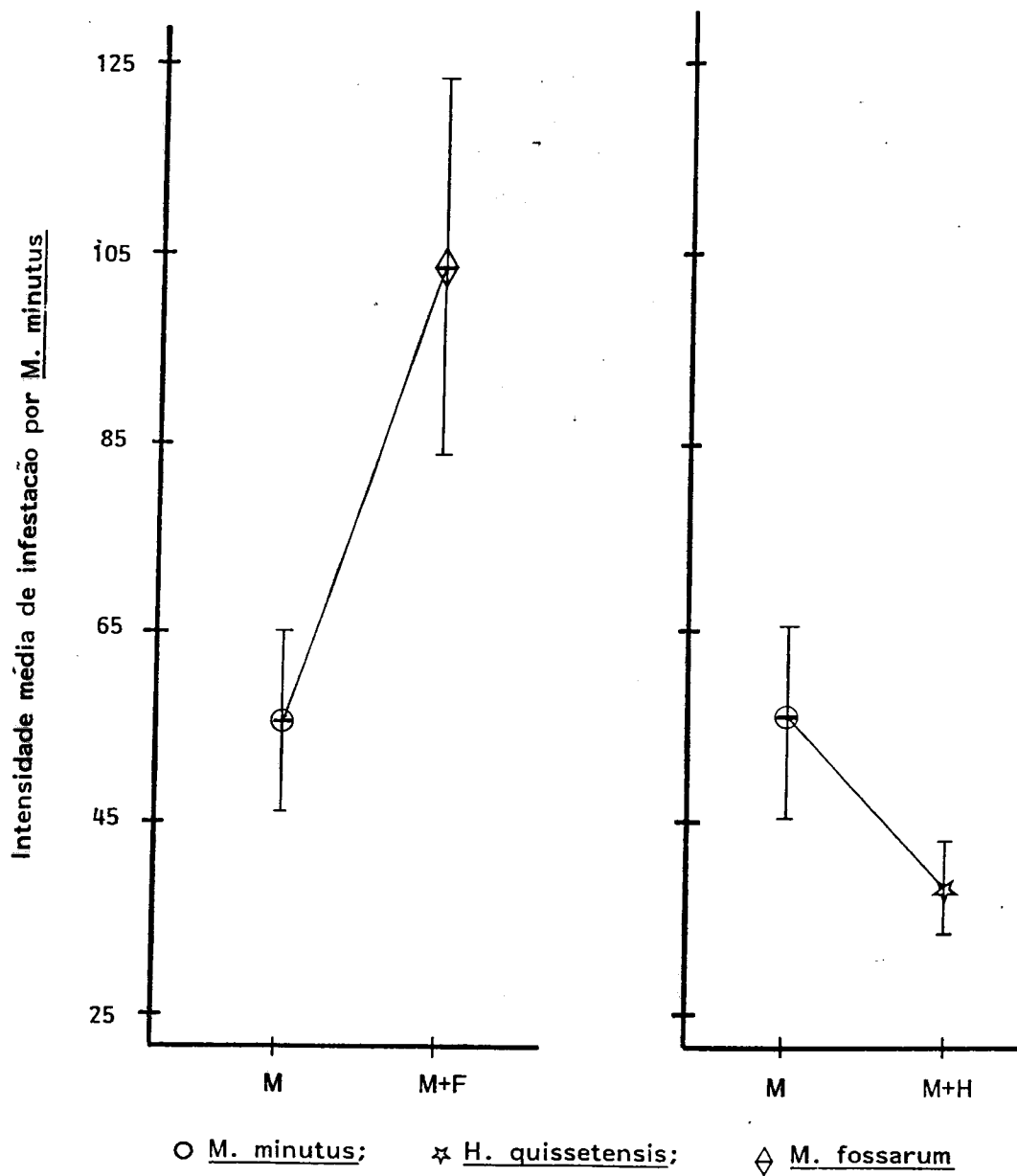


Fig. 7. 4 - Influência de presença de *M. fossarum* e de *H. quissetensis* na intensidade de infestação de *C. edule* por *M. minutus*

Prevalência e Intensidade de Infestação por *M. fossarum*

Na figura 7.5 podemos observar a prevalência de infestação de *C. edule* por *M. fossarum*, entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992, calculada na mesma amostra de 848 *C. edule* referida anteriormente (Tab.7.2), por mês e estação.

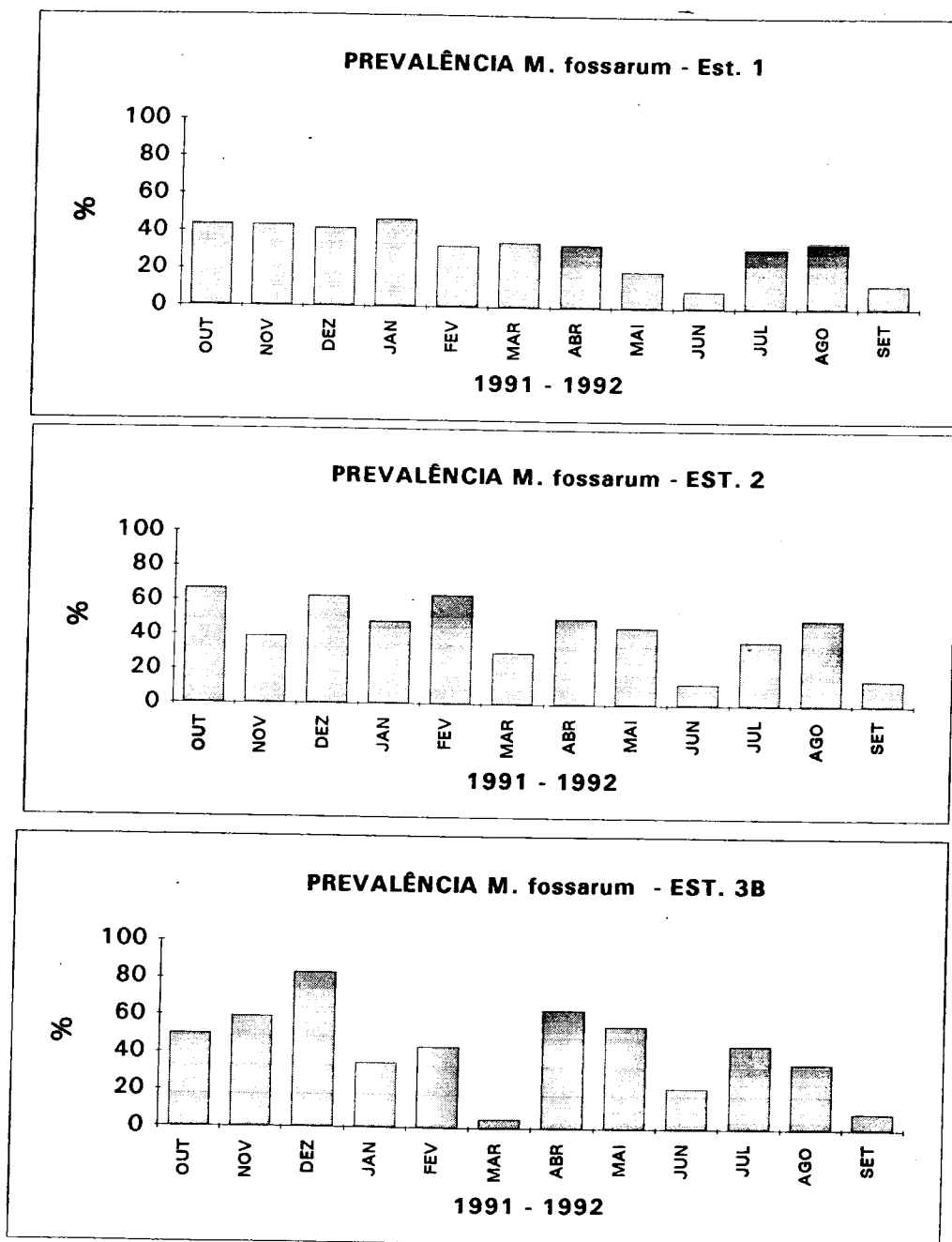


Fig.7.5 - Distribuição da prevalência de infestação de *C. edule* por *M. fossarum*.

Tal como no caso do *M. minutus* a prevalência anual mais elevada também se encontra na estação 2 (n=242) e é de 43,39%, sendo na estação 3B de 42,19% (n=256) e na estação 1 de 32,00% (n=350). Existe uma diferença significativa entre as três estações ($\chi^2_2=10,16$, $P<0,01$) A média da prevalência de *M. fossarum* neste período foi de 38,33%.

A intensidade média mais elevada ocorreu em Dezembro nas estações 2 e 3B ($8,67\pm 3,37$, $n=15$; $9,25\pm 1,46$, $n=20$) e em Abril na estação 1 ($5,71\pm 4,05$, $n=7$), e a menor em Julho ($1,57\pm 0,30$, $n=7$), Abril ($2,00\pm 0,30$, $n=12$) e Novembro ($2,78\pm 0,52$, $n=9$) respectivamente nas estações 1, 3B e 2.

Tal como em *M. minutus*, a intensidade média anual mais elevada observou-se na estação 3B decrescendo para a estação 1. Não existem diferenças significativas entre a variação da intensidade média de infestação de *C. edule* por *M. fossarum* ao longo do ano e nas três estações.

De acordo com os resultados acima referidos podemos estabelecer o ciclo evolutivo de *M. minutus* e de *M. fossarum* para Portugal (Fig. 7.6).

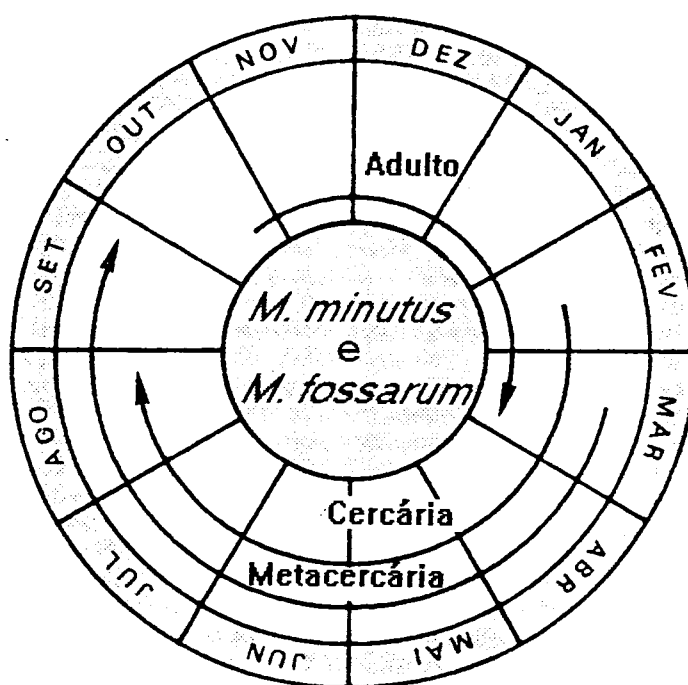


Fig. 7. 6 - Ciclo de vida de *M. minutus* e de *M. fossarum* para Portugal.

Prevalência da infestação de *G. choledochus*

Para o estudo da prevalência de infestação de *C. edule* por *G. choledochus* foram dissecados 312 hospedeiros, entre Junho de 1985 e Setembro de 1991, encontrando-se 7 parasitados e sendo a prevalência de 2,24 % (Tab. 7.3).

Tabela 7.3 - Prevalência da infestação de *C. edule* por *Gymnophallus choledochus*

| Ano | Mês | Estação | n° <i>C. edule</i> dissecados | N° <i>C. edule</i> parasitados | Fases do ciclo de vida |
|--------------|----------|---------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 1985 | Junho | 3A | 114 | 1 | Cerc. e metacerc. |
| 1986 | Junho | 3A | 86 | 2 | " |
| 1987 | Maio | 3A | 20 | 1 | " |
| 1989 | Abril | 3A | 56 | 1 | " |
| 1991 | Maio | 3B | 16 | 1 | " |
| 1991 | Setembro | 2 | 20 | 1 | " |
| Total | | | 312 | 7 | |

Prevalência = 2.24%

A prevalência média anual encontrada foi de 2,21 % na est. 1 e de 2,32 % na est. 2.

A infecção por *C. choledochus* foi observada em *C. edule* parasitado por *M. minutus* e por *M. minutus* e *M. fossarum*.

Entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992, num total de 848 *C. edule* provenientes das estações 3B, 2 e 1 não foi observada a infestação do bivalve hospedeiro por fases larvares de *G. choledochus*.

Prevalência e intensidade da infestação de *G. rebecqui*

A metacercária de *G. rebecqui* foi observada pontualmente, em colheitas de *C. edule* e *C. glaucum* / *C. edule*.

Por vezes é bastante difícil a separação das duas espécies, dado os bivalves apresentarem características morfológicas duma e doutra espécie, como acontece nas estações situadas na Costa Nova, Ilha de Samos e Lagoa do Paraíso. A única estação em que se pode afirmar que *G. rebecqui* parasita *C. edule* é na estação 2.

Na tabela 7. 4 estão resumidos os resultados das observações feitas.

Tabela 7. 4 - Prevalência e intensidade da infestação de *G. rebecqui*.

| Ano | Mês | Estação | Nº de hosp. dissecados | Nº de hosp. parasitados | Fase do ciclo |
|--------------|-----------|------------|------------------------|-------------------------|---------------|
| 1987 | Dezembro | C. Nova | 36 | 1 (5)* | Metacercária |
| 1988 | Fevereiro | I. Samos | 30 | 1 (3) | " |
| 1988 | Fevereiro | Est. 2 | 11 | 1 (2) | " |
| 1988 | Maio | L. Paraíso | 13 | 1 (2) | " |
| Total | | | 90 | 4 (12) | |

Prevalência = 4,44 %

Intensidade = 0,13

* - Nº de parasitas por hospedeiro

Em 90 hospedeiros a prevalência encontrada foi de 4,44%. O número de metacercárias retiradas foi de 12 o que torna o valor da intensidade muito baixo (= 0,13).

Não foi possível fazer mais observações sobre a presença de *G. rebecqui*. No entanto Portugal reúne todas as condições para o desenvolvimento do ciclo, dada a

presença dos diferentes hospedeiros (Tab.5.2), incluindo as aves referidas pertencentes à família *Anatidae* (Bruun e Singer, 1972).

Prevalência da infestação de *L. minimum*

Na tabela 7. 5 poderemos observar a distribuição da infecção de *C. edule* por *L. minimum* durante os períodos de tempo entre Março de 1987 e Setembro de 1991, e entre Outubro de 1991 e Agosto de 1992.

A prevalência entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992, calculada por estação e por mês, está representada na Fig.7.7.

Para o estudo da prevalência média entre Março de 1987 e Setembro de 1991 foram dissecados 163 *C. edule* encontrando-se 12 parasitados, sendo a prevalência média de 7,36%, na zona da Ria de Aveiro, que abrange as estações 1, 2, 3B além da Torreira e Lagoa do Paraíso.

Entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992 a prevalência de infestação de *C. edule* por *L. minimum* foi de 1,06% (9 parasitados / 848 hospedeiros).

A estação 2 tem a prevalência mais alta, 1,65% (4 / 242) seguida da estação 3B com 1,017% (3 / 256). A menor prevalência 0,57%, situa-se na estação 1 (3 / 256) .

Só em Junho (1992) é que *C. edule* foi observado com infestação simples por *L. minimum*. Em todos os outros meses a infecção foi múltipla, ou só com *M. minutus*, ou com *M. minutus* e *H. quissetensis* , ou com *M. minutus*, *M. fossarum* e *H. quissetensis*.

No entanto, e de acordo com os resultados obtidos (Tab.7.5; Fig. 7.9), constatamos que no conjunto das três estações principais em que se desenvolveu este trabalho só nos meses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro não foram observados quaisquer berbigões parasitados por este digéneo.

Tabela 7. 5 - Prevalência da infestação de *L. minimum* em *C. edule*

| Ano | Mês | Estação | N° hospedeiros dissecados | N° hospedeiros parasitados | Fase do ciclo | |
|--------------|------|------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--|
| 1987 | Mar. | 3A | 8 | 1 | Esporoquistos e cercárias | |
| 1987 | Set. | 3A | 10 | 1 | | |
| 1987 | Out. | 3B | 20 | 1 | | |
| 1987 | Nov. | 3B | 20 | 1 | | |
| 1988 | Jun. | 3B | 10 | 1 | | |
| 1988 | Out. | L. Paraíso | 24 | 1 | | |
| 1989 | Abr. | 3B | 30 | 1 | | |
| 1989 | Mai. | 3B | 18 | 1 | | |
| 1990 | Mai. | Torreira | 5 | 1 | | |
| 1991 | Set. | 1 | 9 | 1 | | |
| 1991 | Set. | 2 | 9 | 2 | | |
| 1991 | Out. | 1 | 23 | 1 | | |
| 1991 | Nov. | 3B | 32 | 1 | | |
| 1992 | Mar. | 2 | 20 | 1 | | |
| 1992 | Abr. | 2 | 18 | 2 | | |
| 1992 | Jun. | 1 | 21 | 1 | | |
| 1992 | Jul. | 3B | 20 | 1 | | |
| 1992 | Ago. | 3B | 17 | 1 | | |
| Total | | | 330 | 21 | | |

Em amostras da estação 3A, Março de 1987 e Torreira (1990) foram observados esporoquistos de *L. minimum* em *C. glaucum*.

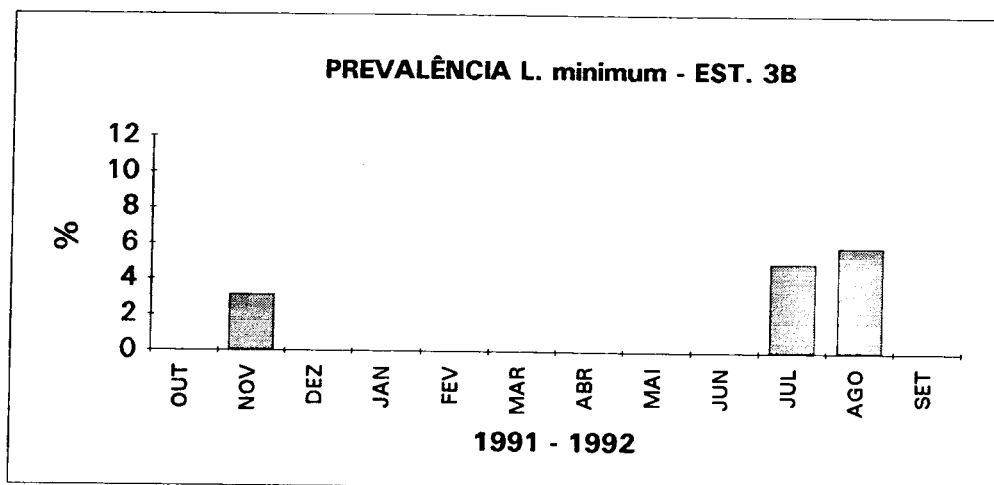
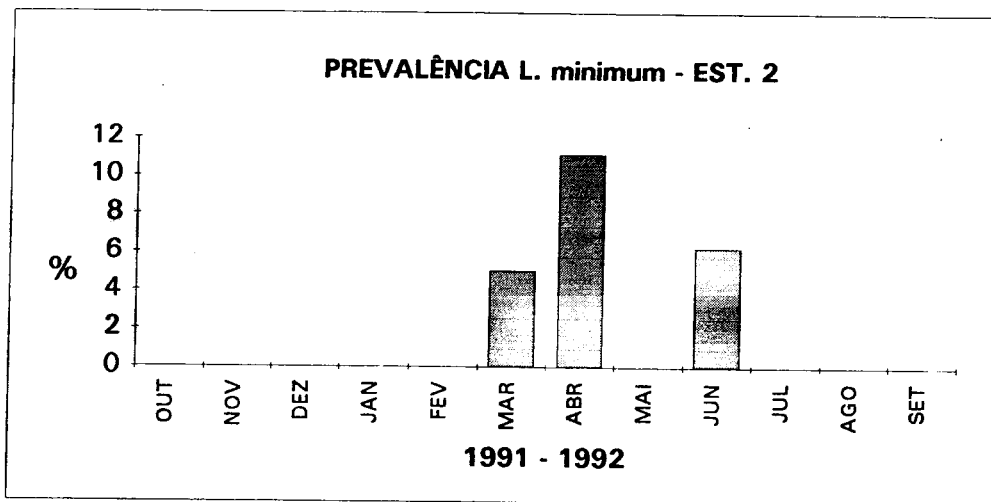
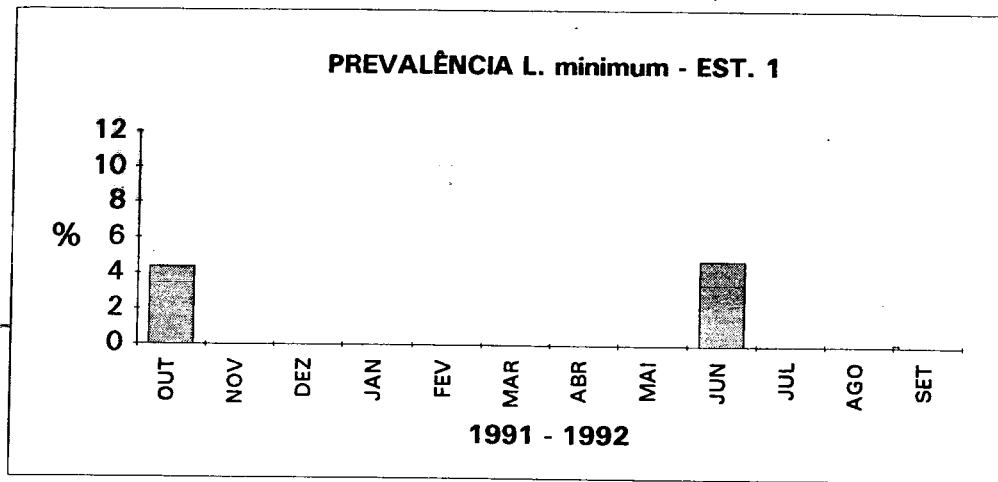


Fig.7.7 - Distribuição da Prevalência de infestação de *C. edule* por *L. minimum*.

Prevalência da infestação de *H. quissetensis*

A prevalência de *H. quissetensis* foi estudada durante o período de um ano, entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992 (Fig.7.8), nas estações 3B, 2 e 1, como referido para os digéneos infestantes de *C. edule*, descritos anteriormente. Num total de 848 *C. edule* dissecados (Tab.7. 2), 517 estavam infectados, sendo a prevalência total nas três estações de 59,19 %. A estação que apresenta a maior prevalência é a estação 1 com 79,72 %. Na estação 2 a prevalência é menor, sendo de 64,52% , havendo uma redução de mais de metade na estação 3B, 33,32% .

