

PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BUCEFALOSE (ENFERMIDADE LARANJA) EM MEXILHÕES *Perna perna*

Patrícia GARCIA^{1,3} e Aimê Rachel Magenta MAGALHÃES^{2,3}

RESUMO

Este trabalho propõe um protocolo de identificação e quantificação da bucefalose em mexilhões *Perna perna*, através da histologia clássica e análise estereológica. Dentre 50 indivíduos com 30 a 70 mm de comprimento, obtidos em cordas do cultivo experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, na Praia de Sambaqui-Florianópolis/SC, foram identificados seis animais parasitados por *Bucephalus* sp., correspondendo a uma prevalência de 12%. Secções transversais inclinadas dos moluscos foram fixadas em Davidson, processadas por histologia clássica, cortadas (3 µm) e coradas com HHE. O volume fracionário do tecido do parasita (TP), do hospedeiro (TH) e dos espaços vazios (EV) foi quantificado por estereologia, com auxílio de gráticula de Weibel acoplada ao microscópio óptico. A objetiva de 10x foi mais eficiente que a de 40x, na análise microscópica das secções. Metade do total de animais analisados apresentou grau moderado (5-50% da secção com tecidos do parasita) de parasitismo, e a outra metade, grau pesado (> 50%). Não foram encontrados animais com parasitismo leve (< 5%).

Palavras-chave: mexilhão; *Perna perna*; protocolo; *Bucephalus* sp.; histopatologia; estereologia

PROTOCOL OF IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF BUCEPHALOSIS (ORANGE DISEASE) IN THE MUSSEL *Perna perna*

ABSTRACT

This study proposes a protocol for the identification and quantification of bucephalosis in the mussel *Perna perna*, by classical histology and stereological methods. Among fifty animals with length between 30 and 70 mm, proceeding from experimental mussel culture strings of Universidade Federal de Santa Catarina, at Sambaqui Beach-Florianópolis/SC, six animals infected with *Bucephalus* sp. were identified, corresponding to a prevalence of 12%. Inclined transverse sections of the molluscs were fixed in Davidson's solution, processed through classical histology, cut (3 µm) and stained with HHE. The fractional volume of the parasite tissue (PT), host tissue (HT) and empty spaces (ES) were quantified by Weibel graticule attached to a microscope. The objective of 10x was more efficient than that of 40x, for the stereological analysis of the sections. Half of the infected animals presented a moderate rate of parasite infection (5-50% of the section with parasite tissue), while the other half presented greater rates (> 50%). Animals with light infection (< 5%) were not found.

Key words: mexilhão; *Perna perna*; protocol; *Bucephalus* sp.; histopathology; stereology

Artigo Científico: Recebido em 29/3/2006 - Aprovado em 11/5/2007

¹ Bolsista da Capes - Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura, CCA, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil
e-mail: patricigarcia@gmail.com

² Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura, CCA, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil

³ Endereço/Address: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aqüicultura
Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP: 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil

INTRODUÇÃO

A produção de moluscos marinhos é uma atividade econômica recente e em plena expansão no Estado de Santa Catarina, considerado o maior produtor destes animais no Brasil (MAGALHÃES, 1998; POLI, 1998). Em 2004 foram produzidas 9.800,8 toneladas de mexilhão e 2.512,7 toneladas de ostras no litoral catarinense (OLIVEIRA NETO, 2005). Estima-se um incremento de 30% na produção destes moluscos em 2005.

Em muitos países, a produção de moluscos marinhos é afetada por diversas enfermidades, causando forte impacto na economia e gerando um ponto de estrangulamento no crescimento e sustentabilidade desta atividade (OIE, 2003). A introdução do agente patogênico ocorre por transferências de moluscos vivos (ELSTON, 1990; BOWER *et al.*, 1994; WALKER e SUBASINGHE, 2000). Segundo OIE (2003), esta foi a principal causa de surtos de enfermidades epizooticas, podendo resultar em decréscimo significativo das populações de bivalves (BOWER e FIGUERAS, 1989). Em diversos países registraram-se mortalidades massivas de bivalves causadas por microrganismos (GRIZEL *et al.*, 1988; CACERES-MARTÍNEZ e FIGUERAS, 1995; BURRESON e CALVO, 1996), bem como efeitos deletérios e mortalidade imposta por metazoários parasitas (ABREU, 1965; DAVEY e SCULLARD, 1978; CHENG *et al.*, 1983; TURNER, 1985; ELSTON, 1990; BLATEAU *et al.*, 1992; JONSSON e ANDRÉ, 1992; FUENTES *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2002; KIM e POWELL, 2004).

A ocorrência de patógenos causadores de enfermidades em mexilhões é pouco documentada (SILVA *et al.*, 2002), o que não significa que a saúde desses organismos seja superior à de outros moluscos (FIGUERAS e VILLALBA, 1988). Provavelmente, isto advém da falta de informações sobre os mexilhões, em razão de seu valor econômico ser inferior ao das ostras (BOWER e FIGUERAS, 1989) e da carência de pesquisas referentes à sanidade desses moluscos.

