

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO CICLO EVOLUTIVO DA **PHYSALOPTERA PRAEPUTIALIS** VON LINSTOW, 1889 (**NEMATODA: SPIRUROIDEA**) (*)

HUGO ZAGO FILHO

INTRODUÇÃO

Poucos são os trabalhos sobre o ciclo evolutivo das espécies do gênero *Physaloptera* Rudolphi, 1819 e gêneros afins; por isto, os conhecimentos acumulados até agora são ainda fragmentários e incompletos. Mesmo no caso da *P. rara* Hall e Wigdor, 1918 e da *P. hispida* Schell, 1950, que são as mais bem estudadas sob este ponto de vista, ainda não se conhecem as diversas fases de desenvolvimento no hospedeiro definitivo.

Devem-se a Alicata (1) as primeiras observações sobre o ciclo evolutivo destes parasitas. Conseguiu este autor infestar experimentalmente exemplares de *Blatella germanica* (L.), alimentando-os com ovos de *P. turgida* Rudolphi, 1819, parasita do gambá *Didelphis virginiana*, e observar o desenvolvimento de larvas até terceiro estágio em cistos localizados nos tecidos que circunscrem a cavidade geral do inseto. Por outro lado, tentou infestar experimentalmente o cão, o gato, o coelho, a cobaia, o rato e o pinto, ministrando-lhes larvas encistadas em terceiro estágio. À necropsia, praticada um mês depois, observou larvas, ainda no terceiro estágio, aparentemente fixadas à parede do estômago do gato e do coelho e encistadas na parede do estômago do rato.

Hobmaier (2) também conseguiu infestar o mesmo inseto com ovos de *P. maxillaris* Mollin, 1860, parasita da do-

ninha, e obter larvas em terceiro estágio, ao fim de quatro a seis semanas. Diz que o seu desenvolvimento é idêntico ao da *P. turgida*. Tentou infestar gatos, cães e cobaias, alimentando-as com baratas parasitadas, mas nada conseguiu.

Petri (8) infestou a *Blatella germanica* com ovos de *P. rara* Hall e Wigdor, 1918, parasita do cão e outros carnívoros, e estudou, com detalhes, o desenvolvimento das larvas até terceiro estágio. Assinala que o encistamento ocorre exclusivamente no intestino posterior. Ministrando larvas a um gato e um cão e sacrificando-os cerca de um mês depois, encontrou no gato dois helmintos imaturos e no cão numerosos machos e fêmeas, também imaturos. Por outro lado, conseguiu larvas em terceiro estágio em um coleoptero, o *Tribolium confusum*, e informa que Meinkoth (1950) acompanhou todo o desenvolvimento da *P. turgida* neste inseto.

Petri e Ameel (9), conseguiram infestar gatos com larvas encistadas da *P. rara* e observar helmintos sexualmente maduros 83 dias depois. Assinalam ainda que obtiveram larvas em terceiro estágio do mesmo parasita em *Gryllus (Acheta) assimilis* (*), *Tribolium confusum* e *Harpalus sp.* Por outro lado, mencionam haver observado em *Blatella germanica*, *Gryllus (Acheta) assimilis* (**) e *Centophilus sp.*

Finalmente, Schell (11), trabalhando com a *P. hispida* Schell, 1950, parasita do rato do algodão, *Sigmodon his-*

Departamento de Parasitologia (Diretor: Prof. M. P. Barretto), Fac. Med. Ribeirão Preto, U.S.P., S. Paulo.

(*) Apresentado como tese de Doutorado à Fac. Med. Vet., U.S.P., S. Paulo, e aprovado com distinção, grau 10.

(**) Em trabalhos anteriores empregamos o nome *Gryllulus* Uvarov, 1935; entretanto, face a *Opinion* 299 da I.C.Z.N. (6), passamos a usar a designação *Gryllus (Acheta) assimilis* (Fabr., 1775).

pidus littoralis, infestou *Blatella germanica* e estudou detalhadamente o desenvolvimento das larvas neste hospedeiro. Demais, infestou 11 ratos daquela espécie, nos quais observou, primeiro, a fixação das larvas, mais tarde, a copula de helmintos adultos e, finalmente, a eliminação de ovos com as fezes, 73 a 90 dias depois da infestação. Mas não conseguiu surpreender as mudas e acompanhar a sucessão dos estádios. Por outro lado, tentou infestar outros roedores, como *Peromyscus sp.*, *Oryzomys palustris notatus*, *Rattus norvegicus* e rato branco. Só conseguiu resultados positivos com dois ratos brancos, um dos quais se mostrou parasitado por formas imaturas, 54 dias depois, e outro cujas fezes se tornaram positivas 85 dias após a infestação.

Em 1954, desconhecendo o trabalho de Petri e Ameel (9) que apenas foi apresentado em resumo na reunião da American Society of Parasitologists, demos início ao estudo do ciclo evolutivo de *P. praeputialis*, que se mostrava muito frequente nos gatos, *Felis catus domesticus* L., do município de Ribeirão Preto, como mostramos em trabalho anterior (14).

Depois de uma serie inicial de tentativas de infestações de diversos insetos, tais como baratas, coleopteros e grilos, insetos estes que eram observados frequentando fezes de gato colocadas em armadilhas, havíamos deparado com o *Gryllus (A.) assimilis* como bom hospedeiro quando tivemos conhecimento do referido resumo do trabalho de Petri e Ameel (9). Neste resumo, em que relatam o estudo do ciclo evolutivo da *P. rara*, referem, de passagem, haver obtido larvas em terceiro estadio da *P. praeputialis* em *B. germanica*, *Centophilus sp.* e *G. (A.) assimilis*, como já dissemos.

Na revisão bibliografica realizada não encontramos este trabalho publicado na integra, mas só o de Petri (7), sobre a *P. rara*, no qual o autor diz que as observações ali relatadas deveriam fazer parte de uma tese de doutoramento, a ser apresentada ao Kansas States College. Pensamos, então, que as pesquisas mais detalhadas sobre o ciclo da *P. praeputialis* fizessem parte da referida tese que procuramos obter

Para grande surpresa nossa, informou-nos o Dr. Leo H. Petri (8), em carta datada de 2 de maio de 1955, que suas investigações sobre esta espécie não haviam tido prosseguimento por falta de material e que os resultados, que até então obtivera, foram aqueles que faziam parte do resumo já citado.

Certos, assim, de que o estudo do ciclo da *P. praeputialis* praticamente estava ainda por ser feito, e de que, com o material à nossa disposição, poderíamos contribuir para o conhecimento do ciclo das fisalopteridas no hospedeiro vertebrado, resolvemos dar prosseguimento às nossas pesquisas.

Cumpre-nos assinalar que adotamos o nome generico, *Physaloptera* Rudolphi, 1819 e não *Clamydonema* Hegt, 1910, estribados no trabalho de revisão da subfamilia *Physalopterinae* feito por Morgan (4).

Antes de entrar na exposição de nosso trabalho, queremos deixar consignados nossos melhores agradecimentos ao Prof. Angelo da Costa Lima, que gentilmente classificou o material de grilos com que trabalhamos, e ao Prof. Geraldo Garcia Duarte, que, com extrema boa vontade, nos orientou na análise estatística dos resultados. Queremos também agradecer ao Prof. J. L. Pedreira de Freitas a leitura dos manuscritos e as sugestões apresentadas.

MATERIAL E METODOS

I. FEMEAS ADULTAS E OVOS. —

1. *Obtenção de material.* As femeas empregadas em nossas experiencias foram retiradas do estomago de gatos naturalmente infestados que, uma vez trazidos para o laboratorio, eram sacrificados pelo eter e necropsiados. Como os vermês estão solidamente fixados à mucosa gastrica, geralmente fizemos a dissecação desta no ponto de fixação, afim de evitar qualquer traumatismo. Uma vez colhidas, as femeas eram mantidas em solução fisiologica.

Os ovos destinados à infestação do hospedeiro intermediario foram obtidos por postura de femeas em solução fisiologica à temperatura ambiente. Aproveitando o material de que dispunhamos, resolvemos estudar o numero de ovos por postura e o numero de ovos

que uma fêmea pode albergar no momento em que é retirada do estomago do hospedeiro definitivo.

A postura foi sempre conseguida em solução fisiologica, dentro de placas de Petri cobertas e mantidas, umas à temperatura ambiente, que variou de 18°C a 21°C durante as observações, e outras na estufa a 37°C. O periodo de observação nunca foi inferior a 12 horas, limite alem do qual nenhuma fêmea continuou a por ovos, embora permanecessem vivas, às vezes, por muito tempo ainda.

Os ovos contidos no interior das fêmeas foram obtidos sempre por dissecação dos uteros. A tecnica empregada na retirada destes consiste no seguinte:

Corta-se a cuticula em torno da vulva com uma tesoura de ponta fina e curva, fixa-se a extremidade da fêmea com um estilete, apreende-se a parte seccionada com uma pinça fina e, com movimentos suaves, tracciona-se o aparelho reprodutor, que sai intacto e é colocado sobre um vidro de relógio contendo solução fisiologica; os ovarios e oviductos são seccionados e desprezados, e a parte restante é cuidadosamente fragmentada com auxilio de uma tesourinha e sob controle microscopico, até que todos os ovos fiquem livres.

2. *Tecnica de contagem de ovos.* Depois de inumeras tentativas com varias soluções em diferentes concentrações, concluímos que a melhor é uma solução de sacarose comercial com densidade igual a 1,110. Nela os ovos não só se distribuem bem, dando uma suspensão homogenea, como também não se alteram, permitindo a contagem em condições otimas, com reconhecimento das varias fases do embrionamento.

A tecnica de contagem adotada foi a seguinte:

Os ovos obtidos por postura ou por dissecação dos uteros são transferidos, com a solução fisiologica, para um tubo de ensaio; o recipiente onde estavam é lavado uma ou mais vezes, até que, ao exame ao microscopio entomologico se verifique que todos os ovos tenham sido removidos; a agua é acrescentada ao tubo de ensaio; este é, então, centrifugado a 2.500 r.p.m., du-

rante 3 minutos o sobrenadante é decantado. Ao sedimento adicionam-se 10 ml da solução de sacarose, agita-se vigorosamente até se obter uma suspensão homogenea e retiram-se três porções iguais a 0,1 ml. que são colocadas sobre três laminas quadriculadas e cobertas com laminulas de 24x32 mm. Contam-se todos os ovos de cada preparado e tira-se a media das contagens.

Na analise estatistica dos resultados das contagens, preferimos não usar a media e o desvio padrão em virtude da grande variabilidade. Usamos a mediana, calculando os intervalos de confiança ao nivel de 95%, com auxilio da tabela de Nair (5).

3. *Estudo da resistencia dos ovos.* Para verificar a sua resistencia no meio exterior, ovos embrionados postos por fêmeas em solução fisiologica, depois de concentrados, foram distribuidos em placas de Petri contendo fezes, misturas em partes iguais de fezes e carvão vegetal, e finalmente pão; também conservamos ovos em solução fisiologica em vidros fechados para evitar a evaporação e consequente aumento de concentração do meio.