É na estação 1 que se encontra uma distribuição mais uniforme da infestação, sendo de assinalar o mês de Maio a que corresponde uma prevalência muito baixa que não ultrapassa os 40%. Aliás este valor mais baixo também se observa em Maio na estação 2, sendo o menor valor neste local conjuntamente com o mês de Novembro.

Na estação 3 também se verifica uma das menores prevalências do parasita em Maio (20%), tendo sido obtido o menor valor em Junho, não ultrapassando os 10%.

O valor da intensidade de infestação encontrada foi de 2,48.

H. quissetensis foi observado em infestação simples, em dupla com *M. minutus* ou *M. fossarum*, em tripla com *M. minutus* e *M. fossarum* ou *M. minutus* e *C. cerastodermæ* I ou *M. minutus* e *L. minimum* ou ainda com *M. fossarum* e *C. cerastodermæ* I ou quádrupla com *M. minutus*, *M. fossarum* e *L. minimum*. Esta espécie é uma constante em infestação simultânea, principalmente com *M. minutus*.

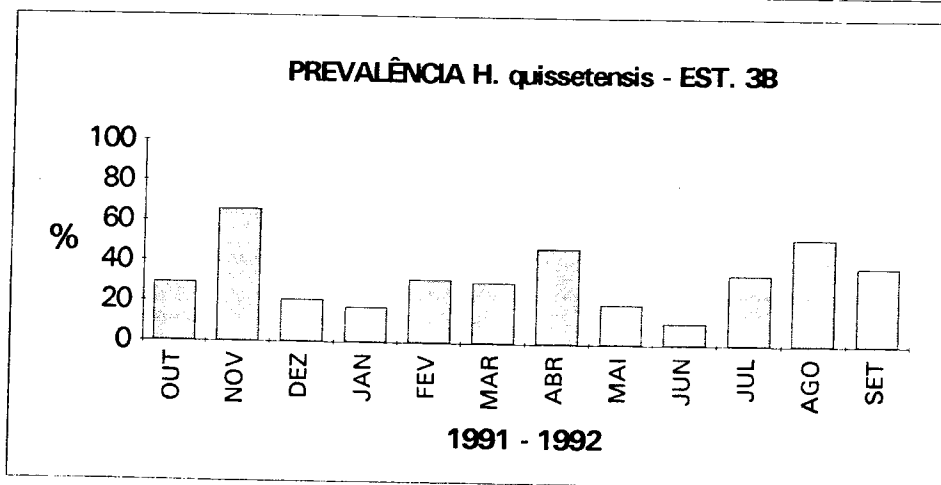
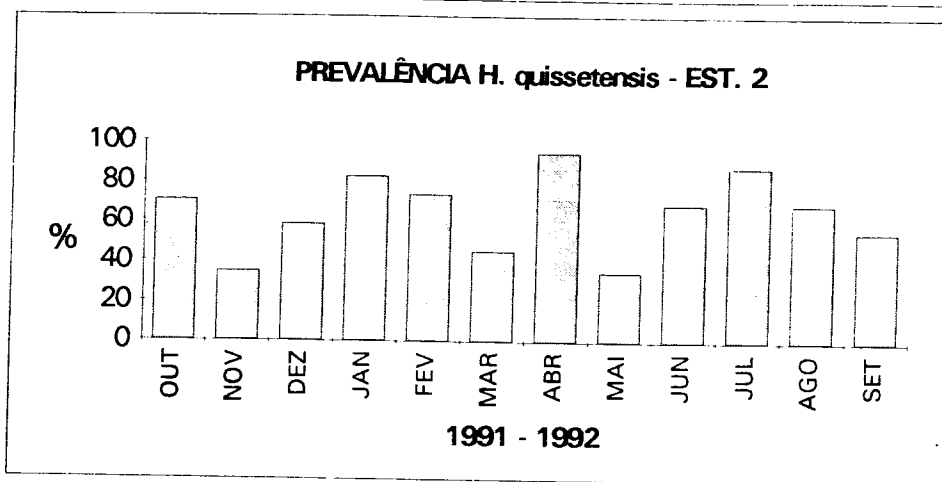
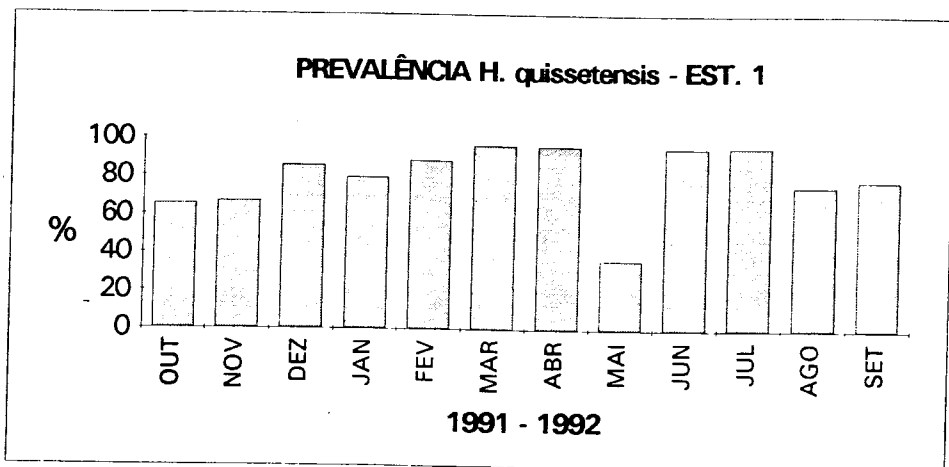


Fig.7.8 - Distribuição da prevalência de infestação de *H. quissetensis* em *C. edule*.

Prevalência da infestação de *C. cerastodermæ* I

Entre Maio de 1990 e Setembro de 1992, a distribuição da infestação de *C. edule* por *C. cerastodermæ* I, nas três estações da Ria de Aveiro, foi a que se pode observar na tabela 7. 6.

Durante o período entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992, a prevalência média nas três estações foi de 1,42% em 848 *C. edule* dissecados (Fig.7.9).

Na Ria de Aveiro a distribuição de infestação média mensal de *C. edule* por *C. cerastodermæ* I, entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992, está exemplificada na figura 7. 9.

Tabela 7. 6 - Distribuição da infestação de *C. edule* por *C. cerastodermæ* I

| Ano | Mês | Estação | Nº hosp. dissecados | Nº hosp. parasitados | Fase do ciclo |
|--------------|----------|----------|---------------------|----------------------|--|
| 1990 | Maio | Torreira | 4 | 1 | esporoquisto cercária metacercária |
| 1991 | Junho | 1 | 130 | 1 | |
| | Junho | 2 | 12 | 1 | |
| | Setembro | 2 | 13 | 1 | |
| 1991 | Outubro | 1 | 23 | 3 | |
| | Outubro | 2 | 27 | 2 | |
| | Outubro | 3B | 24 | 1 | |
| | Novembro | 2 | 23 | 1 | |
| | Novembro | 3B | 32 | 1 | |
| 1992 | Janeiro | 1 | 43 | 1 | |
| | Janeiro | 3B | 23 | 1 | |
| | Março | 1 | 26 | 1 | |
| | Agosto | 1 | 20 | 1 | |
| Total | | | 288 | 16 | |

Na globalidade das observações para n=848 hospedeiros (Tab.7. 2), na estação 1 a prevalência *C. cerastodermæ* I é de 1,71%, na estação 2 decresce para 1,24%

sendo a estação 3B a que apresenta prevalência mais baixa: 1,17%. Os mês de maior prevalência é o de Outubro, quer na estação 1 quer na 2.

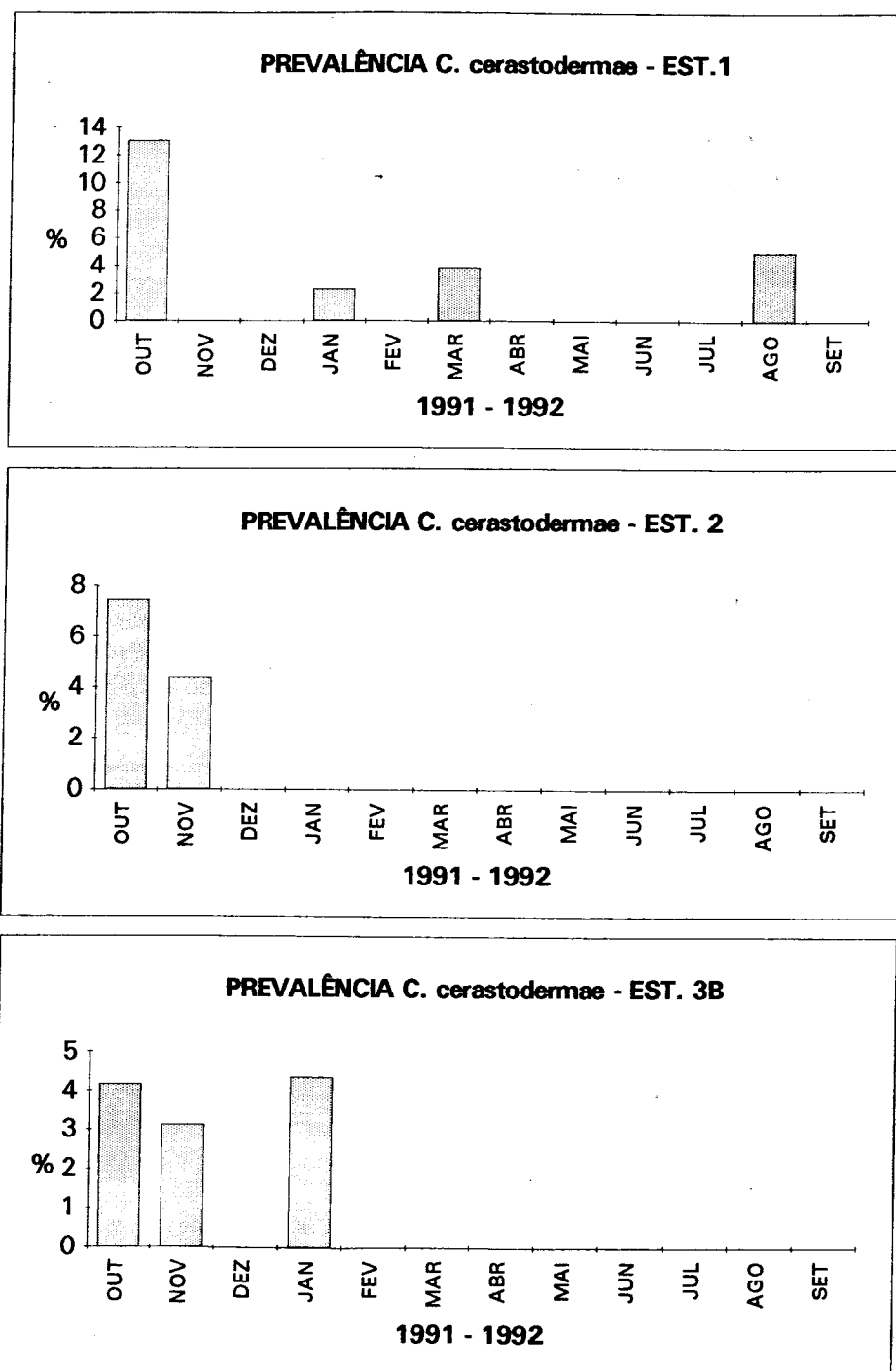


Fig.7.9 - Distribuição da prevalência de infestação de *C. edule* por *C. cerastodermæ* I.

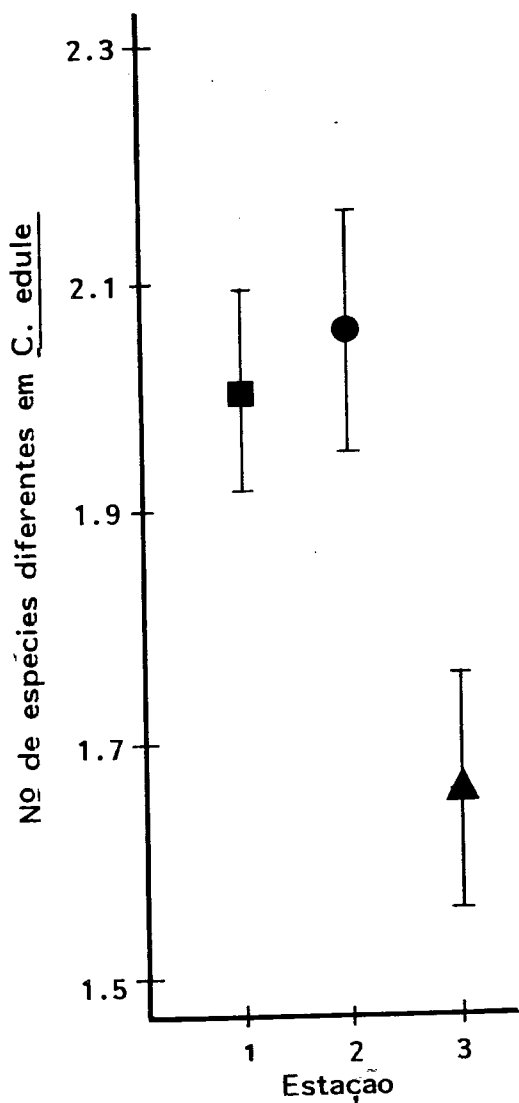


Fig. 7.10

- Estação 1
- Estação 2
- ▲ Estação 3B

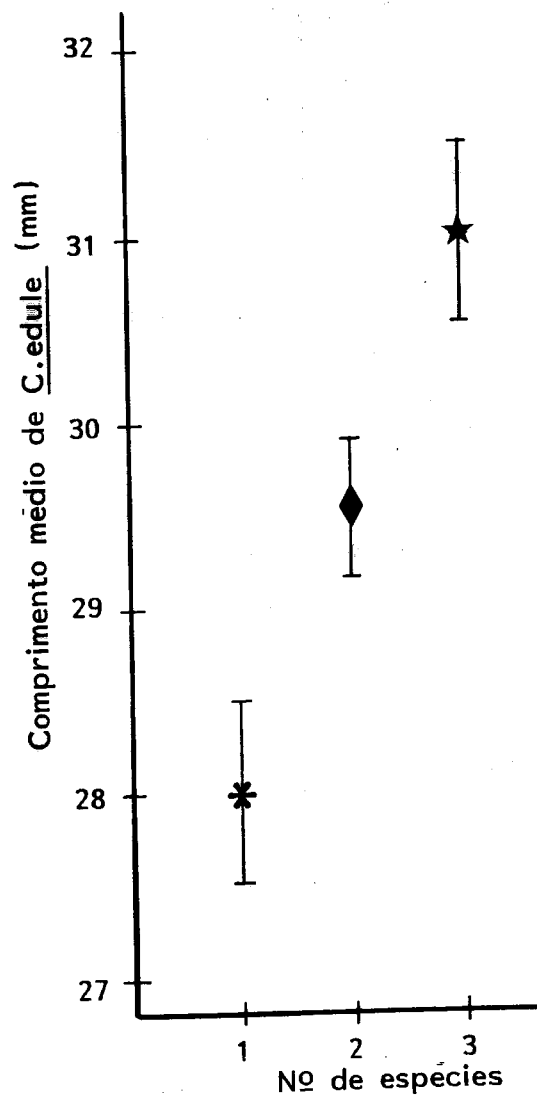


Fig. 7.11

- * Parasitado por 1 espécie de digêneo
- ♦ Por 2 espécies
- ★ Por 3 espécies

Fig. 7.10 - Distribuição da infestação de *C. edule* por espécies diferentes de digêneos nas estações 1, 2 e 3B.

Fig. 7.11 - Relação entre o número de espécies diferentes de digêneos que infestam *C. edule* e o comprimento do hospedeiro

C. edule encontra-se parasitado por um menor número de espécies diferentes de digéneos na estação 3B, enquanto que as condições nas estações 2 e 1 (Fig. 7.10) parecem aumentar a probabilidade de *C. edule* ser infestado por um número maior de espécies diferentes de digéneos ($1.66 \pm 0,05$, $n=256$; $2.06 \pm 0,05$, $n=242$; $2,01 \pm 0,05$, $n=350$; $P < 0,05$). Existe uma influência significativa da estação no número de espécies diferentes de parasitas que podem infestar *C. edule*.

A diferença encontrada entre o número de espécies infestantes nas estações 1 e 2 por um lado e na estação 3B por outro, está relacionada com o ciclo evolutivo do digéneo (Tab. 3. 2) e com a localização da estação (Fig. 2. 2).

Não foi observada durante este período (Out. 1991 a Set. 1992) a infestação simultânea (ou múltipla) de *C. edule* pelas 5 espécies de digéneos. O número máximo de parasitas foi 4, encontrados em 10 animais, nos meses de Novembro (est. 2 e 3B) Janeiro (est. 1) e Abril (est. 2). O número de parasitas, ocorrendo simultaneamente, foi 3 por mês e por estação ($n=216$) e envolve principalmente as espécies *M. minutus*, *M. fossarum*, *H. quissetensis* que aliás são as que apresentam a prevalência de infestação mais elevada. A infestação dupla foi observada em 376 *C. edule* e a simples em 210.

A infestação múltipla também está relacionada com o comprimento da concha (Fig. 7.11). Os bivalves com maior comprimento de concha são parasitados por maior número de espécies diferentes de digénea. Assim *C. edule* com um comprimento médio de $31,00 \pm 0,20$ apresenta uma tripla infestação, com $29,53 \pm 0,19$ dupla e com $28,00 \pm 0,29$ com infestação simples. Existe uma associação significativa ($P < 0,05$) entre o comprimento da concha e o número de espécies infestantes.

Na tabela 7.7 encontram-se resumidos os valores da prevalência obtidos, em 848 *C. edule* observados, infectados pelas sete espécies de Digenea estudados neste trabalho.

Tabela 7. 7 - Resumo dos valores de prevalência dos digêneos encontrados em *C. edule* proveniente da Ria de Aveiro

| Espécie | Prevalência | Est. 1 | Est. 2 | Est. 3 | Fases do ciclo |
|--------------------------|-------------|--------|--------|--------|-------------------|
| <i>M. minutus</i> | 88,71 | 82,52 | 93,83 | 89,73 | Metacercária |
| <i>M. fossarum</i> | 39,14 | 32,01 | 43,27 | 42,13 | Metacercária |
| <i>H. quissetensis</i> | 59,18 | 79,72 | 64,52 | 33,32 | Metacercária |
| <i>G. rebecqui</i> | 4,44 | - | - | - | Metacercária |
| <i>G. choledochus</i> | 2,43 | - | - | - | Esp. cer.(metac.) |
| <i>L. minimum</i> | 1,06 | 0,57 | 1,65 | 1,17 | Esp. cercária |
| <i>C. cerastodermæ</i> I | 1,43 | 1,71 | 1,24 | 1,17 | Esp. cer.(metac.) |

CAPÍTULO 8

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS CIRCULANTES
DO SISTEMA DE DEFESA INTERNO DE *C. EDULE*.
DIFERENTES TIPOS DE HEMÓCITOS ENVOLVIDOS
NA RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO POR SRBC.**

**HAEMOCYTES IN *CERASTODERMA EDULE* (MOLLUSCA, BIVALVIA):
DISTINCT CELL TYPES ENGAGE IN DIFFERENT RESPONSES TO SRBC**

Fernanda Russell-Pinto, Raquel Reimão* and Maria de Sousa*

Aquatic Zoology; * Molecular Pathology and Immunology, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Oporto. Largo Prof. Abel Salazar, 2. 4000 Porto, Portugal.

Abstract: Three types of circulating haemocytes were identified in the haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule* with light microscopy (LM), scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) and enzyme cytochemistry: Type I cells are large spreading haemocytes, with a ruffled surface, eccentric nucleus and distinct cytoplasmic organelles. These cells are esterase- and acid phosphatase- positive. Type II cells are spherical, with a smooth surface and central nucleus surrounded by a cytoplasm devoid of organelles. They are negative for esterase and acid phosphatase reactions. Type III cells, which have not been described before in molluscs, have a round shape, a small eccentric nucleus and a large vacuole filled with granular material (TEM) occupying the majority of the cytoplasm. These cells are peroxidase positive and morphologically resemble the serous cells of bivalves or the signet ring cells of urochordates.

The cellular response of *Cerastoderma edule* to the intracoelomic injection of sheep red blood cells (SRBC) is described. The cell types involved in E-rosette formation and phagocytosis were documented by LM, TEM and SEM. In light microscopy and ultrastructural analysis the E-rosette forming cell was identified as Type II cells. The Type I cells phagocytosed SRBC, autologous cells and remnants thereof. Red blood cells with disrupted membranes and different electron densities were observed not only inside but also in close vicinity of phagocytic cells, which may suggest that the cells produce a cytolytic factor. The function of Type III cells remain obscure.

I. INTRODUCTION

Cell-cell adhesion, cell binding of nonself materials and phagocytosis can be considered primordial expressions of the process of cellular recognition, with a known function in T cell activation in vertebrates (Weiss, 1989). Binding and phagocytosis of nonself particles constitute the earliest expressions of recognition documented in

invertebrates (Cooper, 1973; Yoshino, 1986; Furuta *et al* 1987; Van der Knaap & Meuleman, 1986; Ottaviani 1989; Pipe, 1990). Studies of the morphology of the cells involved in these recognition processes in molluscs have been done in gastropods (Yoshino, 1976; Cheng & Auld, 1977; Sminia *et al*, 1983; Morona *et al.*, 1984; Renwrantz *et al.*, 1985; Fisher, 1986; Furuta *et al.*, 1986; Sminia & Van der Knaap, 1986; Ottaviani & Franchini, 1988; Furuta *et al.*, 1990) and in bivalves (Ruddell, 1971; Foley & Cheng, 1975; Renwrantz *et al.*, 1979; Cheng *et al.*, 1980; Cheng, 1981; Pipe, 1990).

In the present study we present a characterization of the cell types observed in the haemolymph of *C. edule* (a bivalve mollusc of the Cardidae family) and we report the results of an analysis of the cellular response to intracoelomic injections of SRBC.

The characterization of the response of an invertebrate to foreign red blood cells could provide important clues to the definition of distinct primordial cell types possibly responsible for the reported production of mammalian-like cytokines in invertebrates (Beck and Habicht, 1991)).

II. MATERIALS AND METHODS

Cerastoderma edule (Bivalvia) specimens were collected from S. Jacinto Channel at the Aveiro estuary (Russell-Pinto, 1990). Experiments initiated after collection are designated throughout as 0 hours (room temperature, between 15 and 20°C).