Os trematódeos digenéticos são metazoários de interesse na patologia de moluscos (KINNE, 1983). Compreendem mais de 40.000 espécies e apresentam o ciclo vital mais complexo não só dentre os platelmintos, mas em todo o reino animal (CHENG, 1978).

Em moluscos, a bucefalose, ou “enfermidade laranja”, assim denominada por Cole, *apud* UMIJI *et al.* (1976), é causada por um trematódeo do gênero

Bucephalus. Caracteriza-se macroscopicamente pela presença de estruturas filamentosas de cor laranja brilhante no manto, em razão da pigmentação dos esporocistos do parasita. Em infestações elevadas, o manto adquire tonalidade laranja intensa, tornando impossível a identificação macroscópica, e muitas vezes microscópica, do sexo do hospedeiro. O parasitismo eleva o consumo de nutrientes, como o glicogênio (infestação inicial) e os lipídios (infestação elevada), reduzindo, assim, as reservas do hospedeiro (MAGALHÃES, 1998). A deficiência nutricional inviabiliza a gametogênese e emacia o corpo do hospedeiro, de maneira que o tecido deste pode ser destruído pela saída das cercárias, com possibilidade de morte dos mexilhões (LAUCKNER, 1983; MAGALHÃES, 1998).

Ovos de *Bucephalus* sp. são eliminados pelo hospedeiro definitivo, como *Urophycis brasiliensis* (abrótea), *Menticirrhus americanus* (papa-terra), *M. littoralis* e *Centropomus undecimalis* (robalo-flexa) (AMATO, 1982; PEREIRA JR. *et al.*, 1996; ROBALDO, 1995). Destes ovos, eclodem as larvas miracídeos, que penetram em moluscos, como *Perna perna* (UMIJI *et al.*, 1976), primeiro hospedeiro intermediário. Aí se transformam em esporocistos ramificados, que invadem cavidades, como vasos sanguíneos, intestino, glândula digestiva, câmaras branquiais, gonodutos e folículos gonádicos, causando, nestes casos, a castração do molusco (ELSTON, 1990; MAGALHÃES, 1998). Nos esporocistos há diversos estágios de cercárias (CHENG, 1978), que, quando maduras, rompem os tecidos do molusco e infestam o segundo hospedeiro intermediário, um peixe, como *Micropogonias furnieri* (corvina), transformando-se em metacercárias. O parasita *Bucephalus* sp. pode chegar ao hospedeiro definitivo quando este se alimenta do peixe com metacercárias ou do mexilhão com cercárias (UMIJI *et al.*, 1976; CHENG, 1978; PEREIRA JR. *et al.*, 1996). Esporocistos de *Bucephalus* sp. ocorrem em moluscos *Perna perna* (LUNETTA, 1969), *Mytilus edulis platensis* (Morris, *apud* PEREIRA JR. *et al.*, 1996), *Crassostrea virginica* (WINSTEAD *et al.*, 2004), *C. madrasensis* (KUMAR, 2000), *Ostrea edulis* (PRINCEP *et al.*, 1996), *Pinctada radiata* (KHAMDAN, 1998), *Dreissena polymorpha* (LAURELLE *et al.*, 2002), *Donax variabilis* (Hopkins, *apud* PEREIRA JR. *et al.*, 1996), *Paphia aurea* (POLENTA e FROGLIA, 1997), *Anomalocardia brasiliiana* (ARAÚJO, 2001), *Eurynia iris* (OLSEN, 1974), *Pecten fumatus* e *Chlamys (Mimachlamys) asperrima* (HEASMAN *et al.*, 1996) e *Perumytilus* sp. (LASIAK, 1992).

Do gênero *Bucephalus* são conhecidas as espécies: *Bucephalus papillosus* (OLSEN, 1974), *B. brevitentaculatus*, *B. cynoscion*, *B. gorgon*, *B. kathetostomae*, *B. priacanthi*, *B. scorpaenae* (AMATO, 1982), *B. cuculus*, *B. elegans*, *B. heterotentaculatus*, *B. introversus*, *B. varicus* (ITIS, 2005), dentre outras.

Adultos de *Bucephalus varicus*, de ampla distribuição geográfica, são facilmente encontrados em peixes do litoral do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Rio de Janeiro (PEREIRA JR. *et al.*, 1996; CHAVES e LUQUE, 1998; ALVES *et al.*, 2004). Há registro de ocorrência de esporocistos de *Bucephalus varicus* em mitilídeos no litoral da Argentina (Morris, *apud* PEREIRA JR. *et al.*, 1996).