Procuramos usar estes meios porque desejavamos saber, primeiro a resistencia dos ovos embrionados em condições proximas das naturais; daí a conservação em fezes. A adição de carvão vegetal visou impedir a putrefação e desenvolvimento de cogumelos. O pão foi empregado porque este foi o alimento que contaminamos com ovos para infestar o hospedeiro intermedio, como veremos adiante. Finalmente a solução fisiologica foi usada porque desejavamos saber durante quanto tempo poderíamos conservar ovos viaveis em estoque no laboratorio.

Todos estes meios, exceto naturalmente a solução fisiologica, foram mantidos secos ou umidos. Por outro lado, trabalhamos em temperaturas diversas: ambiente, de geladeira a 4 °C e de estufa a 28°C.

De quatro em quatro dias as "culturas" eram examinadas ao microscopio para verificação do aspecto morfologico dos ovos. Uma porção do material de cada uma era ministrada a, no minimo,

dois grilos criados em laboratório, que eram mortos e examinados quatro dias depois. Julgamos indispensável este teste de viabilidade porque o aspecto morfológico e outros recursos não dão segurança.

4. *Verificação do embrionamento no meio exterior.* — Para verificar a possibilidade de embrionamento dos ovos no meio exterior, partimos de ovos não embrionados colhidos por dissecação na parte distal dos uteros nas proximidades dos ovários. Estes ovos foram mantidos nos mesmos meios acima referidos, exceto o pão, e conservados nas mesmas condições de temperatura assinaladas.

Os ovos assim conservados eram examinados diariamente ao microscópio.

5. *Estudo morfológico dos ovulos e ovos.* — O estudo morfológico dos ovulos foi feito em material colhido por dissecação de fêmeas não fecundadas presentes em casos de infestações experimentais, onde não foram observados machos.

A evolução dos ovos no interior da fêmea foi acompanhada ao exame de segmentos isolados do aparelho genital. Este, após dissecação, era distendido sobre uma lamina e em seguida seccionado em fragmentos de 0.5 cm, desde o ovario até a vagina. Os segmentos eram transportados para laminas individuais, dilacerados em solução fisiológica e examinados entre laminas e laminula.

Para o estudo das larvas contidas nos ovos embrionados estes eram rompidos mecanicamente entre lamina e laminula; provocamos também a ruptura dos ovos colocando-os em solução hipertônica de cloreto de sódio, mas esta técnica tem o defeito de, com frequência, alterar a morfologia das larvas, mesmo quando estas já estão completamente desenvolvidas.

II. O HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO.

1. *Material empregado.* Usamos como hospedeiro intermediário o *Gryllus (A.) assimilis* (Fabricius, 1775) que, em uma série inicial de experiências, se tinha mostrado material muito favorável.

Usamos grilos jovens e adultos de ambos os sexos e capturados em natureza ou criados em laboratório. Nas tentativas iniciais e enquanto estabelecíamos colônias em cativeiro, trabalhamos com grilos capturados em natureza. Como, porém, verificássemos, logo depois, que vários exemplares se mostravam naturalmente infestados por larvas de *P. praeputialis*, passamos a nos servir de grilos capturados em natureza apenas para a obtenção de larvas destinadas a infestar gatos, e assim mesmo em experiências preliminares. Isto porque aos gatos só ministrávamos larvas isoladas por dissecação e, por conseguinte, identificadas quanto à espécie e estágio evolutivo; assim, não havia possibilidade de erro na interpretação dos dados obtidos durante a evolução do helminto no hospedeiro definitivo.

Para acompanhar as fases do ciclo evolutivo no grilo só empregamos insetos criados em laboratório a prova de infestação. A técnica usada nesta criação foi a descrita abaixo.

2. *Técnica de criação de grilos.* — Cinco a dez casais de adultos são colocados em cristalizadores de vidro de 24 x 32 cm, tendo no fundo uma camada de 10 cm de areia esterilizada e umedecida; estes cristalizadores são fechados com tampa de tela a prova de insetos e os grilos são alimentados com pão seco e isento de contaminação. Nestas condições as fêmeas efetuam a postura na areia, a uma certa distância da superfície.

Uma vez aparecidas as primeiras ninfas, os adultos são removidos dos cristalizadores e, de dois em dois dias, as ninfas nascidas são transferidas para cristalizadores de 14 x 19 cm, em lotes de 40 exemplares por recipiente. Nestas condições são alimentadas com pão seco.

Atingida a idade de dois meses, as ninfas são transferidas para frascos de Borrel medindo 5 x 4 cm, e deixadas em jejum até o momento da infestação.

3. *Infestação dos grilos.* — Para infestar grilos usamos ovos postos por fêmeas em solução fisiológica. Estes ovos são concentrados por centrifugação e reunidos em um pequeno bequer com

um pouco de solução fisiológica e misturados com farinha de pão até a obtenção de uma massa pastosa; a fim de conseguir distribuição homogênea dos ovos no alimento, a mistura é feita com um agitador elétrico.

Com a massa assim obtida confeccionam-se pequenos bolos destinados a infestação dos grilos. Duas técnicas foram seguidas:

a) Quando não tínhamos necessidade de precisar a hora exata da ingestão de ovos, aos grilos, contidos em frascos de Borrel e mantidos em jejum por cinco dias, oferecíamos uma pequena porção de alimento infestado, que permanecia à disposição deles durante 36 horas. Durante este prazo, via de regra, os grilos devoraram todo o alimento oferecido, mas quer isto acontecesse ou não, os insetos eram transferidos para frascos de Borrel limpos.

b) Desde que, porém, tivéssemos necessidade de conhecer a hora exata da infestação, a técnica de alimentação foi a seguinte:

O grilo em jejum é contido entre o polegar e o indicador da mão esquerda, de modo que a face ventral fique voltada para cima e a cabeça livre e dirigida para o operador; com auxílio de uma espátula de madeira de dimensões apropriadas, toma-se uma porção da massa alimentar e coloca-se entre as peças bucais do inseto. Este, estando em jejum, devora rapidamente o alimento oferecido, até que se sacie.

Uma das duas técnicas, conforme o caso, foi seguida para a infestação, tanto de grilos criados em laboratório quanto capturados em natureza. Nunca usamos o processo mencionado por alguns autores, isto é, de colocar uma porção de alimento infestado dentro dos recipientes onde se acham os grilos e aí deixá-lo até que seja totalmente comido. Isto não só faz com que o período de infestação seja longo e prejudique as observações sobre a duração do ciclo, como também e principalmente, cria a possibilidade de superinfestações por meio de ovos que contaminaram o substrato.

4. *Manutenção de grilos infestados.* — Uma vez infestados e colocados em frascos limpos e contendo areia esterilizada e umedecida, os grilos são alimentados com pão seco e esterilizado.

Assim são mantidos em observação, registrando-se as condições de temperatura diariamente.

5. *Dissecção dos grilos.* — Uma vez infestados, os grilos eram sacrificados dentro de intervalos de tempo desejados; para acompanhar as primeiras fases da evolução, isto é, trânsito dos ovos no intestino, saída da larva do interior do ovo e sua penetração e localização no intestino do hospedeiro, sacrificávamos os grilos de 30 em 30 minutos; para observação das fases posteriores os grilos eram necropsiados com intervalos de 24 horas. Três insetos, pelo menos, eram sacrificados de cada vez; dois para fornecer dados de observação direta ao microscópio e material para estudo morfológico das larvas e um para fornecer material destinado a cortes histológicos.

A técnica de dissecção é a seguinte: O grilo, decapitado ou morto pelo éter, é colocado com a face ventral para cima sobre uma lâmina tendo algumas gotas de solução fisiológica. Com um estilete de ponta curva fixa-se o inseto ao nível da junção toraco-abdominal e, com outro, secciona-se a cutícula ao nível do VII ou VIII uromero. Em seguida, com este mesmo estilete, traçiona-se a parte caudal seccionada; o tubo digestivo sai preso a ele e o conjunto assim retirado é transferido para uma lâmina limpa. O intestino posterior é, então, dissecado com auxílio dos dois estiletos. As larvas, quando grandes, são transferidas para nova lâmina limpa; quando isto não é possível, os vários fragmentos que não interessam são removidos, ficando as larvas na mesma lâmina.

Durante nossas experiências, usamos 368 grilos criados em laboratório e 800 capturados em natureza. Os primeiros constituem os lotes que designaremos aqui sob os números 27, 29 e 30 e que incluem 113, 35 e 220 grilos respectivamente; o lote 30 foi utilizado no estudo detalhado das várias fases do ciclo evolutivo da *P. praeputialis*, fornecendo inclusive material para estudo morfológico das larvas; os lotes 27 e 29 serviram para verificar os efeitos da temperatura e da idade do inseto sobre a du-

ração do ciclo no hospedeiro intermediário.

Dos grilos capturados em natureza, utilizamos os lotes 7 e 11, contendo 147 e 124 exemplares respectivamente, para verificar ainda a duração do ciclo em diferentes temperaturas. Os outros serviram para a obtenção de larvas destinadas a infestar gatos e fornecer dados adicionais sobre a morfologia.

III. O HOSPEDEIRO DEFINITIVO. 1. *Obtenção e manutenção dos animais.* Os gatos destinados a fornecer helmintos usados em nossas experiências foram capturados em vários pontos da cidade. Zago e Barretto (14).

Os destinados à infestação experimental foram criados em laboratório. As gatas prenhes mantidas no laboratório, quando se aproximava a época da parição, eram transferidas para gaiolas de tela metálica fina e a prova de insetos. Nestas gaiolas eram mantidas com os filhotes até à desmama destes, tendo-se sempre a preocupação de limpar cuidadosamente as gaiolas, inspecioná-las frequentemente e expurgá-las periodicamente. O ambiente foi constantemente liberto de insetos mediante o uso de inseticidas periodicamente.

Aos dois meses de idade, os gatinhos eram desmamados, identificados numericamente e mantidos em condições idênticas às acima descritas, numa ração padronizada de carne e leite, enquanto durassem as experiências.

2. *Infestação dos gatos.* Os gatos foram infestados com larvas de terceiro estádio, cerca de 20 dias após ter sofrido a segunda muda. Estas larvas, como dissemos, foram obtidas por dissecação de grilos e cuidadosamente controladas.

Cada gato recebeu um inóculo de 20 a 31 larvas que eram aspiradas com um conta-gotas e, em seguida, depositadas no fundo da cavidade bucal do gato. Para evitar que algumas larvas ficassem no conta-gotas, este era lavado com solução fisiológica, que era, em seguida, dada ao gato. Terminada a operação, o conta-gotas era inspecionado ao microscópio entomológico.

Ao todo usamos 20 gatos: 12 foram sacrificados 18 e 26 horas e 5, 10, 17, 20, 23, 27, 45, 65, 75 e 95 dias após a

infestação. Os outros foram deixados até o aparecimento de ovos nas fezes, reveláveis pelo método da sedimentação em água, que foi o que melhores resultados forneceu. Cinco gatos foram, assim, observados; os três restantes, que se mostravam ainda negativos 158 dias após a infestação, foram sacrificados.

Durante a necropsia, observávamos sempre o comportamento dos parasitas e, em seguida, retirávamos o material, se necessário por dissecação.

IV. TÉCNICA DE ESTUDO DAS FORMAS EVOLUTIVAS: — As larvas obtidas por dissecação do intestino posterior do grilo, em número mínimo de 30, eram mortas pelo calor de uma lâmpada de álcool, sob uma laminula ou não, e fixadas com o fixador de Travassos (12).