Haemocyte collection

Haemolymph was obtained from freshly collected animals at room temperature (0 h) and from animals kept at 4°C during 24 h and 48 h.

The cockles were washed under running tap water and the valves were opened by making a small incision in the shell ligament and maintained open by light finger pressure under a stereo microscope. Haemolymph was collected by pericardial cavity puncture with sterile hypodermic needles (5/8") and 1 ml syringes, and transferred to an Eppendorf tube previously washed and filled with 100µl of 0,5% BSA in brackish water transported from collection sites, used as an isotonic solution. About 300 to 1000 µl of haemolymph were obtained per animal. The diluted haemolymph was shaken gently to prevent cell aggregation and kept on ice until used.

To evaluate the effect of refrigeration time on *C.edule* haemocyte concentration, the haemolymph was collected from fresh animals (0 h) and from animals after 48 h of cooling (4° C). Forty six animals were studied in each group. Determination of viable haemocyte concentrations was accomplished by counting viable cells assessed by trypan blue exclusion, in a Neubauer hemocytometer .

Cytospin smears were made using 100µl of haemolymph collected as described above for LM morphological and cytochemical studies. A Shandon 2 Cyto centrifuge (500 rpm, 5 min) was used.

Cytochemistry

Cytospin smears of haemolymph cells were air dried, and processed according to the following methods: α -naphthyl acetate esterase procedure (Sigma, St Louis, USA); naphthol AS-TR phosphate procedure for acid phosphatase after Barka and Anderson (1962); benzidine-peroxidase after Wachstein and Meisel (Pearse, 1972); Leishman stain (BDH, England) 0.15% in methanol. Control haemocyte preparations were incubated in solutions lacking the substrate in all the enzymatic determinations.

In vivo E-rosette formation and phagocytosis

Whole defibrinated sheep blood was washed in saline (NaCl 0.9%). SRBC suspensions were prepared from the pellet at several concentrations (2.5%, 5% and

10% v/v in PBS). SRBC injections into the pericardial cavity were carried out under a binocular microscope through a small aperture in the hinge region of the shell. Animals were injected with 100µl of 3 different SRBC concentrations (2.5%, 5% and 10%). Freshly collected animals (0 h) were studied at room temperature; animals studied at 24 and 48 hours were kept refrigerated at 4° C. A total of 78 injected animals and 37 uninjected controls were studied. The haemolymph/ erythrocyte suspension was collected from the pericardial cavity at 30 min. after injection of the SRBC as described above. The number of *in vivo* E-rosette (erythrocyte-rosette) forming cells per 100 haemocytes was determined using a hemocytometer; erythrocyte rosette formation was defined when 4 or more erythrocytes were seen attached to a haemocyte. The total volume of fluid removed and the cell concentration of the suspension were determined.

To characterize the morphology and percentage of the haemocytes involved in E-rosette formation and SRBC phagocytosis, cytopsin smears of 20 animals were made for light microscopy from suspensions processed 30 min after injection of SRBC into freshly collected animals (0 h at room temperature) and cockles kept for 24 and 48 h at 4° C. In each cytopsin preparation, 100 cells were studied in each of 78 microscopic fields (magnification 1000x). Cells were counted according to cell type, *in vivo* E-rosette formation and erythrophagocytosis. Noninjected groups in the same conditions of time/temperature were used as control.

Ultrastructural aspects of rosette formation and phagocytosis were studied with scanning and transmission electron microscopy.

Light microscopy (LM)

Haemocyte cytopsin smears were stained using a standard Hemacolor (Merck, Germany) method for light microscopy.

Data analysis

The significance of the differences observed between groups in response to the injection of SRBC was tested by one-way analysis of variance followed by a LSD test for multiple comparisons. Differences between cell concentrations and total cell numbers of *C. edule* at 0 h and after 48 h at 4^o C were tested by Student's-t test for independent samples.

Scanning electron microscopy (SEM)

Adherent cells and cytopsin smears were prepared for SEM. Three drops of haemolymph and one drop of a Chernin balanced salt solution (CBSS) (Chernin, 1963) were placed on previously cleaned, round cover glasses (18mm in diameter) and incubated in a moist chamber at 26^o C for 20 min (Morona *et al*, 1984) to let the haemocytes adhere. Cytopsin smears were made with 100µl of the cell suspension centrifuged for 5 min at 500 rpm. The adherent cells and cytopsin smears were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate (pH 7.4) for 1h at 4^o C and processed as described previously (Russell-Pinto, 1990).

Transmission electron microscopy (TEM)

In the samples obtained for TEM analysis, haemolymph was placed immediately in an Eppendorf tube containing a glutaraldehyde solution (0.35%) buffered with 0.1M sodium cacodylate (pH 7.4), for approximately 15-20 min. The prefixed cells were centrifuged at 1500 rpm for 10 min. and the resulting pellet was fixed for an additional 2 h at 4^o C in 2.5% glutaraldehyde buffered with 0.1M sodium cacodylate to pH 7.4. The cell pellet was cut into small pieces and washed for 2 h at 4^o C in the same buffer. After washing, the cells were postfixated for 1 to 2 h in 1% osmium tetroxide with cacodylate buffer at room temperature, dehydrated through graded ethanol solutions (50%-100%), transferred to propylene oxide and finally embedded in Epon. Semithin sections were cut with a glass knife for light microscopy

and stained with methylene blue-Azur II. Ultrathin sections were double stained with aqueous uranyl acetate followed by lead citrate. Micrographs were obtained under a JEOL JEM 100CXII transmission electron microscope operating at 60 KV.

III. RESULTS

Haemolymph cell types

Three major cell types were identified in the haemolymph, and were designated Type I, II, and III (Figs.1-5). The three cell types differed in average cell size and in nucleus to cytoplasm ratio (Nu/cy) (Table 1), in their ultrastructural morphology and cytochemical characteristics. On the basis of cell size and ultrastructure, Type I cells were further subdivided in Type Ia and Ib.

TABLE 1 - Morphological characterization of *Cerastoderma edule* haemocytes.

| Cell type | % Cell type | Cell diameter* | Nucleus diameter* | Nu/Cy ratio |
|-----------|-------------|----------------|-------------------|-------------|
| Ia | 27 | 26.5±7.0 | 12.2±3.0 | 0.46 |
| Ib | 37 | 15.0±3.6 | 8.3±3.8 | 0.55 |
| II | 22 | 6.5±1.9 | 4.5±1.4 | 0.69 |
| III | 14 | 12.7±3.7 | 3.3±0.9 | 0.26 |

* : Mean ±SD in μm

TYPE I cells (Table1): Type I cells constituted approximately 64% of the total number of haemocytes counted. These glass-adherent, spreading cells (Fig. 1) were characterized morphologically under SEM by a ruffled surface (Fig. 2) with large

(Type Ia, about 27% of the total population) or shorter pseudopodia (Type Ib, about 37% of the haemocytes). The average diameters of the Ia and Ib cells were 26.5 ± 7 and $15 \pm 3,6$ μm , respectively.

Under TEM all Type I cells had pseudopodia. The cells were characterized by an eccentric nucleus surrounded by an electron dense cytoplasm rich in organelles. These included a Golgi complex with secretory vesicles near to the cisternae, rough endoplasmic reticulum, free ribosomes, mitochondria with flat and shelf-like or tubular cristae, vesicles and lysosomes (Fig.3 and 5). Microtubular structures and centrioles were sometimes observed in the cytoplasm (Fig.5).

TYPE II cells: Type II cells constituted approximately 22% of the total number of haemocytes. Type II cells had an average diameter of 6.5 ± 1.9 μm and a nucleus to cytoplasm ratio of 0.69. Under SEM Type II cells had a smooth surface, presented no pseudopodia and maintained a spherical shape after deposition on the cover glass (Fig. 2). Under TEM Type II cells had a central nucleus characterized by heterochromatin masses bordering the nuclear membrane (Fig. 5) surrounded by a thin rim of cytoplasm with a fine granular matrix containing few ribosomes and few mitochondria.

TYPE III cells: Type III cells (Fig.4) were present at a lower percentage (14%) of the total number of cells; they had an average diameter of 12.7 ± 3.7 μm . They were round in shape with a very eccentric nucleus. They stood out clearly in the smears observed under LM because of the bright red or orange uniform colour in the cytoplasm in the Hemacolor or Leishman stained preparations. In the SEM, Type III cells had a smooth surface. TEM revealed a large vacuole filled by a granular material occupying the greater part of the cell pushing the nucleus to one extremity of the cell giving it a peculiar shape. These structures were surrounded by a thin rim of cytoplasm with a granular matrix where sparse small vesicles and few mitochondria can be seen (Fig. 4). Cytoplasmic and vacuolar contents show a similar electron density.

Cytochemistry

Nonspecific esterase and acid phosphatase activities were observed in Type I(a and b) haemocytes under light microscopy. Esterase activity was observed as black granules distributed throughout the cytoplasm more or less densely in the majority of Type I cells. Acid phosphatase activity was localized in a few Type I cells by a vivid red staining of cytoplasmic granules, which may represent lysosomes. Type III cells exhibited endogeneous peroxidase activity visualized by a green blue reaction product in the vacuole. Type II cells were negative for all three reactions. No staining reactions were seen in the negative control preparations (see Material and methods).

E-rosette formation, quantitative aspects

The capacity of *C. edule* haemocytes to form rosettes with sheep erythrocytes *in vivo* was tested in freshly drawn haemolymph samples in a hemocytometer. E-rosette formation was observed 30 min after injection with all SRBC concentrations tested.

The most consistent results were obtained with the 10% concentration. Within the 5% and 10% SRBC concentration group, where the majority of the animals showed rosette formation, the highest average number of E-rosette forming cells was seen in the animals tested at 0 h, the lowest number was found in animals that had been cooled for 48 h. In view of these results, only fresh animals that had received a suspension of 10% SRBC were used for the ultrastructural analysis of E-rosette formation.

Quantitative and qualitative assessment of the cellular response to SRBC

In all instances the most consistent results were observed with the 10 % SRBC concentration as follows:

Type I cells. Significant increases ($p < 0.05$, ANOVA) in the proportions of Type Ib cells were seen in the animals that had been injected with the 10% SRBC

relative to the uninjected controls at time 0, at 24 h and at 48 h. A concomitant decrease in Type Ia cells was observed, at all times studied (Table 2).

TABLE 2 - Changes in the percentages of Type I, Type II and Type III cells in response to the injection of SRBC (10%).

| Cell type | Time | Control(%) | Injected(%) | p* |
|-----------|------|------------|-------------|-------|
| TYPE Ia | 0h | 26.7±5.5# | 16.4±4.6 | <0.05 |
| | | n=12 | n=8 | |
| | 24h | 32.6±5.7 | 25.2±2.2 | <0.05 |
| | | n=12 | n=5 | |
| | 48h | 34.6±5.4 | 22.6±2.9 | <0.05 |
| | | n=12 | n=6 | |
| TYPE Ib | 0h | 37.4±5.9 | 43.6±5.2 | <0.05 |
| | | n=12 | n=8 | |
| | 24h | 33.7±4.7 | 41.0±1.9 | <0.05 |
| | | n=12 | n=5 | |
| | 48h | 32.7±5.3 | 44.0±3.1 | <0.05 |
| | | n=12 | n=6 | |
| TYPE II | 0h | 21.6±3.9 | 33.5±6.3 | <0.05 |
| | | n=12 | n=8 | |
| | 24h | 15.8±3.5 | 19.4±2.6 | <0.05 |
| | | n=12 | n=5 | |
| | 48h | 18.3±7.1 | 20.5±2.7 | ns |
| | | n=12 | n=6 | |
| TYPE III | 0h | 13.9±4.0 | 5.5±3.3 | <0.05 |
| | | n=12 | n=8 | |
| | 24h | 17.9±4.1 | 14.4±2.3 | ns |
| | | n=12 | n=5 | |
| | 48h | 13.8±5.4 | 12.6±2.3 | ns |
| | | n=12 | n=6 | |

p* : comparison between control and injected animals

: mean ± SD

Type II cells. Significant increases in the proportions of Type II cells were also seen in freshly collected animals in response to the 10 % SRBC injection and in animals kept at 4° C for 24 h. No significant differences were observed at 48 h (Table 2).

Type III cells. A statistically significant decrease in Type III cells was observed in injected animals, at time 0.

TABLE 3 - Influence of time, temperature and SRBC concentration on erythro-phagocytosis and E-rosette formation.

| Process analysed | SRBC | 0h* | 24h | p ₁ | 48h | p ₂ |
|---------------------|------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Erythrophagocytosis | 2.5% | 6.9±2.2 n=8 | 4.8±1.5 n=8 | ns | 5.3±1.6 n=8 | ns |
| | 5% | 17.1±3.9 n=10 | 2.8±0.7 n=8 | <0.05 | 5.3±1.0 n=8 | <0.05 |
| | 10% | 13.3±3.1 n=8 | 7.4±1.1 n=5 | <0.05 | 8.2±1.5 n=6 | <0.05 |
| E-rosette formation | 2.5% | 1.0±0.5 n=8 | 1.3±0.4 n=8 | ns | 0 n=8 | <0.05 |
| | 5% | 2.9±1.9 n=10 | 1.3±0.4 n=8 | <0.05 | 1.3±0.4 n=8 | <0.05 |
| | 10% | 6.6±4.2 n=8 | 0 n=5 | <0.05 | 1.2±0.4 n=6 | <0.05 |

* : 0h indicates group of freshly collected animals; animals analysed at 24h and 48h were kept at 4° (mean % ± SD).

p₁ : comparison of results between 24h and 0h.

p₂ : comparison of results between 48h and 0h.

Erythrophagocytosis. Erythrophagocytosis was observed almost exclusively in Type Ib cells (Figs. 6, 9). Significantly lower percentages of erythro-phagocytosing cells were seen in the animals left for 24 and 48 h at 4° C than in the freshly collected

animals injected with the 5 % and 10 % SRBC solutions (Table 3). No significant differences were noted with the 2.5% concentration.

E-rosette forming cells. Binding of sheep erythrocytes to the cell surface was seen in type II cells (Figs. 2, 5, 7), i. e. cells that had the morphological characteristics described earlier and that were not seen to phagocytose. E- rosette formation was seen almost exclusively in response to the 5 % and 10 % concentration in freshly collected animals in percentages always statistically significantly higher than those seen in the samples from the animals kept at 4^o C for 24 h or 48 h (Table 3).

In cytopsin preparations, in addition to phagocytosis of SRBC, phagocytosis of autologous cells was observed. Type I cells were seen to engulf Type II or Type III cells. This autophagocytosis seemed to peak to about 16% of Type I cells after the animals had been refrigerated at 4°C for 24 h, and decreased to around 8% after 48 h. Autophagocytosis of isolated nuclei of damaged cells was also noted.

Electron microscopy (EM)

Type I haemocytes were frequently in close contact with or contained several sheep erythrocytes (Fig. 6, 8 and 9). The engulfed red blood cells were mostly located next to the nucleus, deforming it (Fig. 9). Each SRBC within the cytoplasm was surrounded by a membrane, constituting a primary phagosome. The same haemocyte may internalize one or more sheep erythrocytes. SRBC with distinct electron densities were observed within and in the vicinity of phagocytic cells (Fig. 8).

Binding of SRBC to form E-rosettes with Type II haemocytes as observed in LM (Fig. 7a) was confirmed by EM (Figs. 7, 10). No other cell type seemed to be involved exclusively in E-rosette formation.

Effect of refrigeration time on *C. edule* haemocyte concentration

The effect of refrigeration time on haemocyte concentration, haemolymph volume, and total cell numbers was evaluated. A decrease in cell concentration was

observed from $1.72 \pm 0.69 \times 10^6/\text{ml}$ at 0 h (room temperature) to $1.42 \pm 0.53 \times 10^6/\text{ml}$ at 48 h (4°C). This decrease occurred with a concomitant decrease in total cell numbers from $1.50 \pm 0.72 \times 10^6$ at 0 h to $1.08 \pm 0.44 \times 10^6$ at 48 h. These differences were statistically significant ($P < 0.01$, Student's t-test for independent samples). No statistically significant variations were seen between the volume of haemolymph from freshly collected animals ($842.9 \pm 218.7 \mu\text{l}$) and those kept at 4°C for 48 h ($781.9 \pm 210.4 \mu\text{l}$).

LEGENDS

- Fig. 1 - Type Ia haemocyte of *Cerastoderma edule* seen under SEM as a large spreading cell.
Bar = 5 μ m
- Fig. 2 - The two major cell types found in *C. edule* haemolymph under SEM. Type Ib haemocyte, large, with a ruffled surface (I) and Type II cell, small, spherical with a smooth surface (II) are seen. Bar = 1 μ m
- Fig. 3 - Transmission electron micrograph of *C. edule* Type I haemocyte where diversity of cytoplasmic organelles can be observed. Bar = 1 μ m
- Fig. 4 - Type III haemocytes of *C. edule* observed under TEM, showing a single large vacuole (vc) containing granular material. The nucleus displaced by the vacuole to the cell periphery shows a characteristic crescent shape. Bar = 1 μ m
- Fig. 5 - Transmission electron micrograph of Type I and Type II haemocytes of *C. edule* (I and II), in which their differences in cytoplasmic organelles and density and nucleus to cytoplasm ratio are evident. An important microtubular arrangement (mt) stands out in the cytoplasm of Type I haemocytes. Bar = 1 μ m
- Fig. 6 - Phagocytosis of sheep red blood cells by Type I haemocytes seen under LM(a) and SEM. Bar = 2 μ m.
- Fig. 7 - Rosette formation by Type II haemocytes under LM (a) and SEM. Bar = 1 μ m
- Fig. 8 - SRBC in the vicinity of Type I haemocytes, showing different electron densities. Lysis of the erythrocyte membrane with release of the haemoglobin can be seen (arrow).
Bar = 1 μ m
- Fig. 9 - Transmission electron micrograph of *C. edule* Type I haemocytes fixed 30 min. after SRBC injection. Several erythrocytes have been phagocytosed by the cells. Bar = 1 μ m
- Fig. 10 - Transmission electron micrograph of *C. edule* Type II haemocytes fixed 30 min. after SRBC injection. SRBC can be seen surrounding the cell forming a rosette-like structure. Bar = 1 μ m

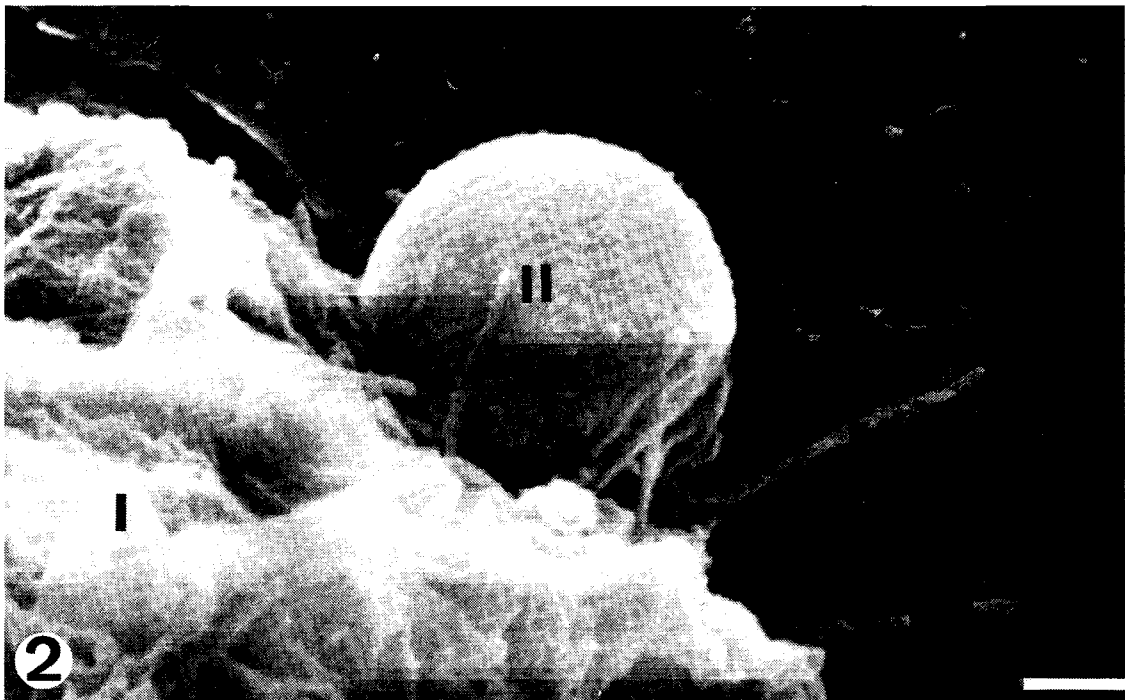
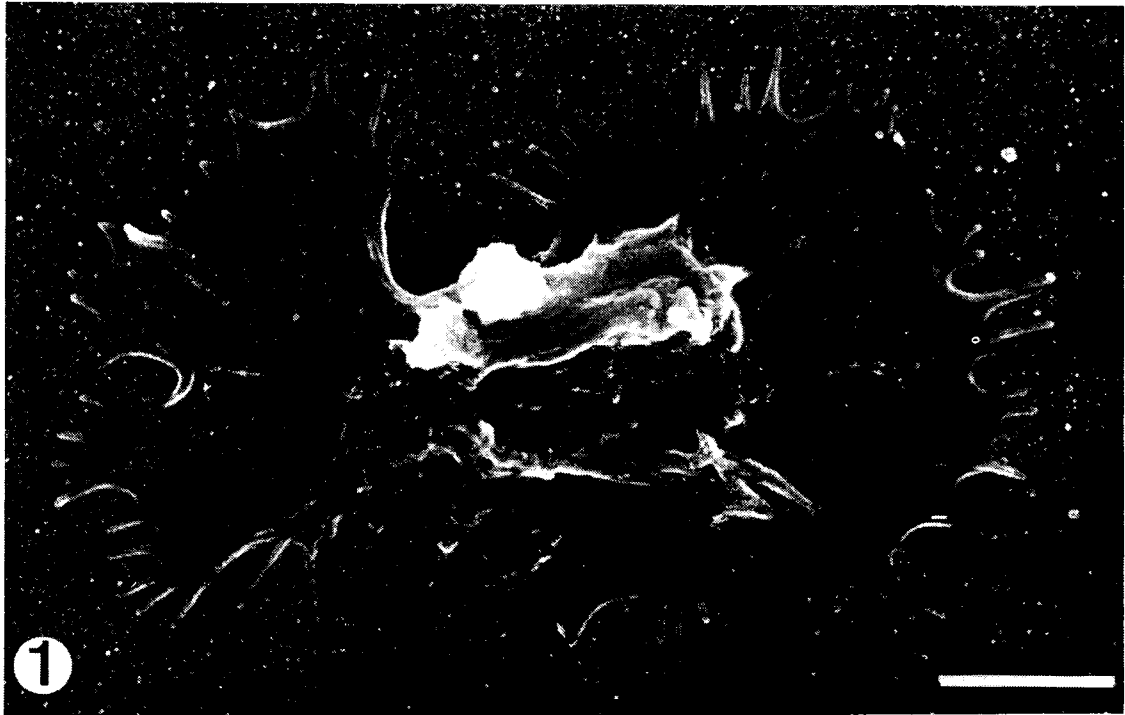