Na África do Sul, os trematódeos mais comuns em *P. perna* são metacercárias de *Proctoeces* e esporocistos de bucefalídeos, com prevalência de 62% e 49%, respectivamente (CALVO-UGARTEBURU e MCQUAID, 1998a). Enquanto *Proctoeces* afeta o crescimento destes bivalves pequenos, os esporocistos de bucefalídeos castram animais maiores, que gastam mais energia na fase reprodutiva (CALVO-UGARTEBURU e MCQUAID, 1998b). No Brasil, UMIJI *et al.* (1976), em pesquisas realizadas em 1974 no Estado de São Paulo, fizeram o primeiro relato de sérios danos em *P. perna*, causados pela infestação de *Bucephalus*, e registraram, também, alta prevalência do parasita no cultivo (30-35%) e em áreas abrigadas de água poluída (15-20%). A ocorrência deste trematódeo tem sido acompanhada no litoral brasileiro, porém a prevalência das infestações reportadas tem variado entre os locais analisados: 2% a 49%, com base nos trabalhos de LUNETTA (1969), CASAS (1986), GARCIA (1990), SILVA *et al.* (1996), MAGALHÃES (1998), MARENZI *et al.* (1998), MAGALHÃES *et al.* (1999), SILVA (1999), MAGALHÃES *et al.* (2000), LIMA *et al.* (2001), SILVA *et al.* (2002), HENRIQUES (2004).

O início da parasitose em *P. perna* está relacionado ao tamanho do indivíduo: animais com menos de 30 mm não são parasitados (LASIAK, 1989; MAGALHÃES, 1998); animais com 30 a 40 mm são parasitados; animais com 60 a 70 mm apresentam parasitismo intenso; e animais com mais de 70 mm, parasitismo decrescente (MAGALHÃES, 1998). A maior incidência da enfermidade coincide com a maior frequência de mexilhões férteis nos meses de maio a agosto (MAGALHÃES, 1998; SILVA *et al.*, 2002).

Embora de fácil identificação macroscópica, é

impossível, nos estágios iniciais da bucefalose, constatar a presença dos esporocistos de *Bucephalus* sp. em cerca de 8% da amostra de mexilhões (MAGALHÃES, 1998). Portanto, recomenda-se a histologia clássica (OIE, 2003) associada à estereologia para classificar o grau de infestação nos mexilhões, evitando os equívocos que podem decorrer da observação macroscópica e estereoscópica (ARAÚJO *et al.*, 1993; MAGALHÃES, 1998; SILVA *et al.*, 2002).

Assim, este trabalho teve por objetivo propor o protocolo de identificação e de quantificação da bucefalose em *P. perna* através de histologia clássica e análise estereológica. O principal intuito é contribuir para o diagnóstico da bucefalose, parte do programa estadual de sanidade para moluscos marinhos cultivados no litoral catarinense.

MATERIAL E MÉTODOS

Os mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) (Bivalvia: Mytilidae) utilizados neste trabalho foram provenientes do cultivo experimental do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado na Praia de Sambaqui (27°29' S e 48°33' W), município de Florianópolis/SC.

Em agosto de 2005, cinquenta mexilhões cultivados, com 30 a 70 mm de comprimento, foram aleatoriamente selecionados.

Após seccionar o músculo adutor posterior e abrir as valvas do mexilhão, procedeu-se ao exame macroscópico das partes moles, com o intuito de verificar a presença do trematódeo *Bucephalus* sp. A prevalência do parasita em *P. perna* foi estimada pelo cálculo percentual dos animais infestados, reconhecidos através de observação macroscópica, em relação ao número total de animais analisados (MAGALHÃES, 1998; SILVA, 1999; SILVA *et al.*, 2002).

Com auxílio de escalpelo, o corpo de cada mexilhão parasitado foi cuidadosamente separado da concha, a fim de se efetuarem cortes transversais, inclinados, na massa visceral. Estas secções, que incluíam brânquias, manto, intestino e glândula digestiva, conforme recomendação da OIE (2003) e HOWARD *et al.* (2004), foram fixadas em solução de Davidson marinho por 24-48 h (MAGALHÃES, 1998; OIE, 2003) e posteriormente transferidas para álcool 70° (MAGALHÃES, 1998; SABRY, 2003).

As secções foram então submetidas aos procedimentos histológicos clássicos de desidratação (álcool 70°, 90° e 100° - dois banhos em cada uma);

diafanização: dois banhos em xilol; e inclusão em parafina. Cortes de 3 µm de espessura (micrótomo CUT 4055 - Olympus) foram corados com hematoxilina de Harris e eosina aquosa 1% - HHE (BEÇAK e PAULETTE, 1976; MAGALHÃES, 1998; HOWARD *et al.*, 2004).