As formas evolutivas retiradas do estômago do gato até o fim do terceiro estágio tiveram o mesmo tratamento. As de quarto estágio e os adultos, em vista da espessura e tamanho, foram fixados à quente naquele fixador e, quando necessário, clarificados pela adição do ácido acético na proporção de 20% ao fixador.

O material de grilos destinados a cortes histológicos foi ainda fixado no mesmo líquido de Travassos. Os fragmentos de estômago do gato foram fixados em formol. Um e outros foram incluídos em parafina e os cortes de 7 μ foram corados por hematoxilina-eosina.

As medidas efetuadas com ocular micrométrica, tanto nas larvas obtidas de grilos como nas formas presentes no estômago dos gatos, obedeceram ao esquema apresentado na figura 20:

- A = distância da extremidade cefálica à ponta da cauda.
- B = distância da extremidade cefálica ao anel nervoso.
- C = distância da extremidade cefálica à porção final do esôfago muscular.
- D = distância da extremidade cefálica ao poro excretor.
- E = distância da extremidade cefálica à junção esôfago-intestino.

F = distancia da extremidade cefalica ao primordio genital nas formas sexualmente indiferenciadas e à vulva nas femeas.

G = distancia da extremidade caudal ao anus.

H = largura ao nivel da união esofago-intestino.

I = largura ao nivel da cabeça.

J = comprimento dos espiculos dos machos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

I — OBSERVAÇÕES SOBRE O NUMERO DE OVOS E A POSTURA

Em certos casos encontram-se gatos parasitados exclusivamente por femeas que contêm somente ovulos. Foi o que tivemos a oportunidade de observar nos animais 3, 4 e 461, experimentalmente infestados e autopsiados respectivamente 161, 158 e 182 dias depois (Quadro X).

Pois bem, estas femeas são capazes de efetuar posturas quando colocadas em solução fisiologica, mas o numero de ovulos eliminados é sempre muito pequeno. Raramente ovos não fecundados aparecem nas fezes de gatos parasitados, capturados em condições naturais.

Os ovulos são elipsoides e medem 40,1 a 46,0 μ (media 41,8 \pm 1,1 μ) de comprimento por 23,0 a 27,6 μ (media 24,6 \pm 1,8 μ) de largura (Quadro I). Os existentes nos ovarios (fig. 1), são providos de casca fina e contêm no seu interior uma substancia amorfa e hiali-

na. Muito frageis, deformando-se facilmente pela simples pressão da laminula. Os do interior dos uteros mostram-se revestidos por casca de duplo contorno (fig. 2).

Normalmente os ovos embrionados são os unicos encontrados nas fezes dos gatos infestados, quer natural quer experimentalmente. Quando as femeas são colocadas em solução fisiologica eliminam estes ovos em maior ou menor numero.

São elipsoides (fig. 7) e medem 52,9 a 62,1 μ (media 57,2 \pm 2,2 μ) de comprimento por 32,2 a 41,4 μ (media 37,0 \pm 0,6 μ) de largura (Quadro I). Possuem casca hialina de duplo contorno e no seu interior uma larva completamente desenvolvida e enrolada.

As femeas gravidas quando colocadas em solução fisiologica, quer à temperatura ambiente, quer à temperatura constante de 37°C, iniciam a postura imediatamente, postura esta que se prolonga por algumas horas; em circunstancia alguma, porem, ovipõem depois de 12 horas, embora contenham muitos ovos embrionados nos uteros e possam viver até 72 horas.

Em 31 observações realizadas em placas de Petri fechadas e mantidas à temperatura ambiente, que durante as experiencias variou de 18 a 21°C, verificamos que o numero de ovos oscilou entre 2.100 e 19.060 (mediana: 4.540, intervalo de confiança (95%): 2.960 — 5.540). Os resultados obtidos são apresentados em detalhes no quadro II.

QUADRO I. DADOS BIOMETRICOS SOBRE OS OVULOS E OVOS EMBRIONADOS OU NÃO, EM μ

Tipo de célula	Dimensões	Minima	Maxima	Media	Amplitude de variação	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
ovulos	comp.	40,1	46,0	41,8	7,0	1,1	2,6
	largura	23,0	27,6	24,6	4,5	1,8	6,4
ovos embrionados	comp.	52,9	62,1	57,2	9,0	2,2	3,8
	largura	32,2	41,4	37,0	9,5	0,6	1,5
ovos não embrionados	comp.	52,9	62,1	58,8	9,0	3,2	5,5
	largura	32,2	40,1	34,7	8,0	1,4	4,0

QUADRO II. RESULTADOS DAS CONTAGENS DE OVOS

Nº da fêmea	Nº de ovos eliminados.	Nº de ovos embrionados restantes nos uteros	Total de ovos embrionados	Ovos não embrionados	Total Geral
1	2.740	28.600	31.340	223.500	254.850
2	2.360	8.200	10.940	79.800	90.740
3	2.320	26.000	28.320	164.500	192.820
4	5.540	17.000	22.540	162.000	184.540
5	4.380	18.000	22.380	165.000	187.380
6	9.560	20.400	29.960	78.700	108.660
7	2.620	31.500	34.120	220.000	254.120
8	5.000	13.000	18.000	155.000	173.000
9	19.060	11.500	30.560	98.000	128.560
10	4.540	31.500	36.040	195.500	231.540
11	3.840	27.400	31.240	128.700	159.940
12	9.080	16.000	25.080	114.000	139.080
13	4.980	16.500	21.480	156.500	177.980
14	6.600	32.800	39.400	122.000	161.400
15	5.960	11.500	17.460	146.500	163.960
16	4.800	45.500	50.300	161.000	211.300
17	4.700	11.500	16.200	147.800	164.000
18	4.460	12.000	16.460	77.500	93.960
19	2.360	16.500	18.860	65.500	84.360
20	7.060	51.900	58.960	156.000	214.960
21	3.400	15.000	18.400	120.000	138.400
22	2.100	14.000	16.100	123.500	139.600
23	2.420	24.500	26.920	75.500	102.420
24	7.620	13.000	20.620	108.000	128.620
25	2.580	15.500	18.080	127.000	145.080
26	2.140	10.000	12.140	100.500	112.640
27	2.960	19.500	22.460	161.500	183.960
28	16.400	29.000	45.400	248.000	293.400
29	5.340	21.500	26.840	126.000	152.840
30	3.800	17.500	21.300	95.000	116.300
31	7.380	17.000	24.380	125.500	149.880
Mx	19.060	51.900	58.960	248.000	293.400
Mn	2.100	8.200	10.940	65.500	84.360
Md	4.540	17.000	22.540	127.000	159.940
ICMd	2.960 -	15.000 -	18.400 -	114.000 -	138.400 -
(95%)	- 5.540	- 24.500	- 29.960	- 156.000	- 177.980

O numero de ovos embrionados restantes nos úteros, após a postura nas condições supracitadas, variou entre 8.200 e 51.900 (mediana: 17.000, intervalo de confiança (95%): 15.000 — 24.500) por fêmea. O exame do quadro II mostra que não ha, em cada caso, relação entre o numero de ovos embrionados postos e o numero dos que restam no interior da fêmea. Assim a fêmea 22, que pôs 2.100 ovos, possuía nos seus úteros 14.000 após a postura; a fêmea 28, que eliminou 16.400 ovos, ainda continha 29.000; a fêmea 2 pôs 2.360 ovos e possuía apenas 8.200 ovos maduros a serem eliminados. Em termos medios, porem, o numero de ovos embrionados que restam no interior da fêmea é cerca de quatro vezes o dos eliminados.

O total de ovos embrionados que uma fêmea pode albergar, representando a soma dos que foram postos e dos que permaneceram nos uteros, variou, nas nossas 31 observações, entre 10.940 e 58.960 (mediana: 22.540, intervalo de confiança (95%): 18.400 — 29.960).

Os ovos não embrionados (fig. 3) são elipsoides e medem 52,9 a 62,1 μ (media $58,8 \pm 3,2 \mu$) de comprimento por 32,2 a 40,1 μ (media $34,7 \pm 1,4 \mu$) de largura; mostram-se, assim, um pouco mais longos e estreitos que os ovos embrionados (Quadro I). Apresentam casca hialina de duplo contorno e no seu interior, ao exame a fresco, nota-se o embrião em diferentes fases de evolução (figs. 4, 5 e 6). Geralmente têm a parte interna mais clara e refringente que a externa.

Estes ovos não são eliminados pelas fêmeas em condições experimentais: em 142 observações feitas nunca verificamos o fato. Neste particular, a *P. praeputialis* se comporta como a *P. rara*, estudada por Petri (7), a *P. maxillaris*, estudada por Hobmaier (2), e outras, mas de maneira diferente da *P. phrynosoma* (*Skjabinoptera phrynosoma*) em que os ovos, segundo Lee (3), são eliminados não embrionados e em capsulas ovigeras. Nas fezes de gatos podem ser esporadicamente encontrados, mas isto se deve à rutura de fêmeas no tubo digestivo do hospedeiro. Nos casos em que observamos o aparecimento

de ovos não embrionados nas fezes podemos sempre verificar a eliminação espontanea de fêmeas com as fezes do gato, no mesmo dia ou em dias anteriores.

O numero de ovos não embrionados contidos nos uteros variou, em nossas 31 observações, entre 65.500 e 248.000 (mediana: 127.000, intervalo de confiança (95%): 114.000 — 156.000).

O numero total de ovos (Quadro II), embrionados ou não, que uma fêmea pode conter variou, em nossas observações, entre 84.360 e 293.400 (mediana 159.940, intervalo de confiança (95%): 138.400 — 177.980).

II — EMBRIONAMENTO E VIABILIDADE DOS OVOS NO MEIO EXTERIOR

1. *Embrionamento no meio exterior.* Como dissemos, a *P. praeputialis* não elimina ovos não embrionados. Mas estes ovos, se forem postos em liberdade pela rutura da fêmea, podem embriionar-se no meio exterior, comportando-se, neste particular, como os da *P. phrynosoma* e outras.

Assim, ovos não embrionados, retirados por dissecação dos uteros de fêmeas, misturados a fezes de gato e conservados umidos, embrionaram-se em 25 dias, quando mantidos à temperatura ambiente, que variou durante as experiências, de 21°C a 23°C, e em 15 dias, quando mantidos em temperatura constante de 28°C.

Interessante é assinalar que a adição de carvão vegetal aos meios, tecnica aconselhada para se conseguir o embrionamento de ovos de outros helmintos, como os ancilostomidas ou o *Ascaris lumbricoides*, em cultura, não dá resultados satisfatorios no caso da *P. praeputialis*. Todas as vezes que acrescentamos carvão vegetal às fezes puras ou misturadas com terra, não conseguimos verificar o embrionamento. Parece, assim, que o carvão tem uma ação impediante direta ou, mais provavelmente, indireta, favorecendo o arejamento excessivo prejudicial aos ovos.

Por outro lado a presença de umidade é condição indispensavel ao embrionamento. Conservados em meios secos, os ovos desidratam-se rapidamente e o embrião morre.

Mas não é apenas em fezes que os ovos se embrionam. O embrionamento dá-se também em solução fisiológica, como já havia verificado Petri (7), trabalhando com a *P. rara*. Em nossas experiências, nestas condições, levaram para se embrionar 15 dias, quando mantidos à temperatura ambiente (21°C a 23°C), e 12 dias, quando conservados a 28°C. Mas, a solução fisiológica tem de ser mantida em frascos fechados, pois, do contrário, a evaporação determina uma hipertonicidade do meio, que leva o ovo a morte.