Fig. 8. 1

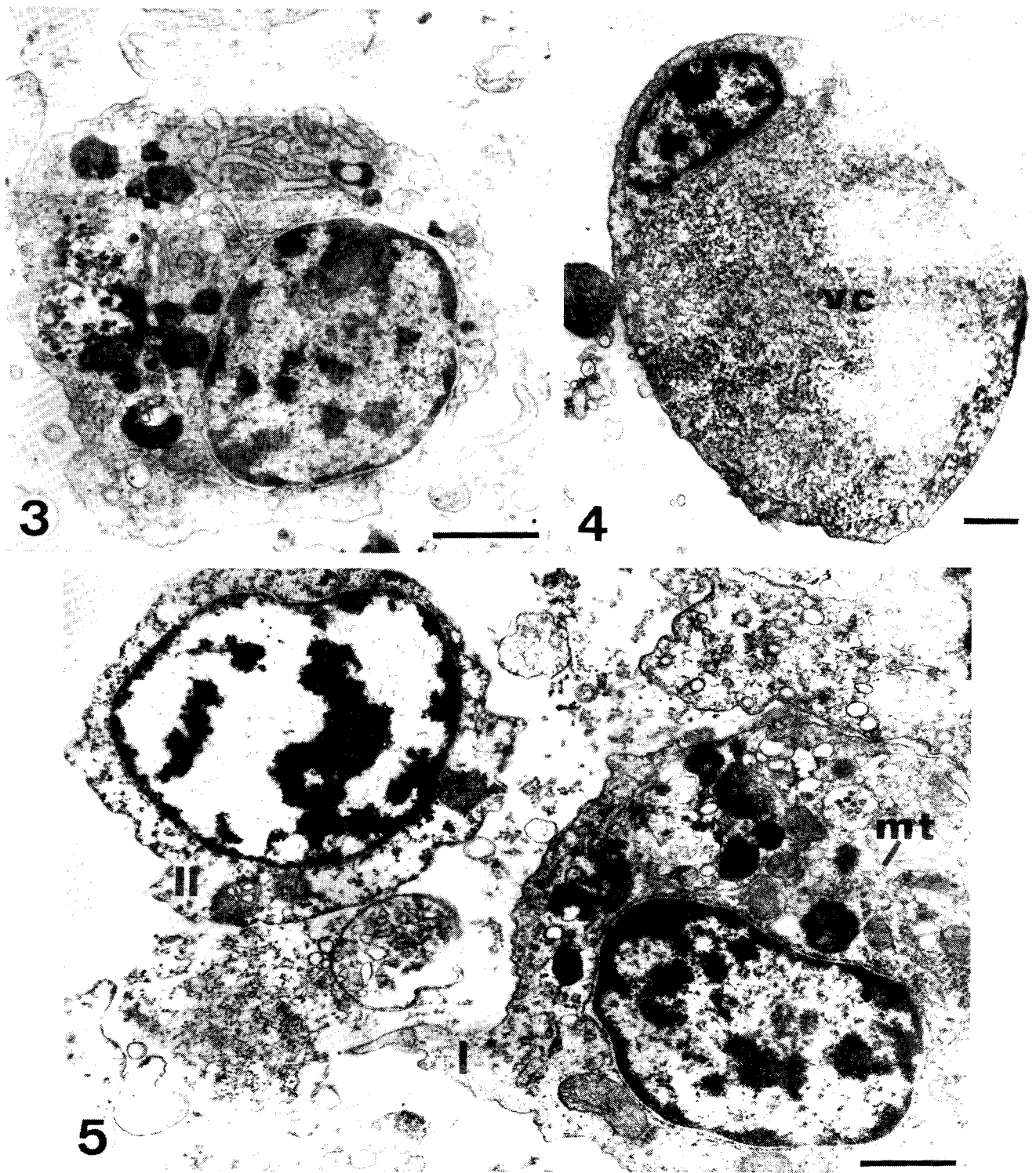


Fig. 8. 2

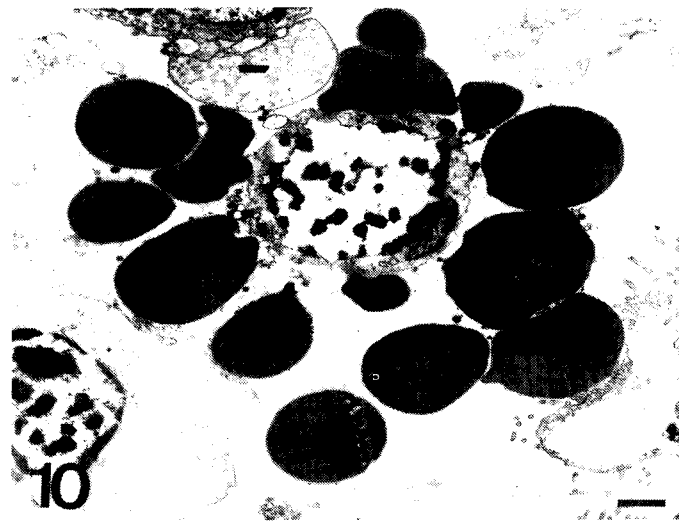
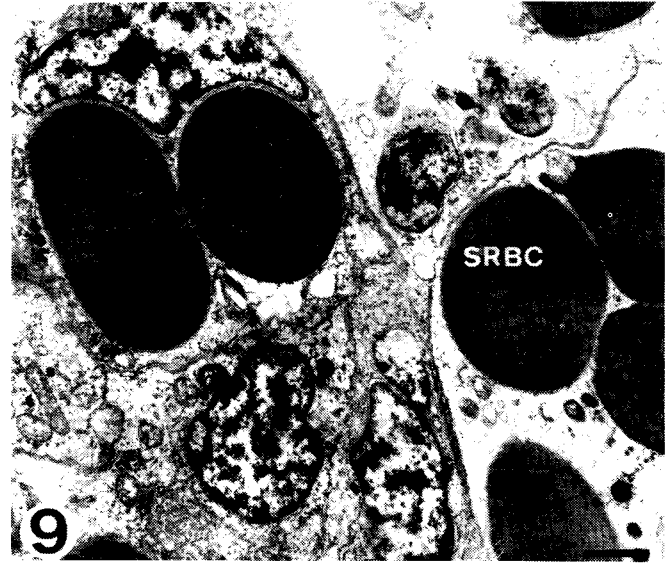
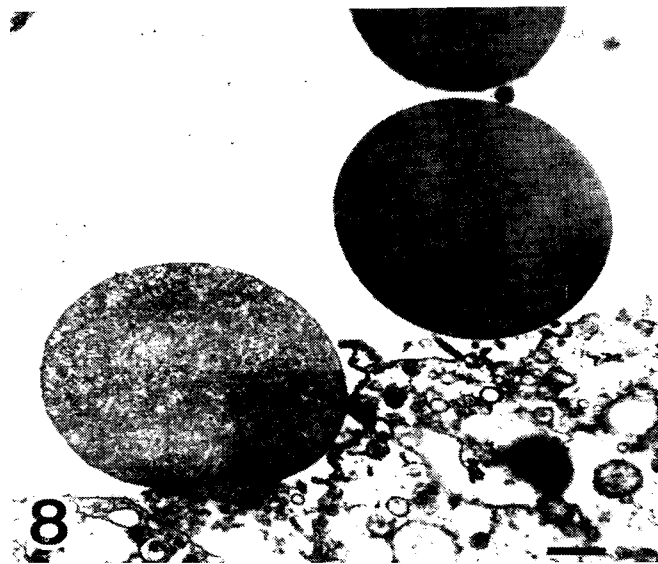
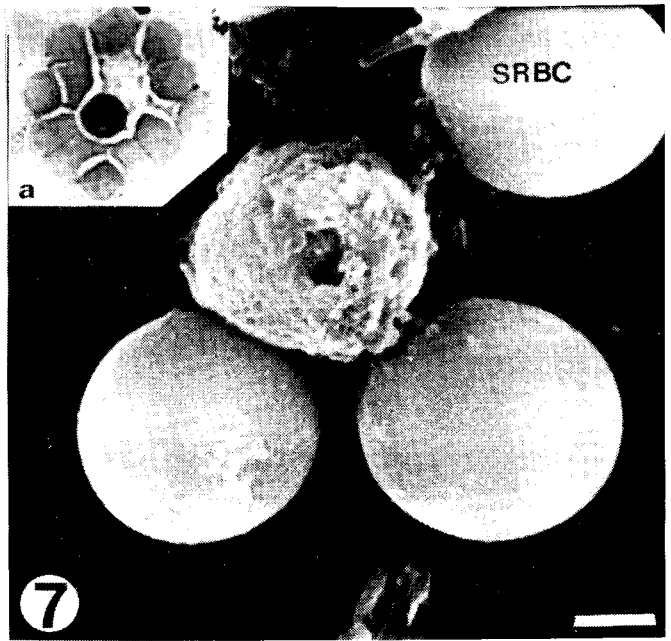
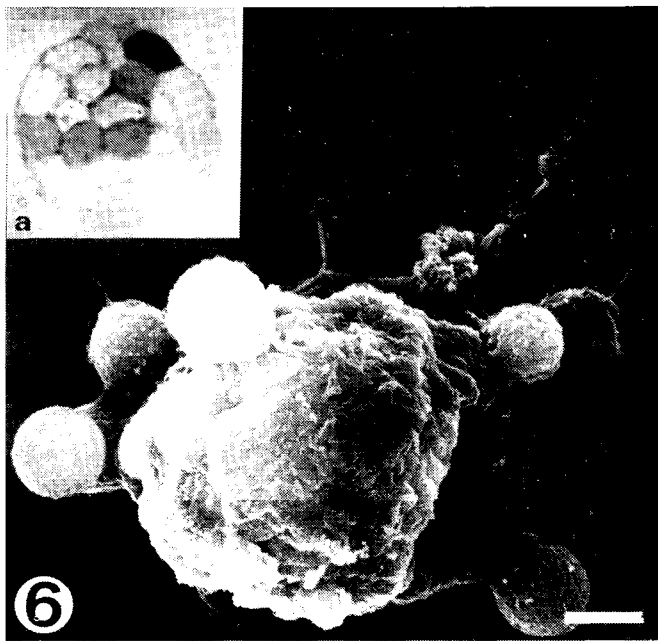


Fig. 8. 3

IV. DISCUSSION

Light microscopy, scanning and transmission electron microscopy showed the presence of three cell types in the haemolymph of *Cerastoderma edule*.

Large, spreading cells could be subdivided into two types on the basis of LM and SEM: Type Ia cells are larger, have a more ruffled surface and more pseudopodia than Type Ib. However, both subtypes behave similarly in erythrophagocytosis and both have non-specific esterase and acid phosphatase activity. Type II cells are small, round cells with a smooth surface and are clearly a different cell type. Type III cells again can clearly be distinguished from Types I and II on the basis of their LM morphology, ultrastructure and cytochemical characteristics.

Type I haemocytes show many points of resemblance with previously described cells such as cells with monocyte or macrophage-like characteristics in lymnaeid snails (Van der Knaap & Meuleman, 1986), the granulocytes of bivalves (Cheng, 1981), of *Crassostrea virginica* (Cheng & Downs, 1988) and of *Biomphalaria glabrata* (Morona *et al.*, 1984), the spreading haemocytes or phagocytes in *Incilaria fruhstorferi* (Furuta *et al.*, 1986; 1987), the round and spreading cell forms in *Planorbarius corneus* (Ottaviani & Franchini, 1988).

The Type II cells of *C. edule* have a smooth surface, no lysosome-like structures or other cytoplasmic organelles characteristic of phagocytic cells. They do not seem to be secretory cells since they contain little rough endoplasmic reticulum, and lack Golgi and secretion vesicles. In their high nucleus to cytoplasm ratio they resemble round haemocytes of *P. corneus* (Ottaviani & Franchini, 1988) hyalinocytes of bivalves (Cheng, 1981) and of *B. glabrata* (Morona *et al.*, 1984) lymphocyte-like cells of *I. fruhstorferi* (Furuta *et al.*, 1986).

The Type III cells as found in *C. edule* have not been described before. They are spherical or discoid shaped with a smooth surface and eccentric nucleus, pushed against the cell membrane and a large striking vacuole occupying almost all the

cytoplasm of the cell. Their morphology is reminiscent of signet ring cells of urochordates (Wright, 1981). Their bright orange cytoplasm when observed under LM could give them a similarity to a pigmented serous cell described by Cheng (1981) in bivalves who attributed to these cells an excretory function of foreign material. The role of these cells in *C. edule* haemolymph remains to be elucidated.

The present results demonstrate, however, that *C. edule* can manifest two types of response after an intracoelomic injection of SRBC: E-rosette formation and phagocytosis. These observations are in agreement with previous findings in *Lumbricus terrestris* (Cooper, 1973) *C. virginica* (Alvarez & Friedl, 1990; Hinsch & Hunte, 1990) and in *I. fruhstorferi* and *I. bilineata* (Furuta *et al.*, 1987; 1990). The exact type of cell involved in E-rosette formation could not be defined in the hemocytometer chamber. Light microscopic analysis of the cyospin smears and the electron micrographs permitted identification of the rosette forming cells as Type II haemocytes. Unlike type I cells that were seen to bind and to phagocytose red blood cells and autologous dying cells, type II cells were never seen to engage in phagocytosis. The majority of haemocytes in *C. edule* are Type I cells, spreading haemocytes containing lysosomal enzymes such as esterase and acid phosphatase. Type I cells are phagocytic cells capable of ingesting autologous and non-self cells. Since our experiments were performed in vivo not only surface-bound lectins (Pipe, 1990; Sminia & Van der Knaap, 1986; Renwrautz *et al.*, 1985; Yang & Yoshino, 1990) but also plasma opsonins (Sminia & Van der Knaap, 1986; Cheng & Downs, 1988; Yang & Yoshino, 1990) may have contributed to the phagocytosis of effete autologous cells and of SRBC.

Enzymatic or non-enzymatic factors synthesized by haemocytes are thought to be involved in the killing of cell targets before or after they have been internalized (Sminia & Van der Knaap, 1987). The present observation of red blood cells with different electron densities inside and close to phagocytic cells may represent different phases of a hemolytic process, initiated by host factors that are now known to include

cytokine-like molecules (Beck *et al.*, 1989; Beck and Habicht, 1991). In the bivalves *M. edulis* (Leippe & Renwranz, 1985; Wittke & Renwranz, 1984) and *C. fluminea* (Yoshino, 1988) this extracellular process of lysis of erythrocytes has been described.

The morphological characterization of two cell types engaged in different types of cellular recognition, i.e. adhesion and phagocytosis or adhesion only, with macrophage-like or "lymphocyte-like" characteristics, can no longer be ignored. A considerable body of evidence is accumulating indicating that invertebrate cells can produce interleukin-1 and possibly Il-2 like cytokines (Beck and Habicht, 1991; Beck *et al.*, 1989).

Faced with nonself, invertebrate organisms may mobilize different cells to give different responses.

Aknowledgements: The authors would like to thank Profs. W. P. W. van der Knaap and K. Soderhäll for critically discussing the results and helping in the final preparation of the manuscript. This work was partially supported by Junta Nacional de Investigaçào Científica e Tecnológica under research contract 87203/Mar.

REFERENCES

- Alvarez, M. & Friedl, F. (1990) Factor affecting in vitro phagocytosis by hemocytes of the American oyster. In: *Pathology in Marine Science*. (T. C. Cheng & F. O. Perkins, eds) pp. 501-511. London & New York: Academic Press.
- Barka, T. C. & Anderson, P. J. (1962) Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **10**, 741-753.
- Beck, G. & Habicht, G. S. (1989) Primitive cytokines: harbingers of vertebrate defense. *Immunology Today*. **12**, 180-183.

- Beck, G.; O'Brien, R. F. & Habicht, G. S. (1991) Invertebrate cytokines: the phylogenetic emergency of interleukin-1. *BioEssays* **12**, 62-67.
- Cheng, T. C. (1981). Bivalves in *Invertebrate Blood Cells*.(N. A. Ratcliff & A. F. Rowley, eds) pp. 233-330. London: Academic Press.
- Cheng, T. C. & Auld, K. R. (1977). Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology* **30**, 119-122.
- Cheng, T. C. & Downs, J. C. U. (1988) Intracellular acidphosphatase and lysosomal levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* **52**, 163-167.
- Cheng, T.C.; Huang, J. W.; Karadogan, H.; Renwranz, L. R. & Yoshino, T. P. (1980) Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *Journal of Invertebrate Pathology* **36**, 35-40.
- Chernin, E. (1963) Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus*. *Journal of Parasitology* **49**, 353- 364.
- Cooper, E. L. (1973). Evolution of cellular immunity. In: *Non specific Factors Influencing Host Resistance* (W. W. Braun, N.J. Brunswick, & J. Ungar, eds). pp.11-23. Basel: S. Karger.
- Fisher, W. S. (1986) Structure and function of oyster hemocytes. In: *Immunity in Invertebrates* (M., Brehélin, ed.) pp. 25-35. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Foley, D. A. & Cheng, T.C. (1975) A quantitative study of phagocytosis by haemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* **25**, 189-197.
- Furuta, E.; Yamaguchi, K. & Shimosawa, A. (1986) The ultrastructure of the haemolymph cells of the land slug *Incilaria fruhstorferi* Collinge (Gastropa: Pulmonata). *Anatomischer Anzeiger* **162**, 215-224.

- Furuta, E.; Yamaguchi, K.; Aikawa, M. & Shimozawa, A. (1987). Phagocytosis by haemolymph cells of the land slug, *Incilaria fruhstorferi* Collinge (Gastropoda: Pulmonata). *Anatomischer Anzeiger* **163**, 89-99.
- Furuta, E.; Yamaguchi, K. & Shimozawa, A. (1990) Haemolymph cells and platelet-like structures of the land slug, *Incilaria bilineata* (Gastropoda: Pulmonata). *Anatomischer Anzeiger* **170**, 99-109.
- Hirsch, G. & Hunte, M. (1990) Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the American oyster. In: *Pathology in Marine Science* (T. C. Cheng & F. O. Perkins, eds) pp. 479-488. London & New York: Academic Press.
- Leippe, M. & Renwranz, L. R. (1985) On the capability of bivalve and gastropod haemocytes to secrete cytotoxic molecules. *Journal of Invertebrate Pathology* **46**, 209-210.
- Morona, D.; Jourdane, J. & Aeschlimann, A. (1984) Étude de l'évolution, in vitro, des granulocytes de l'haemolymph de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **59**, 467-475.
- Ottaviani, E. (1989). Selected decrease of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) after bacteria injection. *Experientia* **45**, 368-369.
- Ottaviani, E. & Franchini, A. (1988) Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). *Acta Zoologica* **69**, 157-162.
- Pearse, A. G. E. (1972) *Histochemistry theoretical and applied* (Vol. 2). Churchill Livingstone. Edinburgh, London.
- Pipe, R. K. (1990) Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research* **261**, 261-268.
- Ratcliffe, N. A.; Rowley, A. F.; Fitzgerald, S. W. & Rhodes, C. P. (1985) Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology* **97**, 183-350.

- Renwrantz, L. R.; Yoshino, T. P. & Cheng, T. C. (1979) Size determination of leucocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* and description of phagocytosis mechanism. *Zoologische Jahrbnecher Ableitung Fuer Physiologie und Zoomorphologie* **83**, 1-12.
- Renwrantz, L.R.; Daniels, J. & Hansen P. D. (1985) Lectin-binding to haemocytes of *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology* **9**, 203-210.
- Ruddell, C. L. (1971) The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* **18**, 269-275.
- Russell - Pinto, F. (1990) Differences in infestation intensity and prevalence of hinge and mantle margin *Miogymnophallus minutus* metacercariae (Gymnophallidae) in *Cerastoderma edule* (Bivalvia): possible species coexistence in Ria de Aveiro. *Journal of Parasitology* **76**, 653-659.
- Sminia, T. & Van der Knaap, W. P. W. (1986) Immunorecognition in invertebrates with special reference to molluscs. In: *Immunity in invertebrates* (M. Brehélin, ed.) pp. 112-124. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Sminia, T. & van der Knaap, W. P. W. (1987) Cells and molecules in molluscan Immunology. *Developmental and Comparative Immunology* **11**, 17-28.
- Sminia, T., Van der Knaap, W. P. W. & Van Asselt, L. A. (1983) Blood cell types and blood cell formation in gastropod molluscs. *Developmental and Comparative Immunology* **7**, 665-668.
- Van der Knaap, W. P. W. & Meuleman, E. A. (1986) Interaction between the immune system of lymnaeid snails and trematode parasites. In: *Immune mechanisms in invertebrate vectors*. (A. M. Lackie, ed.) pp. 179-198. Oxford: Oxford University Press.
- Van der Knaap, W. P. W.; Sminia, T.; Schutte, R. & Barendsen, L. H. (1983). Cytophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes: in vitro phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis*. *Immunology* **48**, 377-383.

- Vasta, G. R.; Cheng, T.C. & Marchalonis, J. J. (1984) A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cellular Immunology* **88**, 475-488.
- Weiss, A. (1989). T Lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology* (W. Paul, eds) pp. 359-384. New York: Raven Press Ltd.
- Wittke, M. & Renwranz, L.R. (1984) Quantification of cytotoxic hemocyte of *Mytilus edulis* using a cytotoxic assay in agar. *Journal of Invertebrate Pathology* **43**, 248-253.
- Wright, R. K. (1981) Urochordates. In: *Invertebrate blood cells*. (N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley, eds) pp. 565-626 London, New York, Toronto, Sidney, San Francisco: Academic Press.
- Yang, R. & Yoshino, T. P. (1990) Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea* I. Electrophoretic and immunologic analyses of opsonic plasma components. *Developmental and Comparative Immunology* **14**, 385-395.
- Yoshino, T. P. (1976) The ultrastructure of circulating hemolymph cells of the marine snail *Cerithidea californica* (Gastropoda : Prosobranchia). *Journal of Morphology* **150**, 485-494.
- Yoshino, T. P. (1986). Surface membrane components of circulating invertebrate blood cells and their role in internal defense In: *Immunity in invertebrates* (M. Brehélin, ed) pp. 12-21. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Yoshino, T. P. (1988) Phospholipase C-like activity in phagocytic cells of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, and its possible role in cell-mediated cytolytic reactions. *Journal of Invertebrate Pathology* **51**, 32-40.