A intensidade de infestação foi determinada quantitativamente através de análise estereológica e com auxílio da gráticula de Weibel acoplada ao microscópio óptico (LOWE e MOORE, 1985; MAGALHÃES, 1998; SILVA, 1999; SILVA *et al.*, 2002). A análise foi feita pela contagem dos constituintes tissulares do hospedeiro (TH), do parasita (TP) e dos espaços vazios (EV) subpostos a cada um dos 42 pontos presentes na gráticula. Em cada animal, a contagem foi feita em duas áreas: em cada área, cinco campos escolhidos aleatoriamente e não sobrepostos foram mensurados (42 x 2 x 5), totalizando 420 pontos no máximo, por corte, por animal. As contagens foram realizadas em microscópio óptico (Olympus CX 31), utilizando as objetivas de 10x e 40x. A fração do volume de cada item foi calculada segundo fórmula de LOWE e MOORE (1985).

A intensidade da infestação foi expressa em percentagem de TP observada no manto do mexilhão. A infestação dos animais foi classificada em diferentes graus: leve (L), < 5% de TP; moderada (M), 5-50%; e pesada (P), > 50% (adaptado de MAGALHÃES, 1998).

A comparação dos resultados obtidos com as diferentes objetivas foi realizada pelo teste t de Student, utilizando o procedimento de permutação implementado no pacote computacional SAS INSTITUTE INC.(1999). Tal procedimento permite comparar as médias utilizando a real distribuição dos dados e, assim, evitando o viés produzido pela falta de normalidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, a prevalência do parasita *Bucephalus* sp. em espécimes de *P. perna* coletados em agosto de 2005 foi relativamente alta: 12% (n=50). Embora a prevalência desta parasitose tenha oscilado de <1% a 49% nos diversos locais pesquisados do litoral catarinense (CASAS, 1986; GARCIA, 1990; SILVA *et al.*, 1996; MAGALHÃES, 1998; MARENZI *et al.*, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 1999; SILVA, 1999; MAGALHÃES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002), espera-se uma incidência maior do parasita de junho a

setembro. MAGALHÃES (1998), pesquisando o efeito da bucefalose na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de *P. perna*, verificou maior quantidade de animais férteis nos meses de maio a agosto, coincidindo com maior prevalência de *Bucephalus* sp. nos meses de junho a setembro, fato este também observado por SILVA *et al.* (2002).

Em pesquisas prévias, LASIAK (1989), LASIAK (1993) e CALVO-UGARTEBURU e MCQUAID (1998a), na África do Sul, e MAGALHÃES (1998), em Palhoça-SC, encontraram correlação positiva entre tamanho do mexilhão e presença de *Bucephalus* sp. A partir de 30 mm, o mexilhão *P. perna* já inicia a produção de gametas e armazena quantidades consideráveis de glicogênio e lipídios, que na fase reprodutiva serão direcionados principalmente à gametogênese. Isto auxilia o entendimento da presença do parasita em meses nos quais estas reservas são maiores em função do ciclo gonádico do hospedeiro. Contudo, MAGALHÃES (1998) considera que a sazonalidade da bucefalose esteja vinculada principalmente à presença de diferentes espécies de peixes na região, que seriam os hospedeiros definitivos.

Em razão das características citadas anteriormente: parasita, tamanho do hospedeiro e estágio sexual deste, é que foram selecionados apenas animais entre 30 e 70 mm de concha. Esta faixa de tamanho mostrou-se adequada à obtenção de animais portadores de bucefalose e indicadores da prevalência da doença naquela população.

A identificação macroscópica de *Bucephalus* sp, após um certo grau de infestação, é possível graças aos filamentos alaranjados no manto, característicos da ramificação dos esporocistos através do corpo do bivalve. A remoção da concha permitiu constatar que o grau de infestação era maior na região dorsal anterior, indicando um possível sítio inicial de infestação, conforme verificado por MAGALHÃES (1998). Esta observação corrobora a necessidade de se realizarem cortes transversais inclinados. Os cortes de 3 µm fornecem dados do aspecto morfológico dos esporocistos jovens e velhos; das massas germinais intraesporocísticas; dos estágios das cercárias e do efeito deletério da parasitose sobre os tecidos conjuntivo e gonádico do hospedeiro.

Acertadamente, FIGUERAS e FIGUERAS (1987) e OIE (2003) propõem a histologia clássica como método inicial e rotineiro de vigilância de

patógenos em moluscos, por sua eficiência e pela impossibilidade de o exame macroscópico indicar claramente o potencial da patogenia. Em OIE (2003) e BONDAD-RENTASO *et al.* (2001), em todos os protocolos de identificação de patologias de moluscos recomendam-se cortes de 2-3 μm de espessura para os exames histológicos. Tal procedimento facilita a

primeira análise de investigação da possível presença de outros patógenos em moluscos.

A quantificação da infestação de *Bucephalus* sp. em secções histológicas de *P. perna*, com o auxílio de microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x (Tabela 1), foi expressa em volume fracionário de cada item pesquisado.