Petri (7) assinala que ovos em várias fases de desenvolvimento, retirados de fêmeas grávidas e conservados em geladeira a 4°C, completaram o desenvolvimento e, ao fim de dois meses, produziram normalmente a infestação do hospedeiro intermediário, a barata. No caso da *P. praeputialis* isto não se dá. Em experiências feitas, verificamos que os ovos não embrionados não evoluem quando mantidos em geladeira a 4°C até durante quatro meses.

2. *Resistencia no meio exterior* — Os ovos não embrionados, se não encontrarem condições favoráveis para evoluir, morrem. Uma vez embrionados, porém, resistem bem a condições por vezes bem desfavoráveis.

Assim, ovos embrionados obtidos por posturas em solução fisiológica e misturados com fezes ou ovos eliminados espontaneamente com as fezes por gatos parasitados, permaneceram viáveis durante 30 dias, quando as fezes eram mantidas úmidas, e durante 40 dias, quando estas eram deixadas a secar espontaneamente ao ar, à temperatura ambiente. É interessante assinalar aqui a maior resistência dos ovos nas fezes secas. Isto provavelmente decorre do fato de, nas fezes úmidas, haver putrefação e, sobretudo, desenvolvimento de cogumelos que criam condições desfavoráveis.

A adição de carvão vegetal tem também aqui influência decididamente desfavorável. Em circunstância alguma conseguimos conservar ovos viáveis por mais de cinco dias quando acrescentamos carvão às fezes.

Procurando verificar a resistência dos ovos na massa de pão que, como vimos, usávamos como alimento e veículo pa-

ra a infestação de grilos, observamos que, no pão úmido, os ovos permaneceram viáveis durante 20 dias à temperatura constante de 28°C, 30 dias à temperatura ambiente (21°C e 22°C), e 60 dias à temperatura de 4°C. No pão seco conservaram a viabilidade durante 36 dias à temperatura de 28°C e 48 dias à temperatura de 21°C — 22°C.

Em solução fisiológica conservada em frascos fechados, os ovos permaneceram viáveis durante 40 dias, à temperatura de 28°C, 45 dias, a 21°C — 22°C, e 120 dias, em geladeira a 4°C.

Petri (7) verificou que os ovos embrionados da *P. rara*, conservados em solução fisiológica à temperatura ambiente, geralmente se rompem ao fim de um ou dois dias, pondo em liberdade larvas que se mantêm vivas durante umas poucas horas. Este fato não foi observado por Schell (9), trabalhando com a *P. hispidula*. No caso da *P. praeputialis*, a ruptura do ovo no meio exterior é fato puro e exclusivamente acidental. Conservados em solução fisiológica em frascos fechados os ovos permanecem inalterados por um certo prazo que depende da temperatura, como vimos. Se, porém, os recipientes se mantiverem abertos, a solução salina se concentra e a hipertonicidade do meio determina a ruptura dos ovos ou a morte das larvas no interior destes. Em nossas experiências verificamos que, após cinco dias de permanência em frascos abertos, começam a aparecer ovos rompidos e larvas mortas, assim como muitos ovos apresentavam larvas mortas no seu interior. Como contraprova, colocamos ovos perfeitos em solução de cloreto de sódio hipertônica; vimos, então, o rompimento de ovos com saída de larvas que logo morriam ou que já se apresentavam mortas.

Os ovos isolados de fezes pela flutuação em sulfato de zinco segundo o método de Faust e col., e depois lavados em solução fisiológica, quando ministrados a grilos produziram infestação, isto mostrando que a passagem pelo sulfato de zinco não lhes altera a viabilidade.

A solução de açúcar de densidade 1,110, com a qual trabalhamos para fazer contagens, também não altera a viabilidade dos ovos. Ovos que foram con-

servados neste meio durante 40 horas e depois lavados por centrifugação em solução fisiologica, onde permaneceram 30 dias, mostravam-se viáveis, produzindo infestação quando ministrados a grilos.

Não procuramos verificar a resistencia de ovos em agua como fez Schell (9) que conservou ovos viáveis de *P. hispida* neste meio, mantido à temperatura ambiente durante oito meses.

III — O *GRYLLUS (ACHETA) ASSIMILIS* (*) COMO HOSPEIRO INTERMEDIARIO

O *G. (A.) assimilis* infesta-se tanto na fase ninfal quanto no estado adulto; machos e femeas são igualmente suscetíveis. Em todas as nossas experiencias obtivemos sempre 100% de infestações. A infestação se dá por ingestão de ovos embrionados. Ovos não embrionados ingeridos não completam a evolução no tubo digestivo do hospedeiro intermediario.

No grilo os ovos põem em liberdade as larvas que penetram na parede retal, se encistam e se desenvolvem até atingir o terceiro estadio, como veremos mais detalhadamente depois.

O grilo suporta muito bem a infestação ainda que intensa. Com frequencia observamos insetos com 30 a 50 larvas sem apresentar sinais de danos causados pelo parasitismo; o maior numero de larvas observado em um grilo foi 151. A infestação persiste através das metamorfoses que o hospedeiro sofre, não parecendo prejudicá-las. Observamos grilos com infestações muito intensas e que permaneceram vivos até o fim da experiencia, 80 dias após a infestação.

Durante o crescimento das larvas da *P. praeputialis* alguns grilos morrem; mas a morte não pode ser atribuida ao parasitismo. Ela se verificou tambem nos insetos não infestados e, via de regra, a causa foi a falta ou o excesso de umidade. Desde que, com a pratica adquirida, conseguimos graduar a umidade do meio, passamos a observar pe-

quena mortalidade entre os grilos infestados ou não.

A idade e, por consequencia, o tamanho dos grilos não tem influencia sobre a duração do ciclo, como veremos; mas dela parece depender a intensidade de infestação. Assim, o lote 27, constituido por 113 ninfas pequenas, com cerca de dois meses de idade quando foram infestadas, mostrou uma intensidade de infestação variavel de 2 a 21 larvas, ao passo que, no lote 29, constituido por 35 grilos adultos machos e femeas, a intensidade de infestação variou de 8 a 72 larvas. Os dois lotes foram mantidos nas mesmas condições, exceto a temperatura, que foi ligeiramente inferior para o lote 27 (19,21°C - 21,76°C) que para o lote 29 (19,63°C - 22,15°C).

A nosso ver, a explicação para a maior ou menor intensidade de infestação que se observa entre os grilos adultos e jovens depende da quantidade de alimento infestante ingerido durante a exposição. Uma vez que os adultos ingerem maior quantidade de alimento, recebem maior carga de ovos e, assim, se apresentam mais parasitados.

Nossas investigações mostram que o *G. (A.) assimilis* é um excelente hospedeiro intermediario da *P. praeputialis* em condições experimentais. Somos, porem, levados a crer que o é tambem em natureza pelas seguintes razões:

a) O *G. (A.) assimilis* infesta-se facil e intensamente em condições experimentais.

b) Encontramos larvas encistadas de *P. praeputialis* em 8,37% dos exemplares de *G. (A.) assimilis* capturados em natureza (Zago F.º) (13).

c) Não ha quitinização do cisto neste hospedeiro. Como veremos adiante, os autores que têm trabalhado em biologia de fisalopteridas têm descrito cistos quitinizados de coloração castanha escura em *B. germanica*, fato este que implica na morte da larva. Em grilos acompanhados até 166 dias, nunca observamos tais cistos.

d) O exame do conteudo estomacal de gatos necropsiados revela, com frequencia, fragmentos de grilos.

e) Os grilos procuram lugares umidos para enterrar seus ovos e, por sua vez, o gato, quando defeca, enterra as

(*) Em trabalhos anteriores empregamos o nome *Gryllulus* Uvarov, 1935; entretanto, face a *Opinion* 299 da I.C.Z.N. (6), passamos a usar a designação *Gryllus (Acheta) assimilis* (Fabr., 1775).

fezes deixando uma superfície úmida propícia para o postura dos grilos.

f) Nas infestações experimentais que realizamos verificamos que o grilo suporta bem infestações muito intensas.

IV — O HOSPEDEIRO DEFINITIVO

O hospedeiro definitivo normal da *P. praeputialis* é o gato. Outros animais podem infestar-se experimentalmente, como relataremos em trabalho futuro, mas o desenvolvimento do parasita é retardado ou irregular.

A infestação do gato se dá pela ingestão de larvas em terceiro estadio que se desenvolveram e encistaram no hospedeiro intermediário.

Schell (10), trabalhando com a *P. hispida*, parasita do rato do algodão (*Sigmodon hispidus littoralis*), conseguiu a infestação do hospedeiro definitivo, ministrando-lhes larvas em segundo estadio obtidas de baratas (*Blatella germanica*); o desenvolvimento destas larvas foi porém mais lento do que o das larvas em terceiro estadio. Estas atingiram a maturidade sexual entre o 73.º e 90.º dia após a infestação, enquanto que o parasita não havia atingido o completo desenvolvimento aos 122.º dias depois da inoculação, quando usou larvas em segundo estadio para a infestação do rato.

Com a *P. praeputialis* não conseguimos, em três tentativas feitas, observar a infestação de gatos com larvas em segundo estadio. Empregando, porém, larvas em terceiro estadio conseguimos infestar 100% dos 20 animais com que trabalhamos.

Logo depois de deglutidas, as larvas se fixam imediatamente à mucosa gástrica de preferência na região da pequena curvatura próxima da cardia, onde se distribuem irregularmente. Isto que observamos em condições experimentais, dá-se também nos animais naturalmente infestados. Assim é que, em autopsias de gatos capturados em natureza, todas as vezes que encontrávamos larvas em terceiro e em quarto estadio, elas tinham aquela localização.

A fixação à parede do estômago é característica. Os exemplares rompem a mucosa e intrometem a parte cefálica até a submucosa, atingindo muitas vezes a camada muscular (fig. 54). Os

helmintos se fixam tão solidamente que, ao se tentar retirá-los por tração, geralmente se rompem sem desprender a extremidade cefálica. Para se conseguir vermes integros é necessário dissecar a parede do estômago ao nível do ponto de implantação.

Na parede do estômago notam-se, além da lesão destrutiva causada pelo parasita, fenômenos inflamatórios que se traduzem por congestão, edema e intensa infiltração histiocitária.

A medida que passam para o quinto estadio e atingem a maturidade sexual, os exemplares migram para facilitar a fecundação. Tanto nos 8 animais de experiência, que foram sacrificados com infestação nesta fase, como nos gatos naturalmente infestados, verificamos que, via de regra, os parasitas se apresentam em pequenos aglomerados, onde se notam duas ou mais fêmeas fixadas em torno de um macho, conservando uma distância de meio centímetro ou menos entre os pontos de implantação. Outras vezes, há um aglomerado de fêmeas e o macho fica a uma curta distância, mas de tal modo que pode sempre alcançar as fêmeas com a extremidade caudal. A distribuição destes aglomerados é irregular em toda a mucosa da pequena curvatura próxima da cardia.

Para a cópula, o macho envolve a fêmea ao nível da vulva com a extremidade caudal. Durante a fecundação forma-se um anel de secreção em torno da fêmea que, ao menos parcial e temporariamente, oblitera a vulva.