CAPÍTULO 9

SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE *C. EDULE* NA PRESENÇA DE PARASITAS E/OU EM RESPOSTA AO "STRESS" PELO FRIO.

SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE *C. EDULE* NA PRESENÇA DE PARASITAS E/OU EM RESPOSTA AO "STRESS" PELO FRIO.

A distribuição de *C. edule* (n=482) em que foi feita a análise seriada do número e tipos de células da hemolinfa, entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992, em animais provenientes das estações 1, 2 e 3 B da Ria de Aveiro, está referenciada na tabela 9.1.

Tabela 9.1: Número de *C. edule* em que foram efectuadas contagens de células num estudo longitudinal entre Out./91 e Set./92

| | OUT. | NOV. | DEZ. | JAN. | FEV. | MAR. | ABR. | MAI. | JUN. | JUL. | AGO. | SET. | TOTAL |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| EST 1 | 16 | 17 | 21 | 28 | 22 | 22 | 19 | 26 | 12 | 22 | 18 | 15 | 238 |
| EST 2 | 8 | 7 | 10 | 11 | 10 | 11 | 10 | 11 | 9 | 11 | 9 | 13 | 120 |
| EST 3B | 6 | 15 | 11 | 11 | 7 | 9 | 9 | 8 | 12 | 11 | 11 | 14 | 124 |
| número total de <i>C. edule</i> estudados | | | | | | | | | | | | | 482 |

9.1 - Concentração de hemócitos em *C. edule* não parasitado e parasitado

Influência da presença de diferentes espécies de digéneos: A concentração média de hemócitos encontrada em *C. edule* não parasitado foi de $(2,72 \pm 0,38 \times 10^6$ céls/ml, n=34).

Na presença de um ou mais parasitas diferentes (Fig. 9. 1), constatámos que em animais infectados por uma só espécie a concentração celular era de $2,53 \pm 0,20 \times 10^6$ céls/ml (n=122), por duas espécies desce para $2,16 \pm 0,16 \times 10^6$ céls/ ml (n=205). A concentração mais baixa ($1,79 \pm 0,20 \times 10^6$ céls/ ml, n = 121) foi, no entanto, observada em *C. edule* infectado por três espécies .

A infecção múltipla ocorreu assim, em animais com números de hemócitos significativamente menores do que os observados em hospedeiros não parasitados ou com infecção simples ($P < 0,05$, Fig. 9.1).

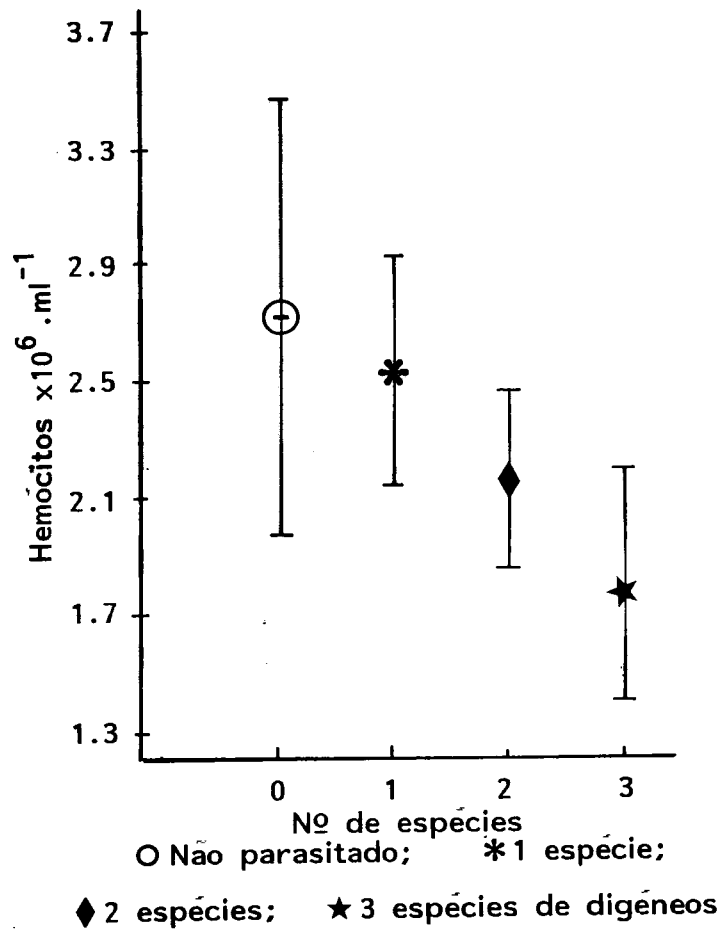


Fig. 9.1 - Variação da concentração celular de *C. edule* quando não parasitado ou parasitado por uma, duas ou três espécies de digêneos; Intervalos de confiança a 95% para a média.

Influência do mês e da estação de colheita : Na figura 9.2 estão representadas as médias da concentração de hemócitos de *C. edule* colhidos nas três estações, entre Outubro (Out.) de 1991 e Setembro (Set.) de 1992 (Tab. 9.1).

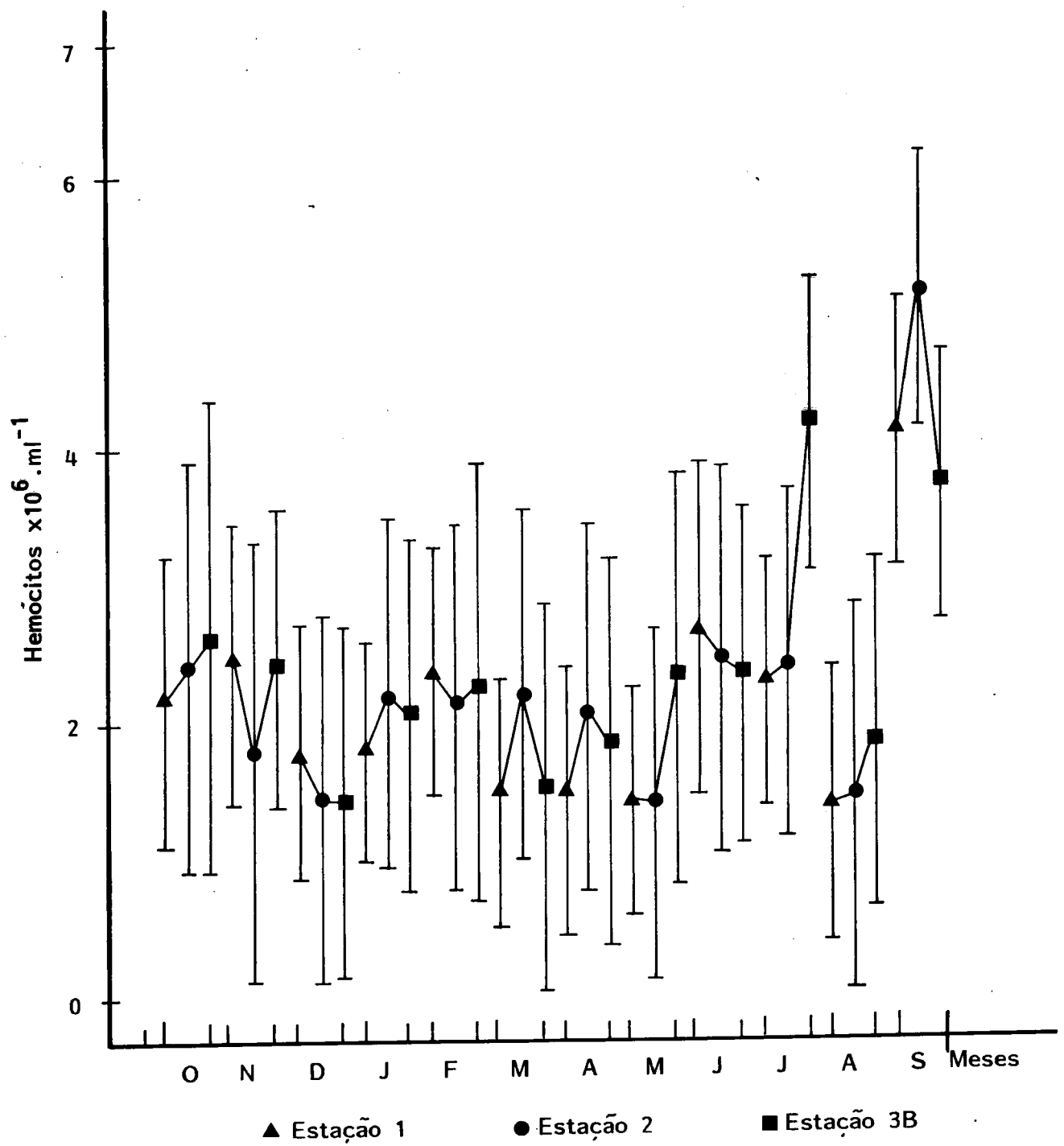


Fig. 9.2 - Variação da concentração celular de *C. edule* de acordo com a estação de colheita, ao longo de um ano. Intervalos de confiança a 95% para a média

No total da amostra de *C. edule* (n = 482) proveniente das três estações e observado ao longo de doze meses, a concentração celular foi mais elevada em *C. edule* das estações 2 e 1 no mês de Setembro, $5,31 \pm 0,59 \times 10^6$ céls/ml, (n=13) e $4,00 \times 10^6$ céls/ml $\pm 0,55$, (n=15) respectivamente. A média em todos os outros meses foi inferior a 4.0×10^6 céls/ml (Fig. 9.2). Na estação 3, em Julho e Setembro foram também observados animais com concentrações de células mais altas do que no resto do ano (Fig. 9.2). Os animais colhidos no mês de Setembro aparecem assim com concentrações celulares significativamente mais altas do que as encontradas em animais colhidos nos outros meses. A estação de colheita não parece ter uma influência significativa na variação desses valores ao longo do ano (Fig. 9.2).

9. 2 - Variação da concentração celular de *C. edule* com o tempo e a temperatura

Face às variações observadas no campo na concentração celular da hemolinfa dos animais colhidos durante o ano, particularmente em Setembro (Fig. 9.2), para as quais não temos uma explicação, decidimos analisar a influência do "stress" pelo frio provocado no laboratório. Assim animais parasitados e não parasitados foram expostos à temperatura de 4° C durante períodos de tempo prolongados (48, 72, 96 e 144 horas). Os resultados, apresentados na Fig. 9.3, indicam que a exposição de animais não parasitados a este tipo de "stress" embora resultando numa baixa da concentração celular de $3,76 \pm 1,43 \times 10^6$ céls/ml a 0h para $1,45 \pm 0,81 \times 10^6$ céls/ml às 72h e "recuperação" às 144h ($3,72 \pm 1,10 \times 10^6$ céls/ml) globalmente não teve modificações estatisticamente significativas. Pelo contrário, nos animais parasitados por uma, duas ou três espécies a concentração celular manteve-se inalterada até às 96h. Às 144h, no entanto, aumentou significativamente em todos os grupos (Fig. 9.3).

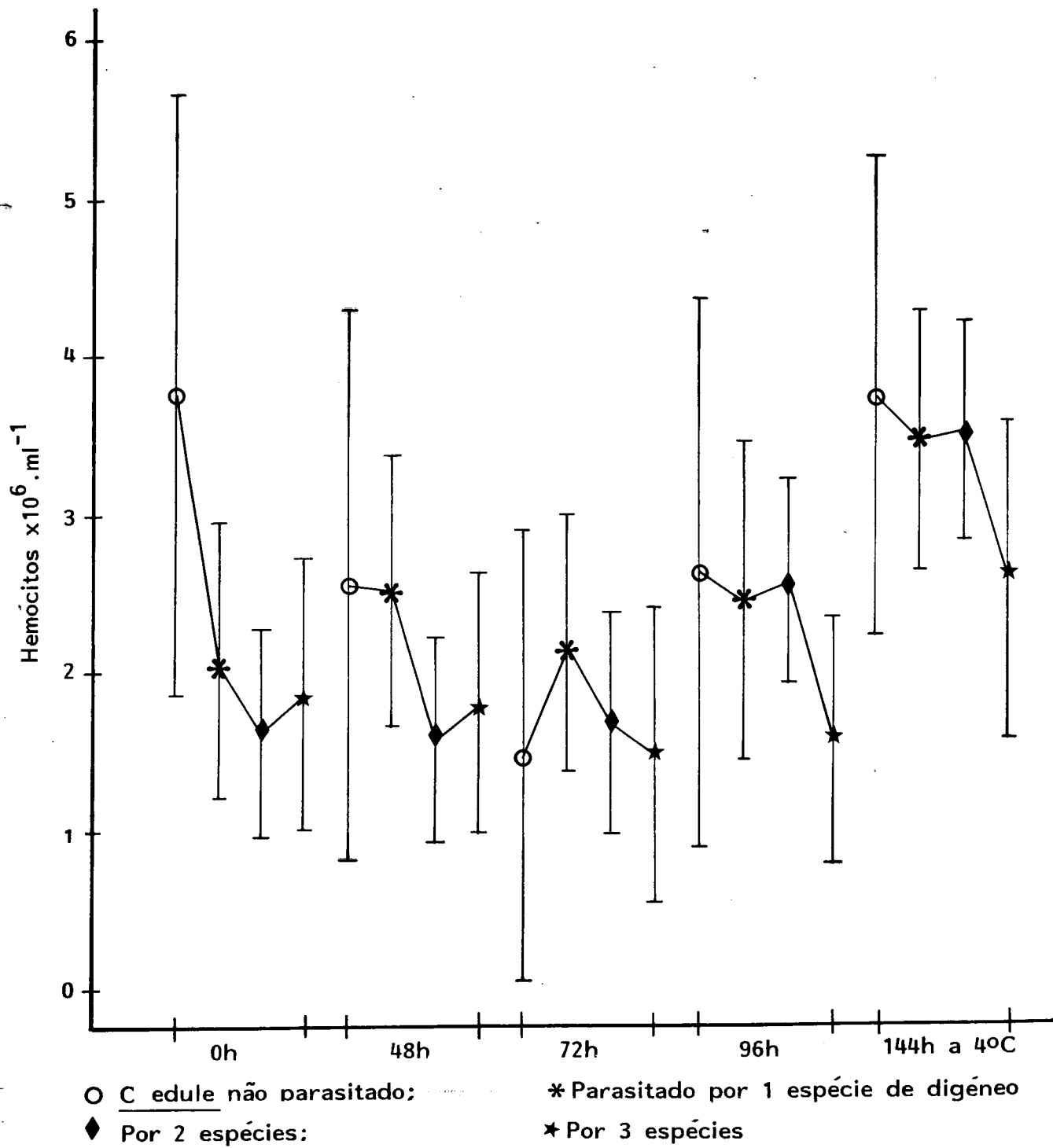


Fig. 9.3 - Variação da concentração celular de *C. edule* não parasitado e parasitado por uma ou mais espécies de digéneos com o tempo de refrigeração (0h, 48h, 72h, 96h e 144h); Intervalos de confiança a 95% para a média.

Na Fig. 9.4 estão representados os resultados de uma análise comparativa da influência da presença isolada dos digênios *M. minutus*, *M. fossarum* e *H. quissetensis* no fenómeno do aumento da concentração celular observado às 144h (Fig. 9.4). Como se pode verificar, este aumento observa-se com todos os parasitas estudados, embora a concentração mais alta ($3.50 \pm 0,32 \times 10^6$ céls/ml; $P < 0,05$) se tivesse observado nos animais parasitados por *H. quissetensis* (Fig. 9.4).

9.3 - Tipos de células envolvidos na resposta de *C. edule* ao "stress" pelo frio.

Para determinar se um tipo de célula particular contribuiu para a modificação observada na concentração celular em animais parasitados e expostos ao frio durante 144h, fizeram-se contagens diferenciais em amostras selecionadas de esfregaços de células colhidas de animais parasitados e não parasitados, expostos a 4°C às 48 e 144h.

Nos animais não parasitados (Tab.9.2) o único aumento observado ocorreu na percentagem média da célula tipo Ia que subiu significativamente de $30,69 \pm 0,95\%$ às 48h para $38,54 \pm 1,16\%$ às 144h. Não se observaram alterações percentuais nas células Ib. No caso das células II e III observaram-se diminuições de $18,00 \pm 1,03\%$ às 48h para $15,00 \pm 1,26\%$ às 144h ($P < 0,05$), no caso das células II e de $11,52 \pm 0,80\%$ às 48h para $5,18 \pm 0,98\%$ às 144h ($P < 0,001$) no caso da célula tipo III.

As alterações nos animais parasitados foram claramente diferentes. Observou-se também uma diminuição significativa das células do tipo III de uma percentagem média de $14,35 \pm 1,0\%$ às 48h para $9,87 \pm 1,20\%$ às 144h. Contrariamente aos animais não parasitados, não se observou uma alteração significativa nos valores médios da célula Ia (Tab. 9.2). Os dois tipos celulares em que se observaram aumentos estatisticamente significativos foram as células tipo Ib (de $37,71 \pm 1,15\%$ às 48h para $41,16 \pm 1,38\%$ às 144h) e tipo II (de $14,69 \pm 0,94\%$ às 48h para $17,18 \pm 1,14\%$ às 144h) (Fig. 9.5; Tab.9.2).

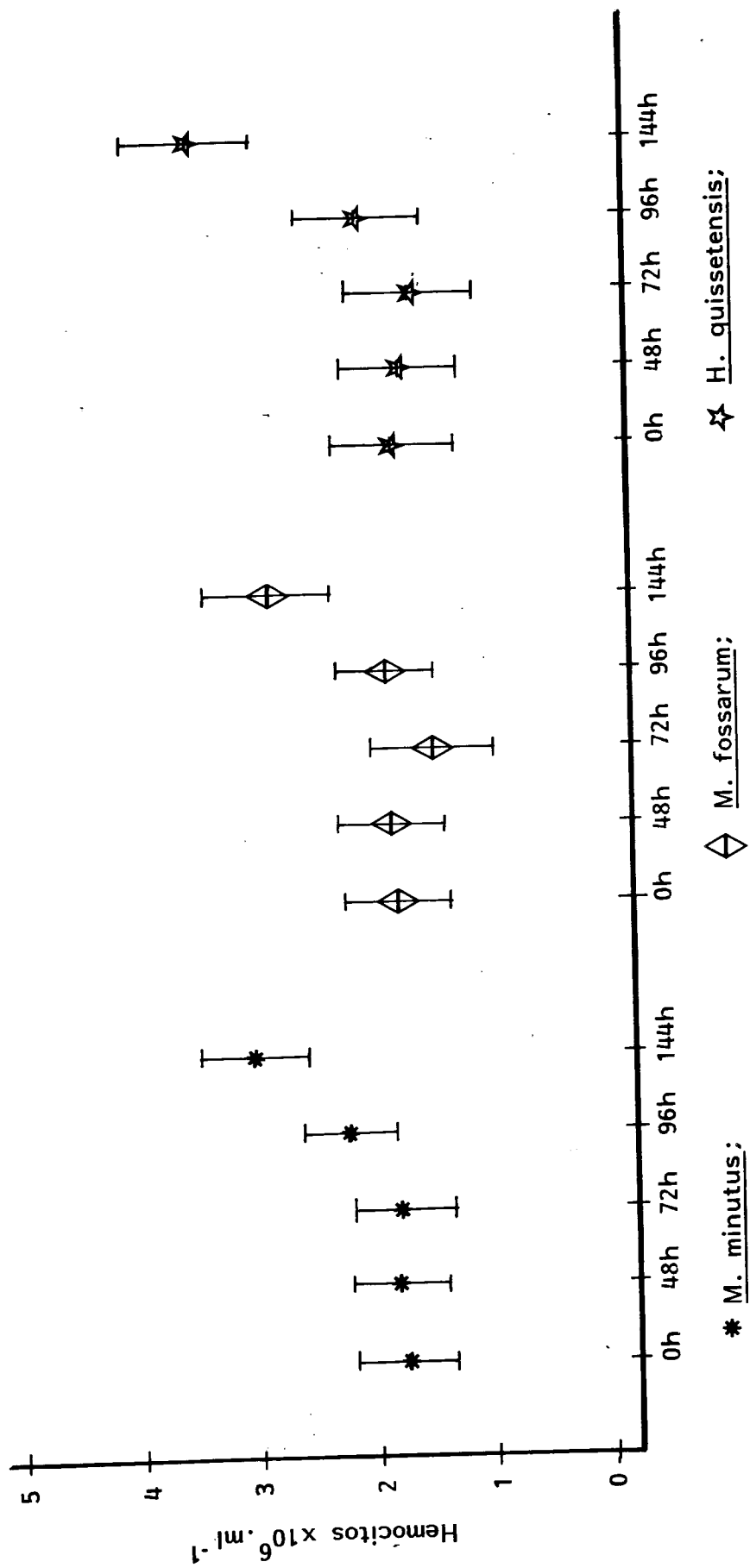


Fig. 9. 4 - Influência da presença de *M. minutus*, *M. fossarum* ou de *H. quissetensis* na concentração celular de *C. edule*, nos diferentes períodos de tempo a 4°C. Intervalos de confiança a 95% para a média.