Tabela 1. Volume fracionário (%) dos constituintes tissulares do parasita (TP), do hospedeiro (TH) e dos espaços vazios (EV), mensurado com auxílio de microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x

Indivíduo	TP (%)		TH (%)		EV (%)		Total (%)
	10x	40x	10x	40x	10x	40x	
1	60,2	40,7	31,5	34,8	8,3	24,5	100
2	8,6	16,9	83,3	65,2	8,1	17,9	100
3	33,8	26,7	20,0	17,4	46,2	56,0	100
4	50,5	25,5	41,7	46,4	7,9	28,1	100
5	50,4	25,7	30,7	46,7	18,9	27,6	100
6	44,3	37,9	38,8	27,6	16,9	34,5	100

Não houve diferença significativa nas análises realizadas para TH e TP, utilizando as duas objetivas. Contudo, houve indicação de distorções na análise de EV ($< 0,0001$), nos indivíduos 5 e 6, em comparação efetuada entre os resultados obtidos com as objetivas de 10x e 40x. A objetiva de 10x foi mais eficiente que a de 40x, na quantificação da bucefalose com a grátula de Weibel, em razão da varredura mais ampla em cada área. Sendo mais abrangente, mais representativo foi o resultado fracionário do tecido do parasita em relação aos tecidos do hospedeiro. A objetiva de 40x causa certa distorção nas análises, por avaliar uma área reduzida do animal, principalmente quando há redução significativa do tecido conjuntivo interfolicular. Nos animais analisados, a parasitose foi moderada nos indivíduos 2, 3 e 6 ($M=5-50\%$), enquanto nos indivíduos 1, 4 e 5 foi pesada ($P > 50\%$), não sendo encontrados indivíduos com parasitismo leve ($L < 5\%$) (Figura 1).

No parasitismo moderado foi possível determinar macroscopicamente o sexo do indivíduo 6, enquanto o dos indivíduos 2 e 3, apenas ao microscópio. Houve predomínio dos tecidos do hospedeiro (tecido

conjuntivo interfolicular; remanesência dos folículos e/ou paredes foliculares); incremento do tecido parasitário; células germinativas foliculares raras; esporocistos com muitas esferas germinais ou massas germinais formadoras de cercárias; e cercárias de diversos tamanhos. O indivíduo 3 apresentou alto grau de emaciação, com redução do tecido conjuntivo interfolicular, provavelmente em razão do desgaste causado pelo parasita.

Com bucefalose pesada, foi possível determinar o sexo dos indivíduos 1 e 4 macroscopicamente, enquanto o sexo do 5, apenas ao microscópio. Através das análises macro e microscópica constatou-se predomínio de tecido do parasita, com folículos remanescentes e esporocistos com dominância de cercárias maduras.

Nos dois casos foram encontrados animais emaciados, com redução do tecido conjuntivo interfolicular, provavelmente por desgaste nutricional, e com tecidos rompidos pela saída das cercárias maduras. Nas câmaras branquiais observaram-se muitos esporocistos repletos de cercárias maduras.

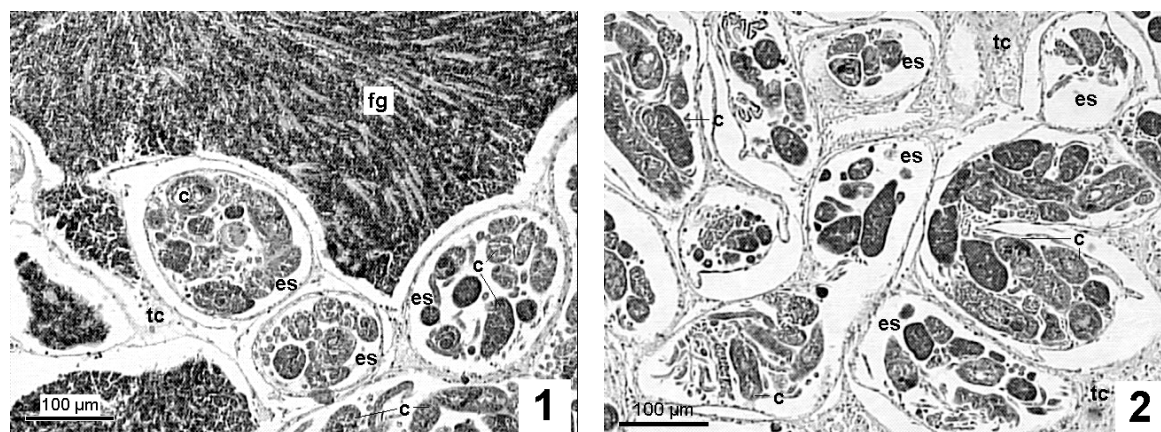


Figura 1. Intensidade de bucefalose em *Perna perna*: (1) M – moderada, (2) P – pesada. Legenda: fg- foliculo da gônada; es- esporocisto; c- cercária; tc- tecido conjuntivo.