A relação entre machos e fêmeas não obedece a uma proporção constante, mas, via de regra, o número de fêmeas é, em média, duas vezes maior que o de machos.

Durante as migrações a que nos referimos alguns exemplares podem ser eliminados e esta eliminação explicaria a diminuição brusca que se observa na intensidade do parasitismo quando os helmintos passam para o estadio adulto. Assim é que, em nossas experiências, os animais sacrificados até o 75.º dia após a infestação mostraram sempre número de larvas superior a 20. Gatos inoculados nas mesmas condições, mas sacrificados no período em que as larvas já haviam sofrido a última muda,

mostram-se sempre parasitados por menos de 11 vermes (Quadros VIII e IX).

V — ESTUDO DO CICLO EVOLUTIVO

O ciclo evolutivo da *P. praeputialis* compreende: a) o período embrionário, que se passa no interior do ovo e que conduz à formação de uma larva já completa por ocasião da postura, e b) o período pós-embrionário, com cinco estádios a saber:

1. Primeiro estádio, que se passa no intestino posterior do grilo e com duas fases distintas, uma pré-cística e outra cística.

2. Segundo estádio ou estádio cístico, que se passa no reto do grilo.

3. Terceiro estádio, com duas fases, uma cística ou latente, que se passa no grilo e outra extra-cística, que se passa no gato.

4. Quarto estádio, que se passa no gato.

5. Quinto estádio ou estádio adulto, que se passa também no gato.

A. Período embrionário

Inicialmente a célula ovo multiplica-se rapidamente, dando origem a um aglomerado de células pequenas. Nesta fase o ovo se apresenta com granulações grosseiras e irregulares que tomam toda a célula (fig. 4). Em fase mais avançada, já se nota o embrião (fig. 5) que, em seguida, evolui, dando origem a uma larva. Esta mostra-se revestida de uma cutícula delicada e apresenta a cabeça com três espinhos cefálicos, um mediano, situado mais anteriormente, e dois laterais, implantados em nível posterior. Não há poro excretor e o tubo digestivo é mal individualizado, não havendo distinção entre o intestino e o esôfago (fig. 6).

Nos ovos postos, tanto nas fezes como em solução fisiológica, assim como nos existentes na vagina e nas porções terminais dos uteros, as larvas são mais evoluídas. Mostram externamente os mesmos caracteres morfológicos assinalados atrás. Internamente nota-se o esôfago constituído por uma fileira de células altas que, na porção posterior, formam uma dilatação de pequenas dimensões; os núcleos destas células são volumosos e centrais. Na altura da porção mediana do terço posterior do esôfago abre-se externamente o poro excretor de situação ventral. A célula excretora se mostra, quando a larva está no interior do ovo (fig. 7), como

formação triangular de ápice voltado para fora. Ao esôfago segue o intestino de paredes delicadas e formadas por uma camada de células chatas. O intestino é interrompido na altura da porção anterior do terço posterior da larva (fig. 9). O comprimento e demais dimensões, são idênticas às das larvas saídas do ovo, no reto do grilo.

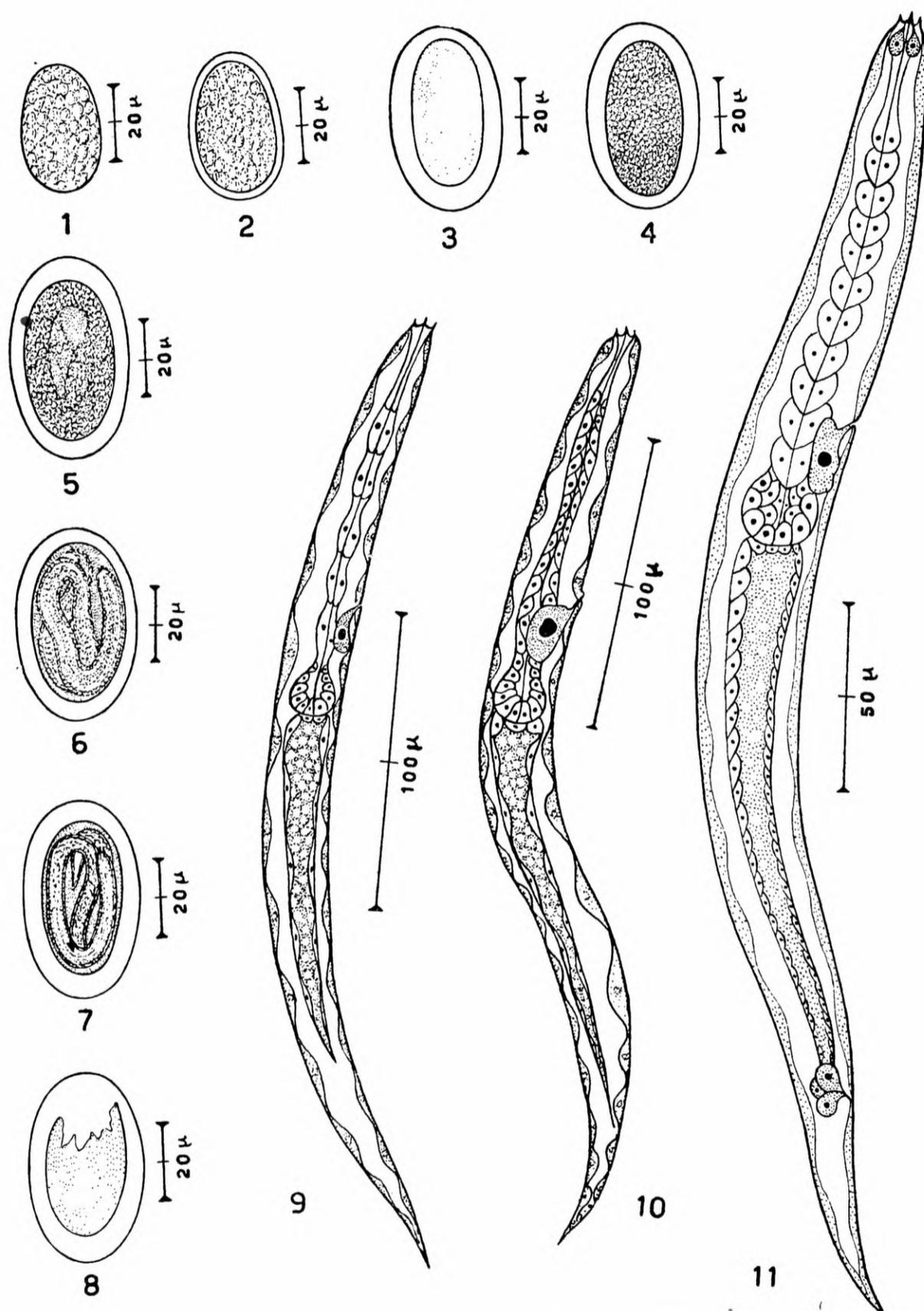
As larvas quando no interior dos ovos, não reagem aos estímulos térmicos, luminosos ou mecânicos; somente observamos motilidade destas quando os ovos embrionados, ministrados a grilos, chegam ao reto. Neste local elas contraem e distendem a região cefálica, parecendo forçar a saída do ovo; acabam por rompê-lo, deixando na casca uma abertura de contornos irregulares, como vidro estilhaçado (fig. 8).

As larvas que abandonam o ovo no reto do grilo são muito ativas e, mesmo em preparações entre lâmina e laminula, forçam e penetração nas paredes do intestino posterior ou empurram a lâmina, a laminula ou outros obstáculos, de maneira semelhante ao que se passa com as larvas infestantes dos ancilostomídeos.

As modificações na morfologia interna, observadas nas larvas em formação no interior do ovo, tais como o aparecimento do poro excretor e dos limites de separação entre o esôfago e o intestino, não devem ser interpretadas como traduzindo estádios evolutivos diferentes, isto é, separados por ecdises, e sim fases embriológicas diversas. De fato, estas modificações são pequenas e não aparecem em consequência de uma muda, que não se dá no interior do ovo. As modificações morfológicas marcadas só se processam durante a primeira muda, que se passa no intestino posterior do grilo, como veremos. Aliás observam-se cinco estádios após a saída da larva do ovo e, se fossemos admitir mais um no interior dele, teríamos seis estádios para a *P. praeputialis* e não cinco, como se dá nos demais nematóides.

B. Desenvolvimento pós-embrionário

1. *Primeiro estádio.* Podemos considerar este estádio dividido em duas fases muito distintas. A primeira é a fase em que a larva, libertada do ovo no intestino posterior do grilo, penetra na parede retal; é a fase pré-cística, em que se completam algumas estruturas internas, pouco aparentes durante a fase embrionária, como o esôfago e o intestino, e aparecem outras inexistentes ou inaparentes em larvas recém saídas do ovo, como as glândulas cefálicas e anais. A segunda fase é o período cístico, em que a larva,



Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 1 ovulo no ovario. 2 ovulo no utero. 3 ovo não embrionado. 4 e 5 - ovos em embrionamento. 6 - ovo com larva jovem. 7 ovo com larva infestante. 8 casca de ovo após saída da larva. 9 - larva em 1.º estadio, 6 horas após a infestação. 10 larva em 1.º estadio na fase pré-cística, 48 horas após a infestação. 11 idem com 5 dias.

já com suas estruturas internas definidas, cresce rapidamente e sofre a primeira muda.

a) *Fase pré-cística*. Como dissemos, alimentamos grilos manualmente para medir com maiores detalhes o tempo decorrido entre a ingestão dos ovos e a saída das larvas, verificar o local em que esta se dá e acompanhar a penetração das larvas e formação do cisto. Outros grilos infestaram-se espontaneamente, comendo pão contaminado deixado à sua disposição durante 36 horas.

Seis horas após o repasto infestante, encontramos larvas livres na luz do reto e ovos ainda por se romper, como mostra a fig. 43, assim como larvas em início de penetração, como se vê na fig. 44, que mostra uma larva cortada no sentido longitudinal e com a cauda ainda bem próxima da luz do reto. Nas partes mais anteriores do intestino posterior somente encontramos ovos intatos. Isto leva-nos a afirmar que o reto é o local da saída das larvas e que o tempo requerido para que ela se dê é de cinco e meia a seis horas; este é, aliás, o tempo necessário para que os ovos ingeridos atinjam o reto, uma vez que, em todos os grilos necropsiados até cinco horas e meia após a ingestão, não encontramos ovos no reto. O tempo decorrido entre o nascimento das primeiras e das últimas larvas no intestino posterior do grilo foi, em nossas experiências, de 30 horas. Este prazo relativamente longo se explica porque nem todos os ovos chegam ao reto ao mesmo tempo. Muitos têm transito retardado e, em necropsias de grilos realizadas entre seis e trinta horas, sempre encontramos ovos, cada vez em menor proporção, nas partes do tubo digestivo que antecedem o reto.

A larva, uma vez livre na luz retal, atravessa a cutícula, penetra na camada epitelial e caminha em direção à membrana basal. No caminho percorrido e no local onde a larva se encontra, nota-se uma área extensa de células destruídas, como mostra a fig. 45, obtida 20 horas após a infestação. Em todos os preparados feitos nesta fase nota-se sempre o mesmo aspecto, isto mostrando que o tecido ainda não reagiu contra o agente invasor.

Morfologicamente a larva em migração não difere daquela que saiu do ovo (fig. 9).