Tabela 9.2 - Análise estatística das modificações percentuais entre as 48h e as 144h nas populações celulares da hemolinfa em *C. edule* parasitados e não parasitados

| Grupo | Tipo celular | 48h | 144h | P |
|------------------------|---------------------|------------|-------------|----------|
| Não parasitados | | (n=42) | (n=28) | |
| | Ia | 30,69±0,95 | 38,54±1,16 | <0,001 |
| | Ib | 40,21±0,97 | 39,79±1,19 | NS |
| | II | 18,00±1,03 | 15,00±1,26 | 0,035 |
| Parasitados | | (n=48) | (n=33) | |
| | III | 11,52±0,80 | 5,18±0,98 | <0,001 |
| | Ia | 33,27±1,24 | 31,45±1,50 | NS |
| | Ib | 37,71±1,15 | 41,16±1,38 | 0,016 |
| | II | 14,69±0,94 | 17,18±1,14 | 0,046 |
| | III | 14,35±1,00 | 9,87±1,20 | 0,005 |

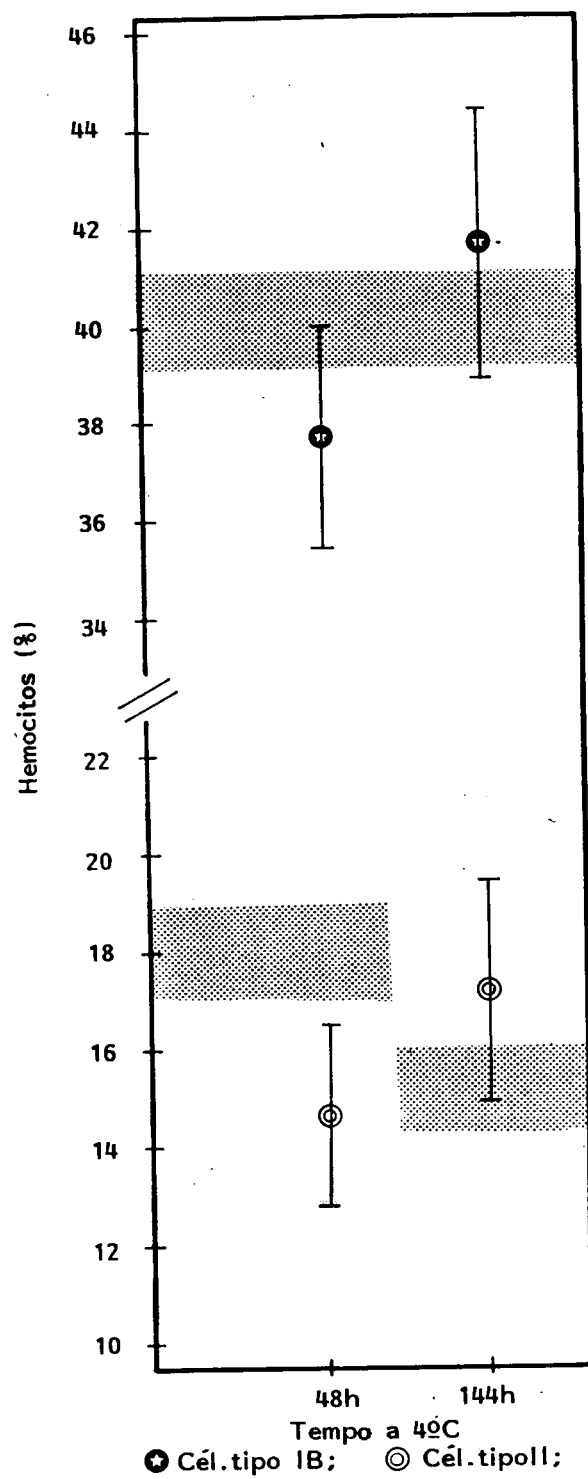


Fig. 9. 5 - Variação da percentagem de hemócitos Tipo IB e Tipo 2 entre 48h e 144h a 4° C em *C. edule* parasitado. Zona sombreada representa as modificações correspondentes em animais não parasitados. Intervalos de confiança a 95% para a média. ($\bar{x} \pm EP$).

CAPÍTULO 10

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Apesar da reconhecida importância sócio-económica de *C. edule* em Portugal e dos efeitos conhecidos da infestação por parasitas na redução da qualidade e no aumento da mortalidade dos animais infectados (Kinne, 1985; Laukner, 1987; Huffman e Fried, 1990), tanto quanto nos foi possível averiguar, este trabalho constitui a primeira contribuição para um despiste extensivo e para a caracterização dos digéneos que parasitam *C. edule* na Ria de Aveiro. Como referido na introdução, a este trabalho (Cap.1) a infestação de Bivalves por digéneos tem repercussões não só na qualidade e na mortalidade dos animais infectados, mas também indirectamente noutros grupos animais, podendo vir assim a perturbar o equilíbrio de todo um ecossistema.

Ao nível do "ecossistema" celular do hospedeiro procurou-se também neste trabalho averiguar como a presença dum ou mais parasitas poderia vir a influenciar ou ser influenciada pelas populações celulares do sistema interno de defesa de *C. edule*. Tanto quanto pudemos averiguar, esta é também a primeira contribuição para a caracterização morfológica e funcional das células do sistema de "defesa" de *C. edule*. Assim os resultados podem dividir-se em duas partes distintas e complementares que serão discutidas separadamente:

Numa primeira parte os resultados do despiste e caracterização dos digéneos serão comparados com os resultados observados noutros países e o possível significado das diferenças encontradas discutido.

A segunda parte da discussão incidirá sobre as questões levantadas pelos resultados da análise quantitativa das células do sistema de defesa interno de *C. edule*: como as variações nos seus números parecem estar relacionadas com a presença de uma ou mais espécies de parasitas e como o "stress" pode influenciar diferentemente a expansão de grupos celulares distintos na presença ou ausência de parasitas.

PARTE I . DESPISTE E CARACTERIZAÇÃO DOS DIGENEA

Comparação dos presentes resultados com observações feitas noutros países.

Em geral não foram encontradas diferenças significativas dos aspectos descritos por outros autores (Bartoli,1965; 1983; Bowers e James, 1967; Loos-Frank,1969; Sannia e James,1978; Maillard, 1975; Prévot,1974) na morfologia dos digéneos quando observados ao microcópio óptico (Cap.5). As contribuições originais para a morfologia destas espécies consistem no estudo da ultraestrutura do tegumento em microscopia de varrimento e de transmissão (Cap. 6).

Pelo contrário, o despiste de parasitas revelou resultados previsíveis e resultados originais. Assim, a presença de *M. minutus* em *C. edule*, embora referenciada pela primeira vez em Portugal, era previsível. Estudos anteriores tinham documentado a sua presença em *C. edule* no Mar do Norte e na Grã-Bretanha (Bowers e James, 1967; Laukner,1971; Loos-Frank,1971; James et al,1977; Goater,1993). Como espécie atlântica, era provável que não só contaminasse *C. edule* mas fosse o parasita dominante de *C. edule* em Portugal. Isto foi de facto o que se observou (Cap.7). *M. minutus* foi o parasita com maior prevalência e intensidade nas estações da Ria de Aveiro estudadas, assim como nos outros locais de proveniência de *C. edule*, em Portugal. Mesmo na questão da prevalência e da intensidade de infecção por *M. minutus* houve, no entanto, um aspecto novo. A observação de que a presença de *M. fossarum* aumenta a intensidade média de infestação de *M. minutus* enquanto a presença de *H. quissetensis* a faz diminuir. Tentando verificar se esta interacção tinha representação em situações no campo, verificou-se que de facto a intensidade média de infestação por *M. minutus* é inferior em *C. edule* colhido na estação 1 em que a prevalência de *H. quissetensis* é mais alta(Cap.7).

No caso de *M. fossarum*, a espécie mediterrânica, a sua presença não tinha sido notada anteriormente em *C. edule*, dentro ou fora de Portugal. De facto, a presença de *M. fossarum* em Portugal foi descrita pela primeira vez num trabalho integrado nesta

tese(Cap.3, Russell-Pinto, 1990) e confirmado posteriormente por Russell-Pinto e Bartoli, (1992) num trabalho também integrado na tese (Cap.4). A presença de *M. fossarum* em *C. edule* pode dever-se à presença no nosso país, de algumas aves erráticas vindas do Mediterrâneo, infestadas por adultos daqueles digéneos, nomeadamente *Haematopus ostralegus ostralegus*. Na Ria foram observados 120 indivíduos da espécie *H. ostralegus*, num estudo feito ao longo de dois dos anos cobertos por este estudo, nos meses de Novembro e Dezembro (A. Luís, informação pessoal).

Até agora suspeitava-se que *M. fossarum*, uma espécie confinada à costa mediterrânica, fosse uma espécie exclusiva de *C. glaucum* (Bartoli,1965; 1973; Bowers *et al.*, 1990). É a partir dos resultados incluídos nesta tese que *M. fossarum* é referenciado em *C. edule*.

Os resultados observados em *C. edule* da costa atlântica, com infestação simultânea por *M. minutus* e *M. fossarum* vêm demonstrar a existência de uma interpenetração de espécies das zonas geográficas atlântica e mediterrânica, levantando assim a questão da coexistência, no mesmo hospedeiro, de espécies alopátridas, uma atlântica e outra mediterrânica, com uma distribuição simpátrida em *C. edule* na Ria de Aveiro (Russell-Pinto e Bartoli, 1992).

Um terceiro aspecto novo, que contribuiu para esclarecer o desenvolvimento do ciclo evolutivo de um terceiro parasita, refere-se à presença de *G. choledochus* em *C. edule*, simultaneamente na fase de esporoquisto e de metacercária (Cap.5). Esta situação demonstra a não utilização do hospedeiro intermediário, *N. diversicolor*. Este facto já tinha sido referido por Loos-Frank (1969), que o atribuiu às temperaturas baixas da água do Mar do Norte durante os meses de Inverno. Também no sul de França este ciclo evolutivo de Inverno foi observado por Bartoli (1974b) nalguns hospedeiros, considerando tratar-se dum processo competitivo de exclusão da espécie *G. choledochus* pela espécie *G. nereicola*, de menor tamanho e

com uma grande intensidade de infestação, não deixando espaço no mesmo microbiótoto, usado pelos dois digéneos em *N. diversicolor*, para o desenvolvimento da metacercária de *G. choledochus*. As metacercárias de *G. choledochus* foram observadas na Ria de Aveiro de Abril a Setembro, período em que a temperatura da água se situa entre os 15° e os 20 ° C e nas estações 3A e 3B em que foi também observada a presença do hospedeiro intermediário *N. diversicolor* (Cap.5). Se atendermos a que os meses em que a infestação foi observada na Ria, correspondem aos meses da Primavera e do Verão e apesar da presença do poliqueta, a observação das duas fases do ciclo no hospedeiro primário *C. edule* leva-nos a concluir que, o que se passa na Ria de Aveiro não representa só um ciclo de vida alternativo, provocado por condições do ambiente em que o ciclo ocorre, mas talvez se esteja perante um caso de supressão evolutiva dum hospedeiro, *N. diversicolor*, facto descrito para outras espécies de digéneos (Koie, 1973; Cable, 1974).

Por último a presença do microsporídeo patogénico *U. legeri* infestante de *M. minutus* (Bowers e James, 1967) hiperparasita de *C. edule* foi confirmada. Na Ria de Aveiro, em 1991, a prevalência de *C. edule* infectado por metacercárias hiperparasitadas é, no entanto, menor do que a descrita em Burry Inlet, observada em 1967, (James *et al.*,1977). Em Aveiro a intensidade de infestação é maior. *U. legeri* foi descrito como hiperparasita de *C. edule* em *M. minutus*, pela primeira vez em Portugal, por Azevedo e Canning (1987), que reexaminaram as fases do seu desenvolvimento em microscopia electrónica, contribuindo para uma melhor diferenciação das fases do ciclo evolutivo. Nunca observamos *M. fossarum* hiperparasitado por *Unikaryum legeri*, confirmando os resultados obtidos por Bowers *et al.* (1990).

PARTE II . SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE *C. EDULE*

O estudo da resposta das células da hemolinfa de *C. edule* à injeção de um antígeno, os eritrócitos de carneiro, permitiu-nos sobretudo caracterizar os diferentes

tipos celulares encontrados na hemolinfa (Cap.8). Foram caracterizados três tipos de células: Tipo Ia, Ib, II e III com base em observações em microscopia electrónica de transmissão e de varrimento, estudos funcionais e análise citoquímica. A célula Tipo I, é uma célula tipo macrófago, aderente ao substracto, com um número maior (Ia) ou menor de pseudópodes (Ib), com uma ultrastrutura semelhante às células que habitualmente são descritas nos gastrópodes e bivalves com a designação de granulócitos. São células fagocíticas, positivas para as esterases e fosfatase ácida. Foram observadas a fagocitar eritrócitos de carneiro e outros tipos de células de *C. edule*. A célula Tipo II, é uma célula esférica, pouco aderente, com um diâmetro inferior a $9\mu\text{m}$ e com uma razão núcleo/citoplasma maior do que a notada na célula Tipo I. Além de ter uma morfologia semelhante às células linfoides dos vertebrados foi observada a adesão à sua superfície de eritrócitos de carneiro formando rosetas. A célula Tipo III apresenta um vacúolo envolvido por um pequeno anel de citoplasma e o núcleo numa posição excentrica, numa das extremidades da célula. Apesar da cor laranja forte que o vacúolo apresenta quando observada ao microscópio óptico, com a coloração de Leishman, não a encontramos descrita em nenhuma da bibliografia consultada.

Interessava-nos também, procurar ver se, em condições "de campo" se encontrariam correlações entre o número e tipos de células do hospedeiro e números de parasitas. O resultado mais decisivo a esta pergunta foi a observação de que animais parasitados por um maior número de espécies de parasitas tinham um menor número de células (Cap.9). Quando se olhou para o número de células em animais parasitados, de acordo com o mês, um maior número de parasitas não pareceu ocorrer em meses em que se observou menor número de células, muito embora o número mais elevado de *M. minutus* encontrados em Dezembro, nas estações 2 e 3 tenha coincidido com números médios baixos da concentração celular. O mesmo não se observou no mês de Setembro

em que intensidades médias relativamente altas de *M. minutus* ocorreram na presença dos valores mais altos da concentração celular (Caps.7 e 9).

Esta última possibilidade verificada no campo, isto é, números altos de parasitas na presença de números médios altos de células, foi de certo modo reproduzida no laboratório em situações de "stress", com três dos principais parasitas observados, nomeadamente *M. minutus*, *M. fossarum* e *H. quissetensis* (Cap.9). A observação de que o aumento maior de células ocorreu às 144h nos animais infectados por *H. quissetensis*, pode talvez ter alguma relevância para a observação referida anteriormente, de que a presença de *H. quissetensis* em animais infectados com *M. minutus*, parece diminuir a intensidade média da infecção de *M. minutus* (Cap.7). As experiências combinando a análise das alterações das proporções dos vários tipos celulares na hemolinfa colhida de animais mantidos a 4°C, durante períodos prolongados (48 a 144h) com a presença ou não de parasitas, merece também uma breve discussão. Na ausência de parasitas a célula que aumenta percentualmente às 144h é a célula Tipo Ia, com características fagocitárias, o que, portanto, pode representar simplesmente uma resposta de "limpeza" á morte de outras células provocada pelo "stress". Pelo contrário quando os hospedeiros se encontram parasitados, são as células Tipo Ib e II que aumentam percentualmente, parecendo representar uma resposta diferente à presença dos parasitas em condições de "stress". Em animais parasitados ou não observou-se sempre uma redução percentual do Tipo III, cujo significado permanece por esclarecer.

A possibilidade de que, em situações de "stress", alguns tipos celulares respondem expandindo preferencialmente os seus números na presença de parasitas, constitui mais uma ilustração da complexidade das interações parasita hospedeiro e da capacidade que os parasitas parecem ter de influenciar o desenvolvimento do "ecossistema" celular do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, C. and CANNING, E. U. (1987) Ultrastructure of a microsporidian hyperparasite, *Unikaryon legeri* (Microsporida), of trematode larvae. *J. Parasitol.* **73** (1) : 214-223.
- BARKA, T. and ANDERSON, P. J. (1962) Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10** : 741-753.
- BARTOLI, P. (1965) Développement expérimental d'une métacercarie nouvelle de la famille des **Gymnophallidae** Morozov, 1955 (Trematoda: Digenea) parasites de Lamellibranches marins. *Bull. Soc. Zool. de France.* **90** : 571-580.
- BARTOLI, P. (1972) Les cycles biologiques de *Gymnophallus nereicola* J. Rebecq et G. Prévot, 1962 et *G. fossarum* P. Bartoli, 1965 espèces jumelles parasites d'Oiseaux de rivages marins (Trematoda, Digenea, **Gymnophallidae**). *Ann. de Parasitol. Hum. et Com.* **47** : 193-223.
- BARTOLI, P. (1973a) La pénétration et l'installation des cercaires de *Gymnophallus fossarum* P. Bartoli, 1965 (Digenea, **Gymnophallidae**) chez *Cardium glaucum* Bruguière. *Bull. Mus. Hist. Nat.*, 3 sér, n° 117, Zoologie. **91** : 319-334.
- BARTOLI, P. (1973b) Les microbiotopes occupés par les métacercaires de *Gymnophallus fossarum* P. Bartoli, 1965 (Trematoda: **Gymnophallidae**) chez *Tapes decussatus* L. *Bull. Mus. Hist. Nat.*, 3 sér, n° 117, Zoologie. **91** : 335-348.
- BARTOLI, P. (1974a) Recherches sur les **Gymnophallidae** F. N. Morozov, 1955 (Digenea) parasites d'oiseaux des côtes de Camargue: systématique biologie et ecologie. Thèse de Doctorat d'Etat Université d'Aix - Marseille III N° CNRS A0 9429. pp.338.
- BARTOLI, P. (1974b) Une cas d'exclusion compétitive chez les trématodes: l'élimination de *Gymnophallus choledochus* T. Odhner, 1900 par *G. nereicola*. *J.*

- Rebecq et G. Prévot, 1962 en Camargue (France) (Digenea, **Gymnophallidae**).
Bull. Soc. Zool. de France. **99** (4) : 551-559.
- BARTOLI, P. (1983) *Gymnophallus rebecqui* n. sp. (syn. *Parvatrema* sp. 1, J. Rebecq, 1964) (Digenea: **Gymnophallidae**) parasite intestinal d'Anatidés de Camargue (France). *Ann. Parasitol. Hum. et Comp.* **58** (3) : 211-225.
- BEAUMONT, A. et CASSIER, P. (1981) *Biologie animal*. Tome I. Dunod University (Pbl.). pp. 459 Paris.
- BETANCES, L.-M. (1921) *Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp.* **18** : 309-327.
- BOWERS, E. A (1965) Studies on some parasites of sea birds and molluscs. Ph. D. Thesis: University College of Swansea.
- BOWERS, E. A. and JAMES, B. L. (1967) Studies on the morphology, ecology and life cycle of *Meiogymnophallus minutus* (Cobbold, 1859) comb. nov. (Trematoda: **Gymnophallidae**). *Parasitology*. **57** : 281-300.
- BOWERS, E. A., BARTOLI, P. and JAMES, B.L. (1990) A demonstration of allopatric sibling species within the **Gymnophallidae** (Digenea). *Syst. Parasitol.* **17** : 143-152.
- BOYDEN, C. R. (1969) Comparative studies on *Cerastoderma edule* and *Cerastoderma glaucum*. Ph. D. Thesis, University of London.
- BOYDEN, C. R. (1973) Observations on the shell morphology of two species of cock *Cerastoderma edule* and *C. glaucum*. *Zool. J. Linn. Soc.* **52** : 269-292.
- BOYDEN, C. R. and RUSSELL, P. J. C. (1972) The distribution and habitat range of the brackish water cockle *Cardium (Cerastoderma) glaucum* in the British Isles. *J. Anim. Ecol.* **41** : 719-734.
- BROCK, V. (1991) An interdisciplinary study of evolution in the cockles, *Cardium (Cerastoderma) edule*, *C. glaucum*, and *C. lamarcki*. Ph. D. Thesis, Kobenhavns Universitet, 31pp. Vinderup Bogtrykkeri (Eds.).

- BRUUN, B. and SINGER, A. (1972) The Hamlyn Guide to Birds of Britain and Europe. Bruce Campbell (Ed.) Hamlyn (Pbl.) pp. 319 London, New York, Sydney, Toronto.
- CABLE, R. M. (1953) The life cycle of *Parvatrema borinqueña* gen. et. sp. nov. (Trematoda: Digenea) and the systematic position of the subfamily **Gymnophallinae**. *J. Parasit.* **39** : 408-421.
- CABLE, R. M. (1974) Phylogeny and taxonomy of trematodes with reference to marine species. In: Symbiosis in the sea. Vernberg, W. B. (Ed.) 173-193 pp. Univ. S. C. Press. Columbia, U. S. A.
- CAMPBELL, D. (1985) The life cycle of *Gymnophallus rebecqui* (Digenea: **Gymnophallidae**) and the response of the bivalve *Abra tenuis* to its metacercariae. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **65** : 589-601.
- CANNING, E. U. (1975) The microsporidian parasites of Platyhelminthes: Their morphology, development, transmission and pathogenicity. William Clowes & Sons Limited (Eds.) Commonwealth Agricultural Bureaux, pp. 32. England.
- CARRÈRE, P. (1937) Quelques métacercaires d'*Atherina mochon* C. V. Développement expérimental d'un Gastérostomide. *C. r. hend. Séanc. Acad. Sci., Paris.* **264** : 1086-1087.
- CHENG, T. C. (1967) Advances in marine biology. Sir Frederick S. Russell (Eds.) pp. 424. Academic Press. London, New York.
- CHENG, T. C. (1978) Parasitologia general. 323-463 pp. Editorial A. C. (Eds.). Madrid.
- CHENG, T. C. (1981) Bivalves. In: Invertebrate blood cells. Vol 1. Ratcliffe, N. A. and Rowley, A. F. (Eds.). 233-300 pp. Academic Press. London, New York, Toronto.
- CHENG, T. C. and RIFKIN, E. (1970) In: Diseases of fish and shellfish. vol. 5. 443-496 pp. Snieszko, S. F. (Ed.). Am. Fisher. Soc. Symp.

- CHENG, T. C. and FOLEY, D. A. (1975) Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*: An electron microscopical study. *J. Invertebr. Pathol.* **26** : 341-351.
- CHERNIN, E. (1963) Observations on hearts explanted *in vitro* from the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.* **49** : 353-364.
- COLE, H. A. (1938) On some larval trematode parasites of the mussel (*Mytilus edulis*) and cockle (*Cardium edule*) Part II. A new larval *Gymnophallus* (*Cercaria cambrensis*) sp. nov. from the cockle (*Cardium edule*). *Parasitol.* **30** : 40-43.
- COMBES, C., ALBARET, J. L., ARVY, L., BARTOLI, P., BAYSSADE-DUFOUR, C., DEBLOCK, S., DURETTE-DESSET, M. C., GABRION, C., JOURDANE, J., LAMBERT, A., LEGERN, N., MAILLARD, C., MATRICOM, M., NASSI, H., PRÉVOT, G., RICHARD, J. and THERON, A. (1980) Atlas mondial des cercaires. *Mem. Mus. Natn. Hist. Nat. Série A. Zool.* pp. 235.
- COUSTAU, C., COMBES, C., MAILLARD, C., RENAUD, F. and DELAY, B. (1990) *Proisorhynchus squamatus* (Trematoda) parasitosis in the *Mytilus edulis* - *Mytilus galloprovincialis* complex: specificity and host-parasite relationships. In: Pathology in Marine Science. Cheng, T. C. and Perkins, F. O. (Eds.) 291-298 pp. Academic Press. London, New York.
- COUSTAU, C., RENAUD, F., DELAY, B., ROBBINS, I. and MATHIEU, M. (1991a) Mechanisms involved in parasitic castration: *In vitro* effects of the trematode *Proisorhynchus squamatus* on the gametogenesis and the nutrient storage metabolism of the marine bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Exp. Parasitol.* **73** : 36-43.
- COUSTAU, C., RENAUD, F., MAILLARD, C., PASTEUR, N. and DELAY, B. (1991b) Differential susceptibility to a trematode parasite among genotypes of the *Mytilus edulis* - *galloprovincialis* complex. *Genet. Res. Camb.* **57** : 207-212.