CONCLUSÃO

O protocolo sugerido para diagnóstico de bucefalose, também denominada “enfermidade laranja”, em mexilhões inclui: exame macroscópico das partes moles; secções transversais inclinadas da massa visceral (brânquias, manto, intestino e glândula digestiva); fixação das peças em solução de Davidson marinho por 24 a 48 h; transferência para álcool 70°; procedimentos histológicos clássicos de desidratação (álcool 70°, 90° e 100°); diafanização; inclusão em parafina; cortes de 3 µm de espessura; coloração com HHE. Análise microscópica e, se necessário, quantificação da infestação devem ser realizadas com estereologia. Sugere-se a seguinte classificação para expressar a intensidade da infestação em porcentagem de tecido do parasita (TP) encontrado no manto do mexilhão: leve (L), < 5%; moderada (M), 5–50%; e pesada (P), >50%.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Moluscos Marinhos do Departamento de Aqüicultura da UFSC, por ter fornecido os animais utilizados no experimento. Este trabalho teve financiamento da CAPES, através de Bolsa de Mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, B. 1965 Biología y parasitología del mejillon gallego. *Las Ciencias*, 30(2): 107-118.
- ALVES, D.; PARAGUASSÚ, A.R.; LUQUE, J.L. 2004 Metazoários parasitos da abrótea, *Urophycis brasiliensis* (Kaup, 1858), (Osteichthyes: Phycidae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 13(1): 49-55.

- AMATO, J.F.R. 1982 Digenetic trematodes of percoid fishes of Florianópolis, southern Brasil-Bucephalidae. *Rev. Brasil. Biol.*, 42(4): 667-680.

- ARAÚJO, C.M.Y. 2001 *Biologia reprodutiva do berbigão Anomalocardia brasiliiana na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé*. São Paulo. 204p. (Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo).

- ARAÚJO, C.M.Y.; FERREIRA, J.F.; MAGALHÃES, A.R.M. 1993 Análise quantitativa de cortes histológicos do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) através da utilização do método de estereologia. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 13., Rio de Janeiro, 20-23/7/1993. *Anais...* p.34.

- BEÇAK, W. e PAULETTE, J. 1976 *Técnicas de citologia e histologia*. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos. 305p.

- BLATEAU, D.; Le COGUIC, Y.; MIALHE, E.; GRIZEL, H. 1992 Mussel (*Mytilus edulis*) treatment against the red copepod *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture*, Amsterdam, 107(2-3): 165-169.

- BONDAD-RENTASO, M.G.; MACGLADDERY, S.E.; EAST, I.; SUBASINGHE, R.P. 2001 Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fish. Tec. Paper*, Roma, 402(Suplement 2): 1-240.

- BOWER, S.M. e FIGUERAS, A.J. 1989 Infectious diseases of mussels, especially pertaining to mussel transplantation. *World Aquaculture Review*, 20(4): 89-93.

- BOWER, S.M.; MCGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. 1994 Synopsis of infection diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 4: 1-199.
- BURRESON, E.M. e CALVO, L.M.R. 1996 Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.*, 15: 17-34.
- CACERES-MARTÍNEZ, J. e FIGUERAS, A. 1995 The mussel, oyster, clam and pectinid fisheries of Spain. In: MACKENZIE JR., C.L.; BURREL JR., V.G.; ROSENFELD, A.; HOBART, W.L. (Ed.). *The history, present condition and the future of the molluscan fisheries of north and central America and Europe*. Seattle: Europe National Oceanic and Atmospheric Administration. p.165-190.
- CALVO-UGARTEBURU, G. e MCQUAID, C.D. 1998a Parasitism and introduced species: epidemiology of trematodes in the intertidal mussels *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 220: 47-65.
- CALVO-UGARTEBURU, G. e MCQUAID, C.D. 1998b Parasitism and invasive species: effects of digenetic trematodes on mussels. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 169: 149-163.
- CASAS, M.G. 1986 *Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) (Linné, 1758) na Ilha de Santa Catarina*. Florianópolis. 37p. (Trabalho para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina).
- CHAVES, N.D. e LUQUE, J.L. 1998 Trematódeos digenéticos parasitos de *Menticirrhus americanus* (Osteichthyes: Sciaenidae) no litoral do estado do Rio De Janeiro, Brasil. *Parasitol. día, ene.*, 22(1-2): 33-37.
- CHENG, T.C. 1978 *Parasitología General*. 2. ed. Madrid: Editorial AC. 965p.
- CHENG, T.C.; SULLIVAN, J.T.; HOWLAND, K.H.; JONES, T.F.; MORAN, H.J. 1983 Studies on parasitic castration: soft tissue and shell weights of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca) parasited by larval trematodes. *J. invertebr. pathol.*, 42: 43-150.
- DAVEY, J.T. e SCULLARD, C. 1978 Physiological responses of *Mytilus edulis* L. to parasitic infestation by *Mytilicola intestinalis*. *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 38(1): 12-17.
- ELSTON, R.A. 1990 *Mollusc diseases. Guide for the shellfish farmer*. Seattle: University of Washington Press. 73p.
- FIGUERAS, A.J. e FIGUERAS, A. 1987 La patología de moluscos y la acuicultura. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.*, 10: 11-29.
- FIGUERAS, A.J. e VILLALBA, A. 1988 Patología de moluscos. In: MONTEROS, J.E. e LABARTA, U. (Ed.). *Patología en acuicultura*. Madri: Feuga. p.327-389.
- FUENTES, J.; MOLARES, J.; VILLALBA, A. 1998 Growth, mortality and parasitization of mussels cultivated in the Ría de Arousa-NW Spain, from two sources of seed: intertidal rocky shore vs. collector ropes. *Aquaculture*, Amsterdam, 162: 231-240.
- GARCIA, P. 1990 *Estudo do ciclo gonadal do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia) na região do Pântano do Sul, Ilha de Santa Catarina, SC*. Florianópolis. 47p. (Trabalho para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina).
- GRIZEL, H.; MIALHE, E.; CHAGOT, D.; BOULO, V.; BACHÈRE, E. 1988 Bonamiosis: a model study of diseases in marine molluscs. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 18: 1-4.
- Heasman, M.P.; O'CONNOR, W.A.; FRAZER, A.W.J. 1996 Digenean (Bucephalidae) infections in commercial scallops, *Pecten fumatus* Reeve, and doudhboy scallops, *Chlamys (Mimachlamys) asperrima* (Lamarck) in Jervis Bay, New South Wales. *J. Fish Dis.*, 19(5): 333-339.
- HENRIQUES, M.B. 2004 *Resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo*. Rio Claro. 113p. (Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista).
- HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. 2004 *Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans*. NOAA Technical