Depois de 40 horas após a infestação (fig. 46), observaram-se larvas já envoltas por um tecido reacional do organismo, que as delimita e começa a enclausurá-las. As células de reação são fusiformes e se dispõem desordenadamente ao redor da larva; têm núcleo volumoso, que se cora intensamente pela hematoxilina, e citoplasma escasso.

Cerca de 48 horas após o repasto infestante notam-se algumas modificações na estrutura das larvas (fig. 10); a glândula excretora torna-se mais volumosa; o esôfago já se apresenta com paredes mais delimitadas e o intestino se prolonga para a porção posterior, mas ainda não se abre externamente. A cauda destas larvas, assim como, em menor grau, a das recém-saídas do ovos, apresentam uma ligeira curvatura quando examinada a fresco.

Dignas de nota são as reações celulares que aparecem 60 horas após a infestação (fig. 47). As células fusiformes envolvem a larva formando um círculo granulomatoso; imediatamente em contacto com a larva há um acúmulo de substância eosinofila, constituída por células em degeneração. A parede do reto se espessa em consequência da proliferação celular que cerca a larva.

No quarto dia (fig. 48) o processo reacional se delimita mais, formando um nódulo de aparência conjuntiva, mas as células que o constituem não se mostram ainda organizadas em camadas e ao redor da larva persistem as células degeneradas.

Aos cinco dias aparecem nas larvas duas estruturas até então não visíveis e que são as glândulas cefálicas e as glândulas anais (fig. 11). As primeiras em número de duas, uma de cada lado, não têm limites nítidos na porção mediana, onde se tocam, e apresentam a forma de semente de laranja, com a parte mais larga voltada para trás. As glândulas caudais, são constituídas por um agrupamento de três células, duas laterais e uma mediana. Têm a forma das glândulas cefálicas, diferindo, porém, por serem mais volumosas. Nesta idade o intestino não possui ainda abertura externa.

Com seis dias (fig. 49), a reação tissular se dispõe em camadas. Nota-se, no centro, a larva rodeada por uma substância eosinofila amorfa; circunscrevendo esta substância, observa-se uma camada de células do tipo epitelíode, tendo núcleo volumoso e central e citoplasma abundante; finalmente, um infiltrado difuso de células do tipo fibroso envolve aquela camada de células. Neste ponto, o cisto está praticamente constituído, faltando apenas que o infiltrado do tipo fibroso se organize.

Aos 7 dias os cistos já estão completamente evoluídos e são dissecáveis ao entomológico com auxílio de estiletos. Neste ponto encerra-se a fase pré-cística do primeiro estágio.

Histologicamente, um cisto formado consta das seguintes camadas (fig. 50): externamente há uma camada pouco espessa de células do tipo fibroso, com núcleos volumosos e citoplas-

QUADRO III. MEDIDAS DIARIAS DAS LARVAS EM PRIMEIRO ESTADIO, EM μ

DIAS DIST.	FASE PRE-CISTICA						FASE CISTICA					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MD. 264,62 D.P. 8,55 C.V. 3,31	272,70 5,93 21,74	288,80 11,08 3,83	292,90 12,15 4,14	311,08 11,47 3,68	311,08 14,79 4,75	356,53 13,39 3,75	361,58 13,08 3,61	393,90 31,56 8,01	408,04 38,88 9,52	482,78 38,81 8,03	524,19 45,42 8,64
D	MD. 80,73 D.P. 2,75 C.V. 3,43	84,87 2,48 9,24	86,84 3,65 4,19	87,17 3,91 4,46	89,93 4,49 4,77	91,08 3,73 4,09	94,30 7,75 8,21	95,22 5,71 5,99	97,24 7,28 7,48	120,06 8,10 6,74	124,89 6,70 5,36	127,88 2,49 1,94
E	MD. 117,00 D.P. 0,32 C.V. 0,28	117,30 2,25 1,90	123,74 6,61 5,34	123,97 6,21 5,00	126,04 4,09 3,24	130,64 2,26 1,72	134,09 5,52 4,11	134,09 6,31 4,70	142,37 9,06 6,36	154,56 7,73 5,13	160,31 7,12 4,44	171,81 8,19 4,76
H	MD. 15,18 D.P. 0,11 C.V. 0,72	15,87 0,35 2,21	19,09 2,33 12,20	20,24 1,85 9,14	23,23 3,25 13,99	24,61 5,99 24,33	29,90 3,74 12,50	30,36 3,26 10,40	36,34 7,17 19,73	39,70 6,25 15,70	43,93 8,54 19,44	46,69 2,29 4,90
I	MD. 11,50 D.P. 0 C.V. 0	12,50 0 0	12,65 0,93 7,35	12,65 0,93 7,35	12,88 1,12 8,69	14,32 0,83 5,79	17,15 1,85 10,78	18,76 1,61 8,58	22,44 5,32 23,70	27,37 3,96 14,46	28,29 2,52 8,90	38,87 2,91 7,48
G	MD. D.P. C.V.						52,90 2,97 5,61	61,87 2,82 4,55	71,76 3,82 5,29	73,37 3,33 4,53	76,36 3,04 3,98	

ma escasso; segue-se-lhe uma camada mediana espessa, compacta e anista, que toma a coloração intensa pela eosina; internamente, ha uma camada de celulas sem limites nitidos tendo nucleos volumosos em processo de mitose; tal camada envia septos para o interior do cisto. Parece que a camada interna funciona como uma membrana nutritiva, produzindo substancias a custa das quais a larva se nutre. Ao se dissecar um cisto nota-se uma massa viscosa, incolor e constituida por formações refringentes que são os nucleos das celulas que formam a camada sinsicial interna.

O epitelio retal apresenta degeneração por compressão ao nivel do cisto e a membrana basal reveste-o externamente; uma traqueia arboriza-se sobre ele.

O encistamento das larvas da *P. praeputialis* no reto do *G. (A.) assimilis*, representa uma necessidade biologica. Somente após o encistamento é que as larvas do primeiro estadio comecam a crescer e evoluir rapidamente (Quadro III).

O cisto, uma vez formado, pode alojar no seu interior, não somente a larva ou larvas que determinaram sua formação, como tambem larvas menores, provenientes de super-infestações e que podem nele penetrar ativamente e passar a fazer parte do conteudo cistico; a fig 51, mostra um cisto de larva do terceiro estadio, com 50 dias de idade, tendo no seu interior uma larva de 5 dias, proveniente de uma super-infestação experimental.

Em grilos capturados em natureza, observamos por duas vezes seguidas, que as larvas existentes dentro do mesmo cisto eram diferentes morfologicamente. Pensamos de inicio em duas possibilidades: ou as larvas eram de especies diferentes e provenientes de uma infestação multipla simultanea, ou eram da mesma especie e se encontravam em fases diferentes de evolução. Conhecido, logo depois, o ciclo da *P. praeputialis* e provocando uma super-infestação, vimos a possibilidade da penetração e evolução de larvas recém-inoculadas dentro de cistos já formados. Aliás, a ocorrencia de larvas em varios estadios de desenvolvimento no interior do mesmo cisto, em baratas experimentalmente infestadas pela *P. rara*, já havia sido observada por Petri (7), que interpretou o fato como o resultado de diferenças na taxa de crescimento das larvas individuais.

O numero de larvas existentes num unico cisto varia com a intensidade de infestação; quando esta é pequena, isto é, quando um grilo alberga de 3 a 15 larvas, o mais comum é o encontro de uma larva por cisto; quando, porem,

a infestação é intensa, albergando os grilos 15 a 60 larvas, é raro encontrar-se apenas uma por cisto; via de regra encontram-se 3 a 5 larvas. O numero maximo de larvas observadas em grilos foi de 151 e no interior de um unico cisto foi de 15.

Quanto a localização, os cistos podem estar na espessura da parede, fazendo saliencia na luz retal (fig. 51) ou na face externa, como se fossem apendices retais ligados à parede por um delicado pediculo (fig. 52).

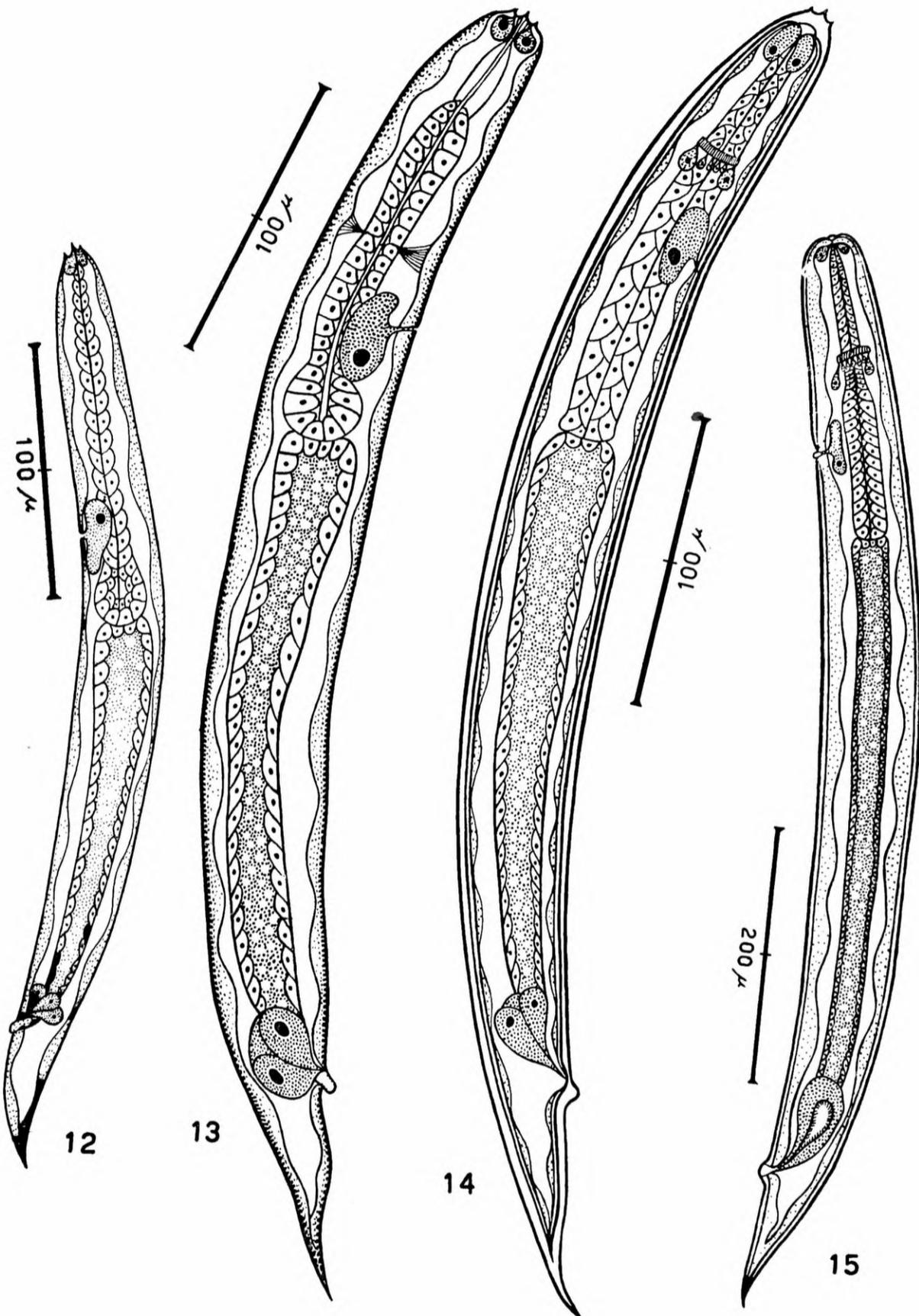
É principalmente a empola retal, o local onde, com mais frequencia, os cistos se localizam, como se vê na fig. 53, que mostra cistos apendiculares externos e cistos no interior da parede retal. Mas, os cistos localizam-se tambem com frequencia, se bem que menor, no reto propriamente dito. A intensidade de infestação sendo baixa, os cistos estão, se não todos, pelo menos em maioria na empola retal; nas infestações intensas as larvas se encistam em maior numero na empola retal, mas muitos cistos podem ser vistos no reto propriamente dito; rarissimas vezes encontramos as partes mais anteriores do intestino posterior albergando cistos.

b) *Fase cistica*. As larvas, aos 7 dias, se apresentam com a estrutura modificada. Tornam-se mais claras, a cuticula mostra-se delicada, as papilas cefalicas tornam-se menos visiveis e o anus proemina para o exterior, sendo obliterado pela cuticula (fig. 12).