- CRAMP, S. (1983) Handbook of the birds of Europe the Middle East and North Africa. The birds of the Western Palearctic. Vol. III. Waders to Gulls. Oxford Univ. Press. pp. 913.
- FALIEUX, E. (1990) Experimental infection of juveniles grey mullet, *Liza ramada*, by metacercaria of *Labratrema minimus* (Digenea: **Bucephalidae**): ultrastructural analysis of the host-parasite relationship. In: Pathology in marine Science. Cheng, T. C. and Perkins, F. O. (Eds.). 299-303 pp. Academic Press. London, New York.
- FENG, S. Y., FENG, J. S., BURKE, C. N. and KHAIRALLAH, L. H. (1971) Light and electron microscopy of *Crassostrea virginica* (Mollusca: Pelecypoda). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **120** : 222-245.
- FENG, S. Y., FENG, J. S. and YAMASU, T. (1977) Roles of *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrition. In: Comparative Pathobiology, Vol. 3. Invertebrate Immune Responses. Bulla L. A. Jr., Cheng, T. C. (Eds.). Plenum, 31-67 pp. London,
- FISHER, W. S. and DiNUZZU, A. R. (1991) Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs. *J. Invertbr. Pathol.* **57** : 380-394.
- FRIED, B., EMILI, S. and ETTINGER, W. S. (1987) Experimental infection of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: corbiculidae) with *Echinostoma revolutum* cercariae. *J. Parasitol.* **73** (1) : 253.
- FRIED, B. and HASEEB, M. A. (1991) Platyhelminthes: Aspidogastrea, monogenea and digenea. In: Microscopy anatomy of invertebrates. Vol. 3 Harrison, F. W. (Ed.) 168-209 pp. Wiley-Liss. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- FRIED, B. and ROSA-BRUNET, L. C. (1991) Exposure of *Dugesia Tigrina* (Turbellaria) to cercariae of *Echinostoma trivolvis* and *Echinostoma caproni* (Trematoda). *J. Parasitol.* **77** (1) : 113-116.

- GAMLIEL, H. (1985) Optimum fixation conditions may allow air drying of soft biological specimens with minimum cell shrinkage and maximum preservation of surface features. *Scanning Electron Microscopy*. **4** : 1649-1664.
- GLAUERT, A. M. (1975) Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. North-Holland Publishing Company Amsterdam.
- GOATER, C. P. (1993) Population biology of *Meiogymnophallus minutus* (Trematoda: **Gymnophallidae**) in cockles from the Exe Estuary. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **73** : 163-177.
- HUFFMAN, E. J. and FRIED, B. (1990) Echinostoma and echinostomiasis. In: *Advances in Parasitology*. **29** : 215-269.
- HARRISON, F. W. and BOGITSH, B. J. (1991) Introduction. In: *Microscopy anatomy of invertebrates*. Vol. 3 Harrison, F. W. (Ed.). Wiley-Liss. 1-5 pp. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- JAMES, B. L. (1964) The life cycle of *Parvatrema homoeotectum* sp. nov. (Trematoda: Digenea) and a review of the family **Gymnophallidae** Murozov, 1965. *Parasitology*. **44** : 1-41.
- JAMES, B. L., BOWERS, E. A. and RICHARDS, J. G. (1966) The ultrastructure of the daughter sporocyst of *Cercaria bucephalopsis haimaene* Lacaze-Duthiers, 1854 (Digenea: **Bucephalidae**) from the edible cockle, *Cardium edule* L. *Parasitology*. **56** : 753-762.
- JAMES, B. L., SANNIA, A. and BOWERS, E. A. (1977) Parasites of birds and shelfish. In: *Problems of a Small Estuary Swansea*. Nelson - Smith A. & Bridges E. M. (Eds.). Quadrant Press Ltd. pp. 16.
- JOHNSTONE, J. (1904) Internal parasites and diseased conditions of fishes. *Rep. Lancs. Sea-Fish. Labs.* 98-191 pp.
- JONSSON, P. R. and ANDRÉ, C. (1992) Mass mortality of the bivalve *Cerastoderma edule* on the Swedish west coast caused by infestation with the digenean trematode *Cercaria cerastodermæ* I. *Ophelia*. **36**: 151-157.

- KINNE, O. (1983) Diseases of marine animals. Vol. II. 1038 pp. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- KOIE, M. (1973) The host-parasite interface and associated structures of the cercaria and adult *Neophasis lageniformis* (Lebour, 1910). *Ophelia*. **12**: 205-219.
- KOIE, M. (1985) The surface topography and life-cycles of digenetic trematodes in *Limanda limanda* (L.) and *Gadus morhua* (L.). Ph. D. Thesis. University of Copenhagen 20 pp.
- KOIE, M. (1992) Scanning electron microscopy of cercaria, metacercariae and adults of *Pygidiopsis ardeae* Koie, 1990 (Digenia, Heterophyidae). *Parasitol. Res.* **78**: 469-474.
- LAUCKNER, G. (1971) Zur trematodenfauna der herzmuscheln *Cardium edule* und *C. lamarcki*. *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*. **22**: 377-400.
- LAUCKNER, G. (1983) Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Diseases of marine animals. O. Kinne (Ed.). Vol. 2: 632-762. Biologische Anstalt Helgoland. Hamburg.
- LAUCKNER, G. (1987) Ecological effects of larval trematode infestation on littoral marine invertebrate population. *Int. J. Parasitol.* **17** (2) : 391-398.
- LE BRUN, N. (1988) Spécificité des relations hôte-parasites. Le modèle Cyprinidae-*Diplozoon*. Thèse de Doctorat, U. S. T. L., Montpellier, 168 pp.
- LEBOUR, M. V. (1906) Notes on Northumbrian trematodes. Rep. Scient. Invest. Northumb Sea Fish Comm. 1905: 100-105.
- LEBOUR, M. V. (1907a) Larval trematodes of the Northumberland coast. *Trans. Nat. Hist. Soc. Northumb.* (N. S.). **1** : 437-454.
- LEBOUR, M. V. (1907b) On three molluscs-infecting trematodes. *Ann. Mag. Nat. Hist.* **19** : 102-106.
- LEBOUR, M. V. (1911) A review of the British marine cercariae. *Parasitology*. **4** : 416-456.

- LINDNER, G. (1977) Moluscos y caracoles de los mares del mundo. 255 pp. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.
- LOOS-FRANK, B. (1969) Zur kenntnis der gymnophalliden trematoden des Nordseeraumes. I. Die alternativ-zyklen von *Gymnophallus choledochus* Odhner, 1990. *Z. Parasitenkd.* **32** : 135-156.
- LOOS-FRANK, B. (1971) Zur kenntnis der gymnophalliden trematoden des Nordseeraumes. *Z. Parasitenk.* **36** : 206-232.
- MAILLARD, C. (1975) *Labratrema lamirandi* (Carrère, 1937) (Trematoda, **Bucephalidae** parasite de *Dicentrarchus labrax* (L., 1758). Création du genre *Labratrema*. Cycle évolutif. *Bull. Mus. Natn. Hist. Nat., Paris.* 3^a sér., n° 283, *Zool.* **193** : 69-80.
- MATTEWS, R. A. (1973) The life cycle of *Bucephalus haimeamus* (Lacaze-Duthiers, 1954) from *Cardium edule* L. *Parasitology.* **67** : 341-350.
- MEGLITSCH, P. A. (1983) Zoologia de invertebrados. Herman Blume (Ed.). pp. 906. Unigraf, S. A. Madrid.
- MILLER, H. M. and NORTHROP, F. E. (1926) The seasonal infestation of *Nassa obsoleta* (Say) with larval trematodes. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab Woods Hole* **50** : 490-508.
- MOORE, M. N. and LOWE, D. M. (1977) The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol.* **29** : 18-30.
- MORONA, D., JOURDANE, J. and AESCHLIMANN, A. (1984) Étude de l'évolution, *in vitro*, des granulocytes de l'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **59** : 467-475.
- MORRIS, G. P. and THREADGOLD, L. T. (1967) A presumed sensory structure associated with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **53** : 537-539.

- MUZAVOR, S. (1991) Roteiro ecológico da Ria Formosa. 1 - Moluscos bivalves. Algarve em foco (Ed.). pp. 75.
- NOBRE, A. (1935) Fauna marinha de Portugal - mamíferos, réptis e peixes. Vol 1 pp. 580. Annaes de Sciencias Naturaes, Porto.
- OLAFSEN, J. A., FLETCHER, T. C. and GRANT, P. T. (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.* **16** : 123-138.
- PALOMBI, A. (1934) Gli stadi larvali dei trematodi del Golfo di Napoli: 1° contributo allo studio della morfologia, biologia e sistematica delle cercarie marine. *Pubbls. Staz. Zool. Napoli.* **14** : 51-94.
- PEARSE, A. G. E. (1972) Histochemistry theoretical and applied (Vol. 2) Churchill Livingstone. Edinburgh, London.
- PEKKARINEN, M. (1987) Notes on a gymnophallid trematode, assumed to be *Parvatrema affinis* (Jameson & Nicoll, 1913) from *Macoma balthica* (L.) (Bivalvia). *Ann. Zool. Fennici.* **24** : 29-37.
- PEKKARINEN, M. (1991) A coccidian hyperparasite in bucephalid trematode sporocysts in brackish water (Baltic Sea) *Mytilus edulis*. *J. Invertbr. Pathol.* **57** : 292-293.
- PELSNEER, P. (1906) Trématodes parasites de mollusques marines. *Bull. Sci. Fr. Belg.* **40** : 161-186.
- PIPE, K. R. (1990) Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell. Tissue Res.* **261** : 261-268.
- PRÉVOT, G. (1965) Développement expérimental d'une métacercarie de *Gymnophallus* (Trematoda: Digenea). *Bull. Soc. Zool. France.* **90** : 451-456.
- PRÉVOT, G. (1974) Recherches sur le cycle biologique et l'écologie de quelques trematodes nouveaux parasites des *Larus argentatus michaellis* Naumann dans le midi de la France. Thèse pour Docteur ès-Sciences. Université des Sciences d'Aix- Marseille.

- REBECQ, J. (1964) Recherches systématiques, biologiques et écologiques sur les formes larvaires de quelques trématodes de Camargue. Thèse Univ. Aix-Marseille, pp. 122- 254
- REBECQ, J. et PRÉVOT, G. (1962) Développement expérimental d'un *Gymnophallus* (Trematoda, Digenea). C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris. **255** : 3272-3274.
- REICHENBACH-KLINKE, H.-H. and LANDOLT, M. (1973) Fish Pathology. 436-462 pp. T. F. H. Publications, Inc. Ltd.
- RENWRANTZ, L., YOSHINO, T. P. and CHENG, T. C. (1979) Size determination of leucocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* and description of phagocytosis mechanism. *Zool. Jahrb. Abteil. Physiol. Zoomorphol.* **83** : 1-2.
- RENWRANTZ, L., DANIELS, J. and HANSEN, P. D. (1985) Lectin binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* **9** : 203-210.
- REYNOLDS, B. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17** : 208-212.
- RUDDLELL, C. L. (1971) The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* **18** : 269-275.
- RUSSELL-PINTO, F. (1990) Differences in infestation intensity and prevalence of hinge and mantle margin *Meiogymnophallus minutus* metacercariae (**Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* (Bivalvia): possible species coexistence in Ria de Aveiro. *J. Parasitol.* **76** : 653-659.
- RUSSELL-PINTO, F. and BARTOLI, P. (1992) Sympatric distribution of *Meiogymnophallus minutus* and *M. fossarum* (Digenea: **Gymnophallidae**) in *Cerastoderma edule* in the Ria de Aveiro estuary in Portugal. *Parasitol. Res.* **78** : 617-618.
- SANNIA, A. (1977) Digenea from marine molluscs. Ph. D. Thesis: University College of Swansea. 334 pp.

- SANNIA, A. and JAMES, B. L. (1978) The occurrence of *Cercaria cerastoderme* I
Sannia, James, and Bowers, 1978, Digenea: Monorchiidae in Populations of
Cercaria edule from the Commercial beds of the Lower Thames Estuary. *Z.
Parasitenkd.* **56** : 1-11.
- SANNIA, A., JAMES, B. L. and BOWERS, E. A. (1978) The morphology of
Cercaria cerastodermæ I. nom. nov. (**Monorchiidae**) (= *Cercaria lepidapedon
racion* (Cobbold, 1858) *sensu* Lebour, 1908) a rare digenea parasite of the
cockle in Britain. *J. Nat. Hist.* **12** : 487-500.
- SCHELL, S. C. (1982) Trematoda. In: Synopsis and classification of living organisms.
Vol.1. Parker, S. P. (Ed.) pp. 740-807. McGraw-Hill. New York, Lisboa, Paris,
London.
- SCHENEIDER, J. A. (1992) Preliminary cladistic analysis of the bivalve family
Cardiidae. *American Malacological Bulletin.* **9** (2) : 145-155.
- SELLIN (1970) Contribution à l'étude de quelques trématodes digènes de la côte nord
de la Bretagne. Thèse de 3^o cycle Faculté des Sciences de l'Université de Rennes.
- STORER, T. I., USINGER, R. L., STEBBINS, R. C. and NYBAKKEN, J. W. (1982)
Zoologia general. 955 pp. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.
- STUNKARD, H. W. (1938) The morphology and the life cycle of the trematodes
Himasthla quissetensis (Miller and Northrup, 1926). *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.,
Woods Hole* **75** : 145-164.
- STUNKARD, H. W. (1960) Further studies on the trematode genus *Himasthala* with
descriptions of *H. mcintoshi* n. sp., *H. piscicola* n. sp., and stages in the history
of *H. compacta* n. sp. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole.* **119** : 529-549.
- STUNKARD, H. W. (1970) The marine cercariae of the Woods Hole, Massachusetts,
region. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole.* **138** : 66-76.
- VASTA, G. R., CHENG, T. C. and MARCHALONIS, J. J. (1984) A lectin on the
hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell. Immunol.* **88** :
475-488.

- WARDLE, W. J. (1988) A bucephalid larva, *Cercaria pleuromerae* n. sp. (Trematoda: Digenea), parasitizing a deepwater bivalve from the gulf of México. *J. Parasitol.* **74** (4) : 692-694.
- YANG, R. and YOSHINO, T. P. (1990) Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Carbicula fluminae* I. electrophoretic and immunologic analyses of opsonic plasma components. *Dev. Comp. Immunol.* **14** : 385-395.
- YOSHINO, T. P. and CHENG, T. C. (1976) Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod *Mercenaria mercenaria*. *Trans. Amer. Micros. Soc.* **95** : 215-220.

Resumo

C. edule (N. V. berbigão) tem, em Portugal, uma importância apreciável sob o ponto de vista social e económico. Na Ria de Aveiro, o estuário onde foram efectuadas as principais colheitas de amostras incluídas neste estudo, são transacionadas anualmente 2.000 toneladas de *C. edule* para o mercado interno e são exportadas 30 toneladas. No Algarve a produção de bivalves representa 90 % de todos os bivalves consumidos no país, empregando aproximadamente 8.000 pessoas. Trabalhos efectuados noutros países têm demonstrado que o parasitismo de bivalves por Digenea dá origem a efeitos negativos na qualidade dos animais e pode influenciar a sua taxa de mortalidade. Além disso o parasitismo por Digenea coloca um certo número de problemas biológicos básicos que vão desde a modelação de ecossistemas até à filogenia do sistema imune em diferentes grupos de animais, mais precisamente, à caracterização dos sistemas elementares de "defesa" interna. Apesar do interesse destes aspectos básicos e aplicados da importância de *C. edule* para Portugal, tanto quanto é do meu conhecimento, muito pouco se sabe sobre a prevalência da infecção de *C. edule* por Digenea no país.

O presente trabalho tem dois objectivos principais:

1. Fazer o rastreio da infestação de *C. edule*, em três locais diferentes da Ria de Aveiro, em relação a parasitas que se sabe infectarem esta espécie, a partir de trabalhos efectuados noutros países atlânticos e mediterrânicos.
2. Caracterizar os hemócitos que se julga estarem envolvidos na resposta a antígenos externos e possivelmente também envolvidos na resposta do hospedeiro face à presença de parasitas.

Material e métodos

1. Foi feito um estudo, num total de 3.816 *C. edule*, que nos permitiu determinar a prevalência de *M. minutus*, *M. fossarum*, *G. choledochus*, *G. rebecqui*, *H. quissetensis*, *L. minimun* e *C. cerastodermæ* I nas estações designadas por 1, 2, 3A e 3B, localizadas a diferentes distâncias da foz do rio (Fig.2.2).

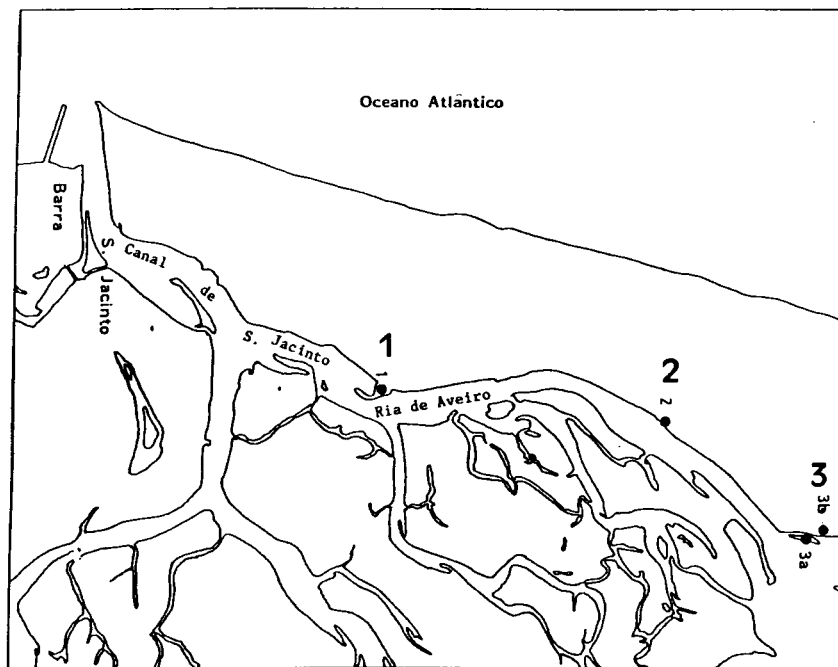


Fig. 2.2 - Mapa da Ria de Aveiro onde se encontram assinalados os locais de colheita de *C. edule* usados neste trabalho: 1 (Estação 1), 2 (Estação 2) e 3b (Estação 3).

Uma parte destes animais (n= 848) fez parte dum estudo longitudinal de amostras colhidas mensalmente entre Outubro de 1991 e Setembro de 1992. Com este estudo procurou-se obter o conhecimento das variações da prevalência e da intensidade da infecção com a época do ano.

2. Para a caracterização dos hemócitos de *C. edule*, a hemolinfa foi colhida em animais que tinham sido injectados com eritrócitos de carneiro e foram preparados esfregaços e "pellets" celulares para estudos citoquímicos, de microscopia electrónica de varrimento e de transmissão. Foram contados números totais de hemócitos em parte das amostras seriadas, colhidas mensalmente entre 1991 e 1992 (n=482). A possível influência da presença dos parasitas na resposta das células do hospedeiro, depois de submetido a "stress", a 4° C. durante 48, 72, 96 e 144 horas, foi estudada, *in vitro*, em amostras de hemolinfa em que foram contados os números de células totais. Foram feitas contagens diferenciais em amostras seleccionadas de esfregaços de células colhidas em animais, parasitados e não parasitados, às 0, 48 e 144 horas.

Resultados e discussão

Objectivo 1. Os resultados do trabalho executado para atingir o objectivo 1 pode ser dividido em dois subgrupos. Um grupo de resultados previsíveis, confirmando a presença de parasitas encontrados em *C. edule* nos países atlânticos (*M. minutus*) e mediterrânicos (*M. fossarum*) e um novo grupo de resultados inesperados. Entre estes, o mais interessante foi talvez a descoberta da coexistência de *M. minutus* e *M. fossarum* em *C. edule*.

Esta descoberta pode provavelmente ser atribuída à migração para a zona atlântica de *H. ostralegus*, uma ave usualmente confinada ao Mediterrâneo (Russell-Pinto, 1990, Russell-Pinto and Bartoli, 1992).

Um segundo novo resultado foi a observação de que a intensidade média da infecção de *M. minutus* parece ser influenciada significativamente pela presença de outros parasitas. A coexistência de *M. fossarum* parece provocar um aumento da intensidade média da infecção por *M. minutus*. Contrariamente a presença de *H. quissetensis* deu origem a uma diminuição da intensidade média da infecção por *M. minutus*. Esta interacção negativa (supressiva ?) entre *H. quissetensis* e *M. minutus* parece ocorrer particularmente na Estação 1, onde foi notada a maior prevalência de *H. quissetensis*.

Uma análise longitudinal, ao longo dum ano, mostrou-se particularmente interessante dado que revelou claramente variações de intensidade de infecção muito maiores nas Estações 2 e 3 do que na Estação 1. Provavelmente, estas variações podem estar associadas com diferenças sazonais da penetração dos hospedeiros definitivos no estuário.

Finalmente a microscopia óptica e o estudo ultrastructural de *G. choledochus* vieram confirmar as observações de Loos-Frank no fim da década de sessenta (Loos-Frank, 1969). A presença de metacercárias de *G. choledochus* em *C. edule*, nos meses da Primavera e do Verão, é contudo contrária à interpretação de Loos-Frank na qual as baixas temperaturas poderiam ser a causa da não migração das cercárias de *G. choledochus* de *C. edule* para *Nereis sp*, com a sua completa maturação no hospedeiro primário.