- Memorandum NOS NCCOS*, Oxford, 5: 1-218.
- ITIS 2005 *Integrated Taxonomic Information System*. Disponível em: <http://www.itis.usda.gov/whatsnew.html> Acesso em: 20/set./2005.
- JONSSON, R. e ANDRÉ, C. 1992 Mass mortality of the bivalve *Cerastoderma edule* on the Swedish west coast caused by infestation with the digenean trematode *Cercaria cerastodermae* I. *Ophelia*, 36(2): 151-157.
- KHAMDAN, S.A.A. 1998 Occurrence of *Bucephalus* sp. trematode in the gonad of the pearl oyster, *Pinctada radiata*. *Environ. Int.*, 24(1-2): 117-120.
- KIM, Y. e POWELL, E.N. 2004 Surfclam hispotopatology survey along the Delmarva mortality line. *J. Shellfish Res.*, 23(2): 429-441.
- KINNE, O. 1983 Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: _____ (Ed.). *Diseases of Marine Animals, Introduction Bivalvia to Scaphopoda*. v.2. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. 961p.
- KUMAR, A.B. 2000 Foulers, borers, and parasites associates with *Crassostrea madrasensis* (Preston) cultured in Ashtamudi Lake, Kerala, India. In: INTERNATIONAL CONGRESS AND WORKSHOP OF THE TROPICAL MARINE MOLLUSC PROGRAMME, 11., India, 28/set.-8/out./2000. Spec. Publ. Phuket Mar. Biol. Cent. v.25, p.1-28.
- LASIAK, T. 1989 The prevalence of *Proctoeces* (Trematoda: Fellodistomidae) metacercarial infections in the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae) around the southern African coast. *S.-Afr. J. Zool.*, 24(3): 178-186.
- LASIAK, T. 1992 Bucephalid trematode infections in mytilid bivalves from the rocky intertidal of southern Chile. *J. Mollus. Stud.*, 58: 29-36.
- LASIAK, T.A. 1993 Bucephalid trematode infections in the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). *S. Afr. J. Marine Sci.*, 13: 127-134.
- LAUCKNER, G. 1983 Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: KINNE, O. (Ed.). *Diseases of Marine Animals, Introduction Bivalvia to Scaphopoda*. v.2. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. p.477-961.
- LAURELLE, F.; MOLLOY, D.P.; ROITMAN, V.A. 2002 Histological analysis of trematodes in *Dreissena polymorpha*: their location, pathogenicity, and distinguishing morphological characteristics. *J. Parasitol.*, 88(5): 856-863.
- LIMA, F.C.; ABREU, M.G.; MESQUITA, E.F.M. 2001 Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53(2): 1-5.
- LOWE, D.M. e MOORE, M.N. 1985 Cytological and cytochemical procedures. In: BAYNE, B.L. et al. (Ed.). *The effects of stress and pollution on marine animals*. New York: Preager Sci. p.179-204.
- LUNETTA, J.E. 1969 Fisiologia da reprodução de mexilhões (*Mytilus perna* L. Mollusca Lamellibranchia). *Bol. Zool. Biol. Mar.*, 26: 33-111.
- MAGALHÃES, A.R.M. 1998 *Efeito da parasitose por Trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição do mexilhão Perna perna (L.)*. São Paulo. 185p. (Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo).
- MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F.; SALOMÃO, L.C. 1999 Incidence and effect of the parasite Trematoda Bucephalidae on the reproduction of the Brazilian mussel *Perna perna*, natural and cultured. In: AQUACULTURE ON THE RISE AMERICA' 99, Tampa, 27-30/jan./1999. *Book of Abstracts...* Tampa: World Aquaculture Society. p.109.
- MAGALHAES, A.R.M.; PIMPÃO, D.M.; ALVES, R.; SARTOR, F.; BECKER, A.P. 2000 Parasitismo em mexilhões de estoques naturais na Ilha de Santa Catarina-SC-Brasil. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 2.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 6., Florianópolis, 3-6/out./2000. *Anais...* Florianópolis: Elapoa/Embrapoa. v. único, p.4.
- MARENZI, A.W.C.; BIU, C.C.; WOJCIECHOWSKI JR, E.; GOMES, R.O.M. 1998 Monitoramento do parasitismo de bucephalideos em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) no litoral centro norte de Santa Catarina, BR. In: SEMANA NACIONAL DE OCENOGRAFIA, 11., Rio Grande, 18-24/out./1998. *Anais...* Rio Grande. v.9, p.658-659.