O aspecto a fresco é tipico e, com um pouco de pratica, se reconhece facilmente uma larva encistada de uma não encistada. A camada subcuticular é espessa e refringente, os orgãos internos são nitidos ou mesmo berrantes e as glandulas excretoras, cefalicas e anais, são muito desenvolvidas. É uma larva pouco ativa e muito pouco resistente, encarquilhando-se com facilidade, quando se rompe o cisto em que se encontra.

No fim da fase cistica do primeiro estadio (fig. 13) notam-se, alem das particularidades para as quais chamamos a atenção ao tratar das larvas recém-encistadas, os seguintes caracteres: o esofago é constituido por uma fileira de celulas altas e com nucleo central, que, na porção posterior, formam um bulbo nitido e, na anterior, um tubo indiferenciado; acima da glandula excretora, esboça-se o anel nervoso que se mostra como uma faixa transversal; o intestino, é formado por uma camada de celulas altas, e sua luz possui granulações refringentes, o anus está ainda obliterado pela cuticula externa.

O 12.º dia após a infestação foi considerado por nós como o termino do primeiro estadio no lote 30, pois, as larvas encontradas nos grilos



Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 12 - larva em 1.º estadio na fase pre-cística, com 7 dias. 13 - larva em 1.º estadio, logo após o encistamento. 14 - larva em muda do 1.º para o 2.º estadio, com 12 dias. 15 - larva em 2.º estadio, com 12 dias.

necropsiados se achavam algumas já no segundo estadio e outras em muda do primeiro para o segundo (fig. 14).

As larvas em muda apresentam o corpo revestido por dupla cutícula, uma externa, destacada na região cefálica juntamente com os espinhos que pertenciam ao primeiro estadio, outra interna, revestindo intimamente o corpo da larva do segundo estadio. Devemos assinalar aqui que, tanto no lote 30, como nos demais lotes em que acompanhamos a evolução das larvas, sempre observamos este aspecto; nunca tivemos a oportunidade de surpreender o destacamento completo da cutícula externa. Não podemos afirmar se ela se desprende e deixa a larva livre, ou se apenas os espinhos cefálicos se destacam e a cutícula externa vai constituir uma espécie de cisto para a larva de segundo estadio, como adiante veremos.

Os espinhos cefálicos são essencialmente caracteres morfológicos do primeiro estadio, es-

tando presentes em qualquer das fases evolutivas.

O comprimento das larvas neste estadio variou, em média, de $264,62 \pm 8,55 \mu$ no primeiro dia após a infestação, a $311,08 \pm 14,79 \mu$, no último dia da fase pré-cística (6.º dia); alcançou $524,19 \pm 45,42 \mu$ aos 12 dias, o que mostra ser o período cístico a fase de crescimento por excelência do primeiro estadio (Quadro III).

2 — *Segundo estadio.* — Inicia-se aos 12 dias após a infestação, e termina aos 23 dias, quando as larvas sofrem a segunda muda, passando para o terceiro estadio. As larvas de segundo estadio mostram-se pouco ativas ao se romperem os cistos e são incapazes de rompê-los quando colocados em solução fisiológica.

É um estadio de crescimento vertiginoso, passando-se integralmente no interior do cisto. O comprimento médio inicial das larvas foi de $592,87 \pm 47,79 \mu$ aos 12 dias e final foi de $2,09 \pm 0,11 \text{ mm}$ aos 23 dias (Quadro IV).

QUADRO IV. MEDIDAS DIARIAS DAS LARVAS EM SEGUNDO ESTADIO, EM μ

DIA													
DIST.		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
A	MD	592,87	649,13	627,21	905,97	1332,19	1480,66	1654,38	1883,65	1960,41	1997,78	2081,61	2093,73
	D.P.	47,79	58,31	97,31	171,75	171,99	355,73	243,92	4,02	171,90	199,29	135,65	114,62
	C.V.	8,06	9,41	15,51	18,95	12,91	24,02	14,74	0,21	8,76	9,97	6,51	5,47
B	MD	97,75	99,13	99,82	105,57	117,30	125,12	131,56	152,26	156,17	157,55	160,80	160,80
	D.P.	5,35	3,90	10,91	8,33	7,44	13,75	13,11	10,74	8,35	7,77	5,38	5,21
	C.V.	5,47	3,93	10,92	7,89	6,34	10,98	9,96	7,05	5,34	4,93	3,34	3,24
D	MD	134,15	137,54	143,75	167,90	200,00	202,76	221,49	236,90	243,80	250,93	253,00	253,23
	D.P.	11,44	8,80	5,39	20,45	22,78	26,57	25,87	21,72	20,33	19,35	12,81	16,11
	C.V.	8,52	6,39	3,74	12,17	11,39	13,10	11,67	9,16	8,33	7,71	5,06	6,36
E	MD	203,32	206,54	208,15	268,41	376,28	428,49	502,55	538,34	634,34	706,10	770,63	775,79
	D.P.	10,40	4,50	24,73	45,80	3,92	6,83	94,56	9,36	115,59	117,63	63,03	71,12
	C.V.	5,11	2,17	11,88	17,06	1,04	1,59	18,81	1,73	18,22	16,65	8,17	9,16
F	MD				475,87	623,30	745,89	845,25	991,99	996,59	1027,41	1060,35	1062,14
	D.P.				97,26	83,62	15,38	112,57	12,25	14,01	125,59	88,00	84,78
	C.V.				20,44	13,43	2,06	13,31	1,23	1,40	12,22	8,29	7,98
G	MD	60,54	71,07	79,12	92,23	101,56	102,00	102,18	102,20	102,25	106,26	108,10	108,56
	D.P.	5,74	2,66	7,59	8,46	4,09	6,83	2,62	9,95	5,52	5,44	5,13	7,78
	C.V.	8,37	3,74	9,59	9,17	4,02	6,69	2,56	9,73	5,39	5,11	4,74	7,16
H	MD	49,28	51,98	52,67	59,24	73,20	83,72	97,52	115,23	117,20	122,36	129,72	136,62
	D.P.	5,45	5,24	8,35	7,45	6,88	17,45	14,70	5,33	11,63	10,28	7,12	8,95
	C.V.	11,05	10,08	15,85	12,57	9,33	20,84	15,07	4,62	9,92	8,40	5,48	6,55
I	MD	40,25	43,35	43,47	48,36	58,94	63,84	67,62	69,69	72,68	73,37	76,59	77,74
	D.P.	5,14	3,80	6,16	6,54	6,76	8,20	5,17	4,68	5,02	4,47	4,10	4,44
	C.V.	12,78	8,76	14,17	13,52	11,46	12,84	7,64	6,71	6,90	6,09	6,21	5,68

A fig. 15 mostra uma larva do segundo estadio aos 12 dias; seus caracteres morfológicos são: corpo com revestimento constituído por duas cutículas delicadas, a externa, que oblitera todos os orifícios naturais, inclusive o poro excretor, e a interna, mais delicada, que os deixa livres. Em consequência desta disposição da cutícula externa, a larva possui quase a mesma largura, tanto ao nível da cabeça, como no resto do corpo, exceto próximo à cauda. A cabeça não mostra lábios ou papilas; apresenta forma semi-esférica e tem, na porção media, uma protuberância formada pela cutícula externa. Internamente as glandulas caudais são bem desenvolvidas e se reúnem em um ducto excretor de aspecto radiado, que se abre na borda superior do anus. As glandulas cefalicas, em virtude do espessamento da larva, são menos visíveis que durante a fase encistada do primeiro estadio. A glandula excretora é desenvolvida. O esofago tem um aspecto de uma empola, com a porção mais dilatada dirigida para trás e a porção mais afilada voltada para a frente. A porção anterior é formada por células ainda indiferenciadas. Ao nível do terço posterior desta porção aparece o anel nervoso bem individualizado e acompanhado por glandulas. Há duas glandulas laterais bem desenvolvidas e, entre elas, uma série de pequenas glandulas; todas são unicelulares e apresentam a parte posterior larga e arredondada, afilando-se à medida que se aproximam do anel nervoso.

Logo abaixo do anel nervoso o esofago se dilata, mas não apresenta bulbo posterior, e esta porção mais dilatada é constituída por células altas e com núcleo volumoso e central.

O intestino é um tubo reto e de paredes bem individualizadas, apresentando posteriormente as glandulas anais desenvolvidas que se superpõem ao intestino. A luz intestinal é ocupada por granulações refringentes.

Aos 15 dias de infestação, ou seja, quatro dias depois que as larvas passaram para o segundo estadio, aparece, a certa distancia da união esofago-intestino, uma estrutura com a forma de um botão, localizada do mesmo lado que o poro excretor e o anus; é o primórdio genital (fig. 16) que se apresenta compacto, hialino e não mostra internamente nenhum esboço de segmentação. Quanto ao problema das diferenças observadas nas distancias entre o primórdio genital e extremidade anterior, e interpretadas como caráter distintivo de machos e fêmeas, dele trataremos ao estudarmos as larvas em terceiro estadio.

A cauda (fig. 17), aos 16 dias após a infestação, mostra nitidamente o revestimento por

dupla cutícula. A cutícula externa oblitera o anus, mas a interna o deixa livre por se inserir em suas bordas.