Objectivo 2 . Na hemolinfa de *C. edule* foram identificados três tipos de células principais: células com características morfológicas, citoquímicas e funcionais de fagócitos (Ia e Ib), fagocitando SRBC e células mortas do hospedeiro, e células com uma morfologia semelhante à das células linfóides dos vertebrados (Tipo II), que foram observadas a formar rosetas com SRBC. Um terceiro tipo de células, designado por Tipo III, foi caracterizado pela existência dum grande vacúolo citoplasmático e pela posição excêntrica do núcleo. Esta célula parece nunca ter sido descrita anteriormente em Bivalves.

Uma parte integrante do trabalho foi utilizar a situação de infestação de *C. edule* para a caracterização dos tipos de células provavelmente envolvidas no chamado sistema interno de defesa dos invertebrados. Tal trabalho mostrou-se compensador. Os animais infestados pelas três espécies de parasitas tinham claramente a mais baixa concentração de hemócitos ($1,79 \pm 0,20 \times 10^6$ cél/ml), seguindo-se os maiores números médios em animais infectados por duas espécies ($2,16 \pm 0,16 \times 10^6$ cél/ml) e por uma espécie ($2,53 \pm 0,20 \times 10^6$ cél/ml). A

maior concentração celular foi observada em *C. edule* não parasitado ($2,72 \pm 0,38 \times 10^6$ cél/ml).

De destacar que animais parasitados sujeitos a "stress" pelo frio têm o maior número de células quando submetidos durante 144 h. a 4°C .

Contagens diferenciais revelaram que apenas dois tipos de células contribuem para este aumento: Tipo Ib e Tipo II. No controlo, com animais não parasitados, o aumento só se verificou na percentagem média de células do Tipo Ia.

Conclusão

Foi confirmada a presença de Digenea em *C. edule*. Alguns aspectos novos da infecção foram, contudo, revelados por este trabalho: a coexistência de *M. minutus* e *M. fossarum* em *C. edule*, a influência positiva ou negativa de um parasita na intensidade de infecção de outro e a observação de metacercárias *G. choledochus* em *C. edule*. Para além disso ficou claramente demonstrado pelos resultados das experiências sob "stress" que a presença de parasitas pode influenciar a resposta das células do hospedeiro ao "stress" e que geralmente existe uma forte correlação estatisticamente significativa entre o número de células na hemolinfa e o número de espécies de parasitas encontrados no hospedeiro. Será necessário muito trabalho futuro para dissecar os mecanismos subjacentes aos resultados observados. Contudo, o facto de alguns dos resultados encontrados em laboratório parecerem ser confirmados por observações no campo, significa que o futuro trabalho pode ser unicamente dirigido para condições experimentais em laboratório.

A conclusão geral, obtida experimentalmente, foi de que na grande complexidade das interacções que têm lugar entre o hospedeiro, os seus parasitas, o ambiente onde essas interacções têm lugar, a presença, transitória ou permanente, de hospedeiros intermediários ou definitivos, etc., o parasita parece desempenhar um papel decisivo. O facto deste trabalho concluir com um maior número de perguntas do que as formuladas à partida é uma indicação do seu interesse, senão do seu completo sucesso que, espero, será progressivamente atingido com o meu empenhamento continuado nesta área de investigação.

ABSTRACT

C. edule (N.V. in Portuguese berbigão) has an appreciable social and economical impact in Portugal. In Ria de Aveiro, the lagoon that was the principal collection site of the samples included in this study, 2,000 tones of *C. edule* are transacted in the internal market and 30 tones are exported annually. In the Algarve the production of bivalves represent 90% of all the bivalves consumed in the country employing approximately 8,000 people. Work in other countries has demonstrated that parasitism of bivalves by Digenea has marked negative effects on the quality of the animals produced and that it may influence mortality. In addition, parasitism by Digenea poses a number of basic biological problems that range from modulation of ecosystems to developmental immunology, more precisely, to the characterization of elementary internal "defense" systems. In spite of these interesting basic and applied aspects of the importance of *C. edule* to Portugal, to the best of our knowledge, very little is known about the prevalence of infection of *C. edule* by Digenea in the country.

The present work had two principal aims:

1. To screen *C. edule* at three distinct locations of the Ria de Aveiro for parasites known to infect them from work in other atlantic and mediterranean countries.
2. To characterize the haemocytes thought to be involved in the response to external antigens and possibly involved in the host's response to the presence of parasites.

Material and Methods

1. A total of 3816 *C. edule* were screened for the presence of *M. minutus*, *M. fossarum*, *G. choledochus*, *G. rebecqui*, *H. quissetensis*, *L. minimum* and *C. cerastodermæ* I at stations designated 1, 2, 3A and 3B, located at different distances from the mouth of the river (Fig.2.2)

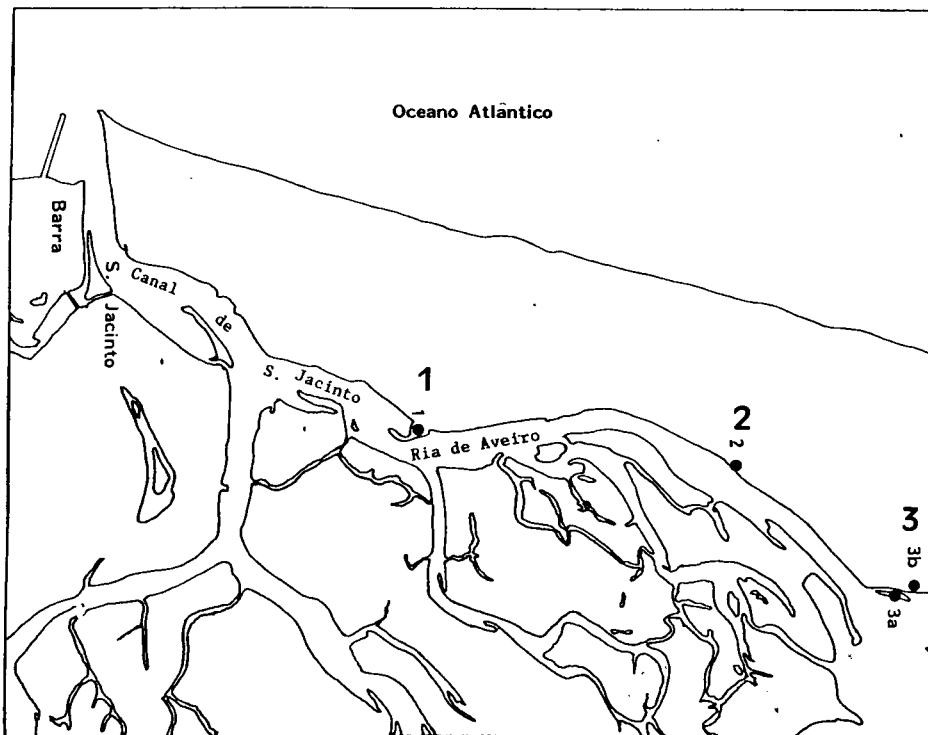


Fig. 2.2- Map of Ria de Aveiro indicating sites 1 (Station 1), 2 (Station 2), 3 b (Station 3) of collection of the *C. edule* used in the present study (Scale: 1/125000).

A proportion of these animals (n = 848) was part of a serial study of samples collected monthly from October 1991 to September 1992. This serial study aimed at gaining some insight into the existence of variations in the prevalence and in the intensity of the infection with time of the year.

2. To characterize the haemocytes of *C. edule*, haemolymph was collected from animals that had been injected with sheep red blood cells (SRBC) and cytopins and/or cell pellets were prepared for cytochemistry, scanning and transmission electron microscopy. Total haemocyte counts were done in some of the serial samples collected monthly between 1991 and 1992 (n = 482).

To examine *in vitro* the possible influence of the presence of parasites in the host cellular response to stress, samples were collected and total cell counts done in haemolymph from animals left at 4°C for 48, 72, 96 and 144 hours. Selected cytopins were analysed for differential cell counts from samples collected from parasitised and non-parasitised animals at 0, 48, and 144 hours.

Results and Discussion

Aim 1. The results of the work designed to achieve Aim 1 can be divided in two sub-groups. A group of "predictable" results, confirming the presence of parasites found in *C. edule* in other atlantic (*M. minutus*) and mediteranean (*M. fossarum*) countries, and a group of novel, slightly unexpected, results. Of the latter, the most interesting was perhaps the finding of the co-existence of *M. minutus* and *M. fossarum* in *C. edule*. This finding can most probably be attributed to the entry in the atlantic space of *H. ostralegus*, a bird usually confined to the Mediterranean (Russel-Pinto, 1990, Russell-Pinto and Bartoli, 1992)

A second novel result was the observation that the mean intensity of infection by *M. minutus* appeared significantly influenced by the presence of other parasites. The co-existence of *M. fossarum* seemed to result in an increase of the average intensity of infection by *M. minutus*. Conversely the co-appearance of *H. quissetensis* resulted in a significant decrease of the average intensity of infection by *M. minutus*. This negative (suppressive?) interaction between *H. quissetensis* and *M. minutus* seemed to occur, particularly in Station 1, where the highest prevalence of *H. quissetensis* was noted. The serial analysis throughout the year proved to be interesting insofar as it clearly revealed much greater variations in intensity of infection with the time of the year in Stations 2 and 3 than in Station 1. These variations can probably best be interpreted by seasonal differences in the penetration of the lagoon by the definitive hosts. Finally, light microscopy and the ultrastructural study of *G. choledochus* resulted in the confirmation of the observations of Loos-Frank in the late sixties (Loos-Frank, 1969). The finding of *G. choledochus* metacercariae in *C. edule* in the Spring and Summer months, however, is contrary to Loos-Frank's interpretation that low temperatures could be the cause for the lack of migration of *G. choledochus* cercariae from *C. edule* to *Nereis* sp. with full maturation in the primary host.

Aim 2. Three principal cell types were identified: cells with the morphological, cytochemical and functional characteristics of phagocytes (Ia and Ib) seen to phagocytose SRBC and other host dead cells, cells with a vertebrate lymphoid like morphology (Type II) that were seen to form E-rosettes with the SRBC. A third cell type, designated Type III was characterised by a large cytoplasmic vacuole and an excentric nucleus. This cell does not appear to have been described before in Bivalves.

An integral part of the work to characterise the cell types probably involved in the so called defense system of invertebrates was to apply it to the field situation of parasitism. This proved to be most rewarding. Clearly animals infected with three species of parasites had the lowest concentration of haemocytes ($1.79 \pm 0.20 \times 10^6$ céls/ml) followed by higher average numbers in animals infected with two species ($2.16 \pm 0.16 \times 10^6$ céls/ml) and one species ($2.53 \pm 0.20 \times 10^6$ céls/ml). The highest cell concentrations were found in non parasitised *C. edule* ($2.72 \pm 0.38 \times 10^6$ céls/ml). Interestingly, parasitised animals subjected to stress by cold had the highest numbers of cells when left at 4°C for 144h.

Differential cell counts revealed that only two cell types were represented in this increase : Type Ib and Type II cells. In controls, non-parasitised animals, increases were seen only in the proportions of Type Ia cells.

Conclusion

The present work confirmed the expected finding of Digenea in *C. edule*. Some novel aspects of the infection were, however, unravelled by this work : the co-existence of *M. minutus* and *M. fossarum* in *C. edule*, the positive or negative influence of one parasite in the intensity of infection of another and the finding of *G. choledochus* metacercaria in *C. edule*. In addition, it became clear from the results of the experiments on stress, that the presence of parasites can influence the response of the host cells to stress and that in general a strongly statistically significant correlation exists between number of cells in the haemolymph and number of species of parasites found in the host. Much further work is necessary to dissect the mechanisms underlying the results observed. The fact, however, that some of the results found in the laboratory seem to be substantiated by observations in the field signifies that further work can be solely designed in experimental conditions in the laboratory.

The general conclusion can tentatively be reached that in the great complexity of interactions taking place between a host, its parasites, the environment where the interactions are taking place, the transient or permanent presence of significant intermediary or definitive hosts, etc., the parasite has a most decisive role. The fact that this work concludes with a much larger number of questions than we had at the start is an indication of its interest if not of its complete success. That, I hope, will be slowly reached with my continued commitment to this area of research.

RÉSUMÉ

C. edule (en portugais, berbigão) a un impact social et économique notable. Ria de Aveiro, au-delà d'être le lieu où on a fait la plupart de la récolte des échantillons pour cette étude, a une production annuelle de 2.000 tonnes pour consommation interne du pays et 30 tonnes pour exporter. La production des bivalves représente, au Algarve, 90% de toutes les moules consommées dans le marché interne et pourvoit 8.000 postes de travail.

Des études de recherche dans d'autres pays ont démontré que le parasitisme de bivalves par *Digenea* a des effets très négatifs sur la qualité des animaux et peut influencer les taux de mortalité des bivalves. En outre, le parasitisme par *Digenea* pose des questions biologiques de base, dès la modulation des écosystèmes à la phylogénie du système immunitaire, c'est à dire, à la caractérisation des systèmes élémentaires de "défense" interne. Bien que on trouve d'intérêt dans ces aspects basiques et appliqué de l'importance de *C. edule* pour le Portugal, on sait très peu sur la prévalence de l'infection par *Digenea* chez *C. edule* dans notre pays.

Cette étude, accomplit dans trois stations expérimentales différentes de la Ria de Aveiro, envisage surtout:

1. Le dépistage au Portugal, chez *C. edule*, de parasites de cette espèce, déjà connus par des travaux développés dans d'autres pays atlantiques et méditerranéens comme infestants.
2. La caractérisation des hémocytes qu'on croit avoir part dans la réponse aux antigènes externes et, très probablement, dans la réponse de l'hôte à la présence des parasites.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. On a fait le dépistage d'un total de 3 816 *C. edule* pour détecter la présence de *M. minutus*, *M. fossarum*, *G. choledochus*, *G. rebecqui*, *H. quissetensis*, *L. minimum* et *C. cerastodermae* I, dans les stations expérimentales ici nommées 1, 2, 3A et 3B localisées à des distances différentes de l'embouchure du fleuve (Fig. 2.2).

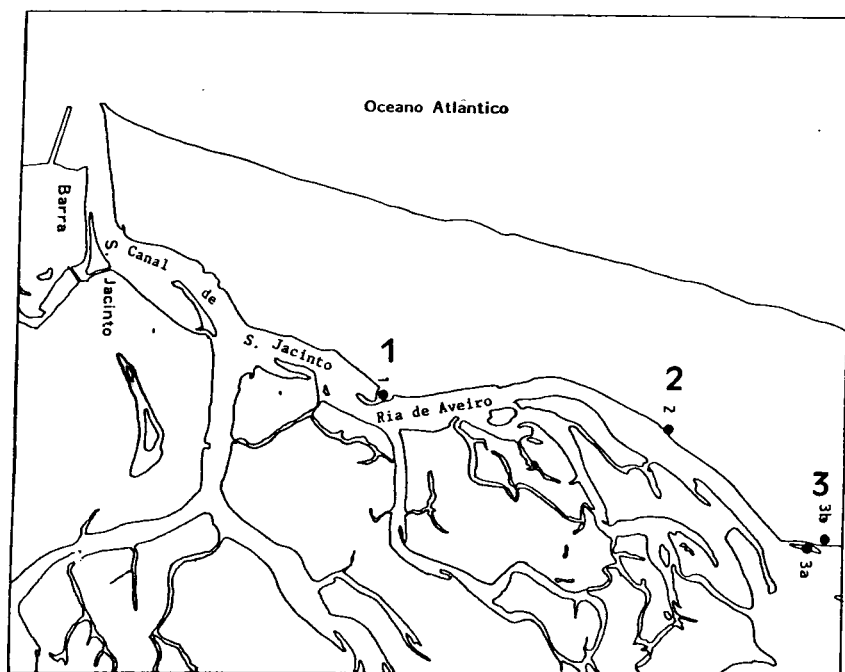


Fig. 2.2 - Carte de Ria de Aveiro où sont signalés les lieux de récolte de *C. edule*, étudié dans ce travail: 1 (Station 1), 2 (Station 2), 3a,b (Station 3).

Part de ces animaux (n = 848) fait part d'une étude sérielle d'échantillons recueillis tous les mois, d'octobre 1991 à septembre 1992. Ce travail sériel a eu comme objectif, gagner de connaissance sur l'existence de variations dans la prévalence et l'intensité de l'infection d'après les différentes époques de l'année.

2. Pour caractériser les hémocytes de *C. edule*, on a fait la récolte d'hémolymphe des animaux déjà injectés avec des érythrocytes de mouton (SRBC).

Frottis et/ou culot cellulaires ont été préparés pour cytochimie et microscopie électronique à balayage et transmission. Le comptage total des hémocytes a été effectué en quelques échantillons sériels recueillis tous les mois entre 1991 et 1992 (n = 482). Afin d'examiner *in vitro* la possible influence des parasites dans la réponse cellulaire de l'hôte au "stress", des échantillons ont été recueillis et on a fait le comptage total des cellules dans l'hémolymphe des animaux laissés à une température de 4° C pendant 48, 72, 96 et 144 heures. Les frottis sélectionnés ont été analysés d'après des comptages différentiels de cellules d'échantillons d'animaux parasités et non-parasités à 0, 48 et 144 heures.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Objectif 1: Les résultats du travail accompli pour atteindre cet objectif couvrent deux sous-groupes: Le groupe des résultats "prévus", qui confirment la présence des parasites chez *C. edule* dans les pays atlantiques (*M. minutus*) et dans les pays méditerranéens (*M. fossarum*) et un groupe de résultats nouveaux, qu' on peut considérer inattendus. Sur ces derniers, la découverte la plus intéressante a été peut-être la co-existence de *M. minutus* et *M. fossarum* chez *C. edule*. Cette découverte peut probablement être rapportée à l'entrée dans l'espace atlantique de *H. ostralegus*, un oiseau dont l'habitat se confine à la Méditerranée (Russell-Pinto, 1990, Russell-Pinto et Bartoli, 1992).

Le deuxième nouveau résultat concerne l'intensité moyenne de l'infection par *M. minutus*, qu'on dirait significativement influencée par la présence d'autres parasites. La co-existence de *M. fossarum* résulte, apparemment, dans l'accroissement de l'intensité moyenne de l'infection causée par *M. minutus*. En contraire, la présence de *H. quissetensis* réduit significativement l'intensité moyenne de l'infection par *M. minutus*. Cette interaction négative (suppression?) entre *H. quissetensis* et *M. minutus* semble avoir lieu dans la Station 1, où on a observé la prévalence la plus élevée de *H. quissetensis*.

L'analyse sérielle pendant toute l'année s'est révélée d'intérêt, d'autant plus que les variations d'intensité de l'infection avec l'époque de l'année sont beaucoup plus élevées dans les Stations 2 et 3 que dans la Station 1. Ces variations-ci peuvent être dues aux différences saisonnières de pénétration dans la lagune des hôtes définitifs.

Finalement, la microscopie de lumière et l'étude ultrastructurale de *G. choledochus* ont confirmé les observations de Loos-Frank aux années 60 (Loos Frank, 1969). La découverte de métacercarie de *G. choledochus* dans *C. edule* au printemps et le dans les mois d'été, contredit l'interprétation de Loos-Frank que les températures basses peuvent être responsables par l'absence de migration des cercaires de *G. choledochus* du *C. edule* aux espèces *Nereis* sp. avec maturation complète dans le premier hôte

Objectif 2: On a identifié trois Types principaux de cellules: des cellules avec les caractéristiques morphologiques, cytochimiques et fonctionnelles des phagocytes, Type Ia et Ib, qui vont phagocyter les cellules rouges de mouton et d'autres cellules mortes de l'hôte; des cellules avec une morphologie du type lymphoïde des vertébrés, Type II qui vont former des rosettes avec les SRBC.

Un troisième Type de cellules nommé Type III, caractérisées par un large vacuole cytoplasmique et un noyau excentrique et qui ne semble pas avoir été décrit auparavant chez les Bivalves.

Une partie intégrant de ce travail a été l'utilisation *C. edule* parasité pour la caractérisation des Types cellulaires qui, probablement, participent dans le système de défense des invertébrés et cela a été extrêmement compensatoire. On a rendu évident que des animaux infectés avec trois espèces de parasites montrent la concentration la plus basse de

hémocytes ($1,79 \pm 0,20 \times 10^6$ cellules/ml) suivie par la moyenne plus élevée dans le nombre d'animaux infectés par deux espèces ($2,16 \pm 0,16 \times 10^6$ cellules/ml) et une espèce ($2,53 \pm 0,20 \times 10^6$ cellules/ml). Les concentrations cellulaires les plus élevées ont été trouvées dans *C. edule* non-parasité ($2,72 \pm 0,38 \times 10^6$ cellules/ml). Il est intéressant d'observer que des animaux parasités sujets au "stress" par le froid, révèlent un nombre de cellules plus agrandi quand ils sont laissés à une température de 4° C pendant 144 h. Les comptages cellulaires différentiels montrent que seulement deux types de cellules ont été représentés dans cet accroissement. Les cellules du Type Ib et II. Chez les contrôles, les animaux non-parasités, l'accroissement a été vérifié seulement dans les proportions des cellules du Type 1a.

CONCLUSIONS

Ce travail de recherche confirme la découverte prévue de l'existence de *Digenea* chez *C. edule*. Des aspects tous nouveaux de l'infection ont été, toutefois, révélés ici: la co-existence de *M. minutus* et *M. fossarum* chez *C. edule*, l'influence positive ou négative d'un parasite dans l'intensité de l'infection d'un autre et la découverte de métacercaires de *G. choledochus* dans *C. edule*. Au-delà de ces observations, il a été mis en évidence par les résultats obtenus dans les expériences sur le "stress", que la présence des parasites peut influencer la réponse des cellules de l'hôte au "stress" et que, généralement, une corrélation statistique fortement significative existe entre le nombre de cellules dans l'hémolymphe et le nombre des espèces de parasites trouvées dans l'hôte. Beaucoup plus de travail est nécessaire pour distinguer les mécanismes qui soulignent les résultats auxquels nous sommes arrivés. Toutefois, le fait de quelques résultats obtenus en laboratoire sembler être fortifiés par des observations dans la nature, signifie que le travail postérieur peut seulement être développé dans des conditions expérimentales de laboratoire.

Une conclusion générale peut être essayée: dans la grande complexité des interactions qui ont lieu entre l'hôte, ses parasites, le milieu ambiant, la présence temporaire ou permanente des hôtes intermédiaires ou définitifs, le parasite semble jouer toujours un rôle déterminant. Le fait de ce travail terminer avec un nombre beaucoup plus grand de questions vers celui que nous avons au début de cette étude, est une indication de son intérêt et même de son succès. Celui-ci sera progressivement atteint, je l'espère bien, avec mon compromis et engagement dans ce domaine de la recherche.