- OIE 2003 *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Paris: OIE. [on line]. Disponível em: http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_summry.htm. Acesso em: 16/fev./2005.
- OLIVEIRA NETO, F.M. 2005 *Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina*. Florianópolis: EPAGRI. 67p.
- OLSEN, O.W. 1974 *Animal Parasites – their life cycles and ecology*. Baltimore: University Park Press. 562p.
- PEREIRA JR., J.; ROBALDO, R.B.; SOUTO-RAITER, V.M.M. 1996 Um possível ciclo de vida de *Bucephalus varicus* Manter, 1940 (Trematoda: Bucephalidae) no Rio Grande do Sul. *Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia Pontifícia Universidade Católica do RS*, 9(1): 31-36.
- POLENTA, R. e FROGLIA, C.P. 1997 Preliminary data on the Trematoda Digenea observed in the clam *Paphia aurea* from the Adriatic Sea. *Biol. Mar. Mediterr.*, 4(1): 431-432.
- POLI, C.R. 1998 *Situação atual do cultivo de moluscos marinhos em Santa Catarina*. Florianópolis: Blue Water Aquaculture LTDA. Disponível em: <http://www.dwa.com.br>. Acesso em: 25 /set./2004.
- PRINCEP, M ; BIGAS, M.; DURFORT, M. 1996 Incidence of *Bucephallus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) (Trematoda, Digenea) in the digestive gland of *Ostrea edulis* Linné. *Iberus*, 14(2): 211-220.
- ROBALDO, R.B. 1995 *Parasitos digenéticos do camarim *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) cultivado em Itamaracá, PE, Brasil*. Recife. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco). Disponível em: <http://www.octopus.furg.br/pesquisa/publicacoes/fisiologia/teserobaldo/teserobaldo.html>. Acesso em: 23/ago./2005.
- SABRY, R.C. 2003 *Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC*. Florianópolis. 39p. (Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina).
- SAS INSTITUTE INC. 1999 SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SILVA, P.M. da 1999 *Estudo da infecção de *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) no mexilhão *Perna perna* e de algumas reações imunológicas induzidas pelo parasita*. Florianópolis. 120p. (Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina).
- SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F. 1996 Infestation of *Perna perna* mussel (Bivalvia: Mytilidae) by digenetic trematodes of the family Bucephalidae, *Bucephalus* genus, in Brasil. *J. Med. Appl. Malacol.*, 8(1): 25.
- SILVA, P.M. da; MAGALHÃES, A.R.M; BARRACCO, M.A. 2002 Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratones Grande Island, Brazil. *J. Invertebr. Pathol.*, 79: 154-162.
- TURNER, H. 1985 Parasites of eastern oysters from subtidal reefs in a Louisiana Estuary with a note on their use as indicators of water quality. *Estuaries*, 8(3): 323-325.
- UMIJI, S.; LUNETTA, J.E.; LEONEL, R.M.V. 1976 Infestation of the mussel *Perna perna* by digenetic trematodes of the Bucephalidae family, gen. *Bucephalus*. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 47(Supl.): 115-117.
- WALKER P. e SUBASINGHE, R.P. 2000 DNA-based molecular diagnostic techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, Roma, 395: 1-93.
- WINSTEAD, J.T.; VOLETY, A.K.; TOLLEY, S.G. 2004 Parasitic and symbiotic fauna in oysters (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and estuary in Florida. *J. Shellfish Res.*, 23(3): 831-840.