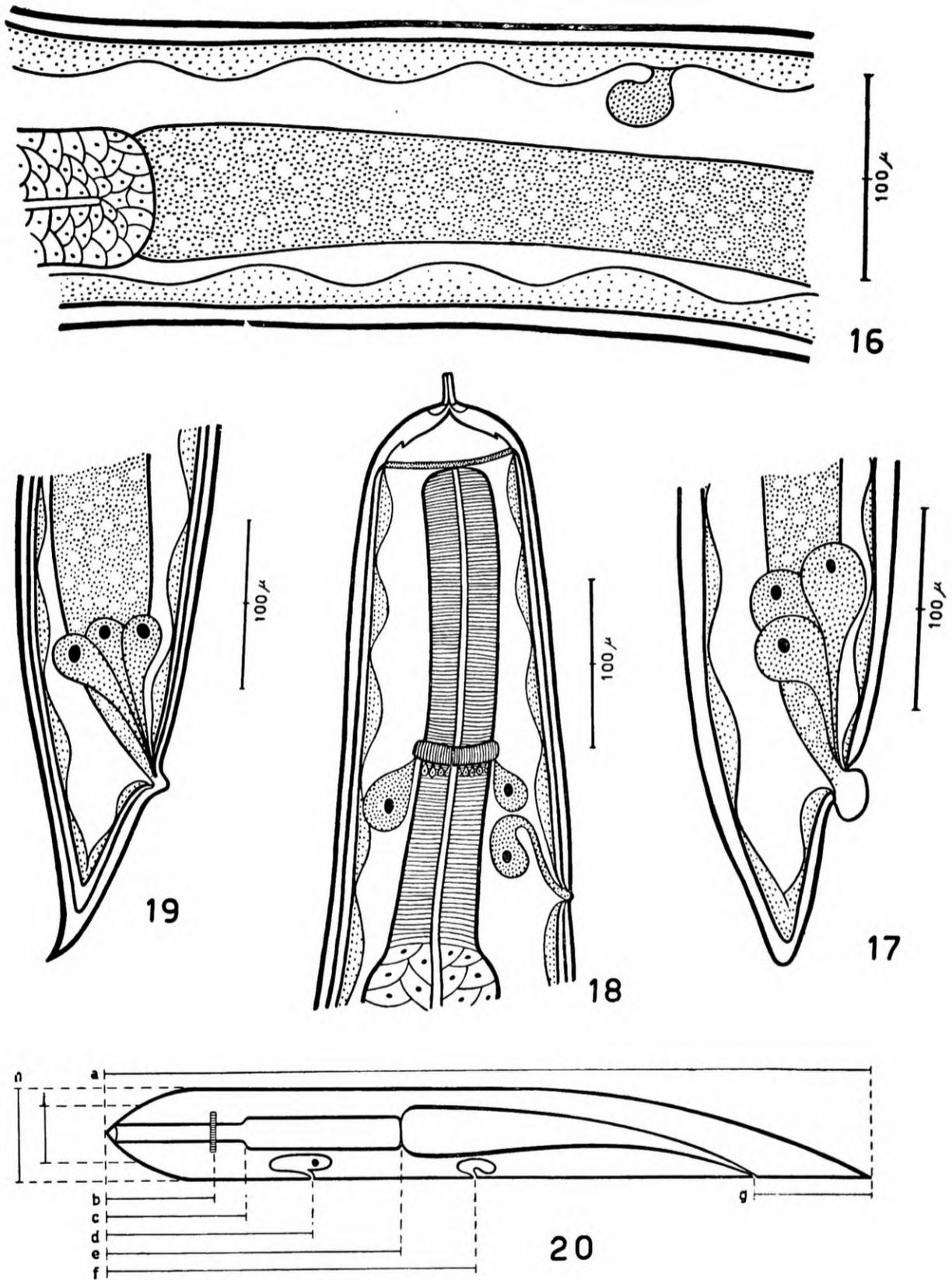
À medida que as larvas do segundo estadio se aproximam da segunda muda, o corpo mostra três cutículas; uma interna, que reveste intimamente a larva, uma mediana, que deixa livre os orifícios naturais e que é a cutícula interna da larva em segundo estadio, e finalmente uma externa que oblitera os orifícios naturais e que é a cutícula externa da larva do segundo estadio. Este novo arranjo descrito é visível já aos 20 dias após a infestação e torna-se mais nítido em larvas que estão muito próximas da muda, como se vê na fig. 19, que representa a cauda de uma larva do segundo estadio aos 22 dias, ou seja um dia antes da muda para o terceiro estadio; a cutícula externa aparece já destacada da borda anal.

As larvas em muda do segundo para o terceiro estadio mostram, na região cefalica, o destacamento da cutícula externa, que é obliterante dos orifícios naturais. Na região da boca esta cutícula mostra uma proeminência com aspecto de charuto (fig. 18). A cutícula media prende-se lateralmente à cabeça, formando um anel que delimita a porção cefalica, deixando livres os orifícios naturais. A interna reveste intimamente a larva. O esofago apresenta-se dividido em duas nítidas porções, muscular e glandular e seus caracteres serão descritos ao tratarmos das larvas em terceiro estadio.

No lote 30, mantido nas condições de temperatura registradas no Quadro XI, o segundo estadio durou 13 dias. As larvas do segundo estadio não são infestantes, pois três gatos aos quais foram ministradas 30 larvas a cada um, não se infestaram.

Em resumo, podemos dizer que o segundo estadio é o período de crescimento (Quadro IV) e caracterizado por ser bicístico, isto é, as larvas são encistadas pela cutícula externa e pelo cisto de reação do hospedeiro intermediário. Nesta fase evolutiva o anel nervoso e o primórdio genital individualizam-se e a porção muscular do esofago se esboça.

3. — *Terceiro estadio.* a) *Período cístico.* É a fase latente do ciclo que se passa no hospedeiro intermediário. Teve início aos 23 dias após a infestação do lote 30, com o comprimento médio de $2,06 \pm 0,20$ mm; aos 41 dias, isto é, 18 dias após ter sofrido a muda o comprimento atingia $2,66 \pm 0,7$ mm, permanecendo estacionado daí por diante até aos 46 dias após a infestação (Quadro V); em grilos do lote 11, acompanhados até aos 166 dias após a infestação, verificamos que o crescimento con-



Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 16 - primordio genital em larva do 2.º estadio, com 16 dias. 17 - cauda da larva do 2.º estadio com 16 dias. 18 - extremidade anterior da larva em muda do 2.º para o 3.º estadio, com 22 dias. 19 - cauda da mesma larva. 20 - diagrama de Cobb.

tinuava estacionado e o comprimento permanecia o mesmo que o observado no 40.º dia, no caso do lote 30.

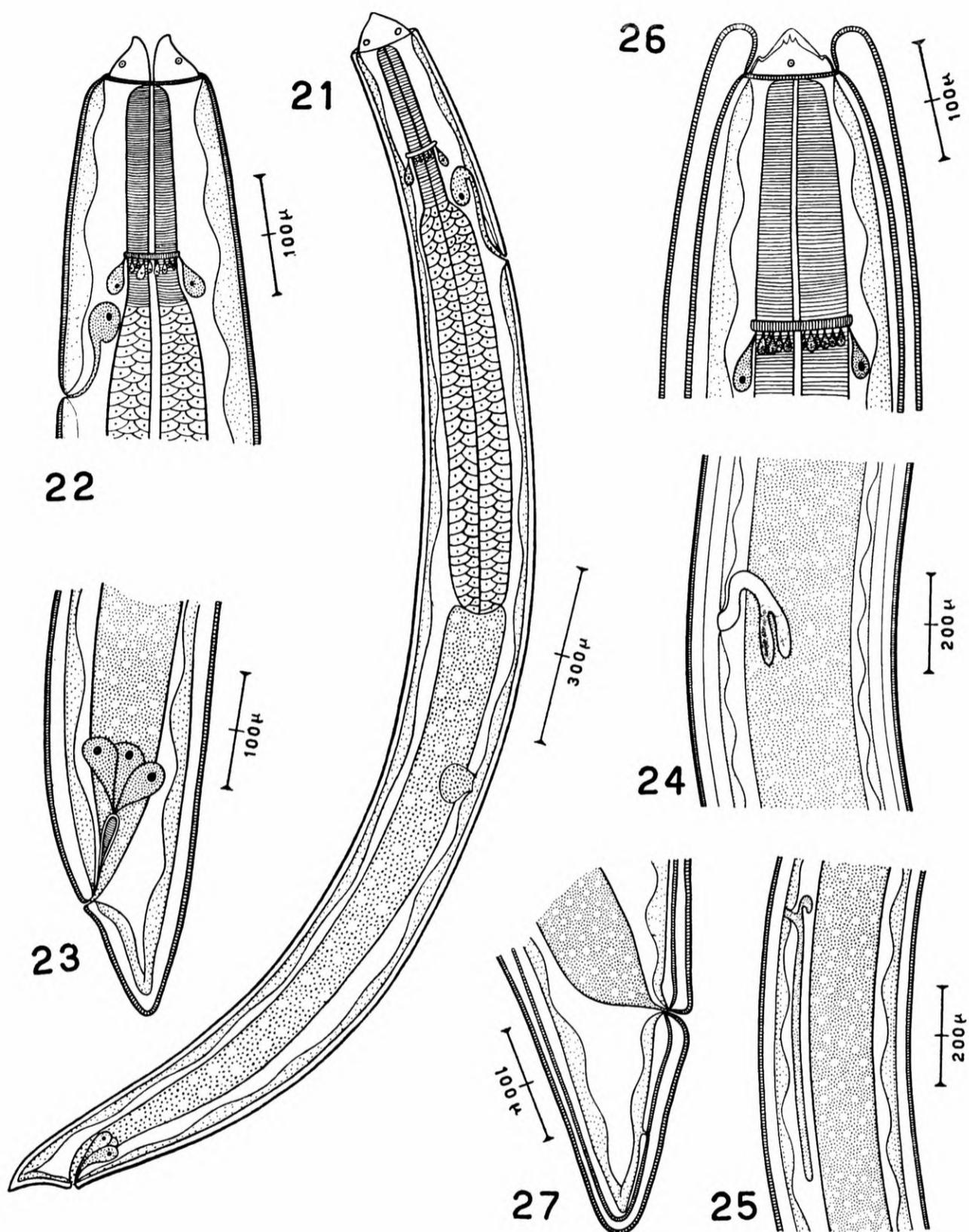
As larvas do terceiro estadio são muito ativas, rompendo os cistos desde que o reto do grilo seja exposto a seco ou em solução fisiologica; quando livres executam movimentos vermiformes e de retração e extensão da parte anterior do corpo, como que forçando a penetração na lamina ou laminula.

As larvas permanecem vivas enquanto viver o hospedeiro; em nossas experiencias verificamos tal fato até o 166.º dia, quando o ultimo grilo infestado do lote II foi sacrificado. Interessante é assinalar que, mesmo no caso de morte do hospedeiro e estando este já em estado de putrefação, as larvas contidas nos cistos permanecem vivas, mas sem rompê-los, o rompimento ativo somente se realizando quando o reto é dissecado.

A larva de terceiro estadio caracteriza-se por apresentar uma dupla cuticula envolvendo o corpo, ambas deixando livre os orificios naturais (fig. 21). A mais externa prende-se lateralmente à cabeça, formando um anel cuticular que delimita a região cefalica. A interna reveste intimamente o corpo. A cabeça caracteriza-se por apresentar dois fortes labios, que terminam em ponta aguçada e rigida; um é ventral e outro é dorsal, e cada um mostrando um par de delicadas papilas dispostas na sua porção basal (fig. 22). As glandulas cefalicas são de dificil observação. A cauda é truncada e curta (fig. 23). O esofago apresenta uma porção anterior estreita, a porção muscular, onde está localizado o anel nervoso com um par de glandulas laterais bem desenvolvidas, e uma serie de pequenas glandulas cujos ductos se dirigem para a porção basal do anel (fig. 22); a porção mais dilatada ou posterior é a glandular e tem

QUADRO V. MEDIDAS DIARIAS DAS LARVAS EM TERCEIRO ESTADIO, NO HOSPEDEIRO INTERMEDIARIO, EM μ

DIA		23	24	26	28	30	32	34	36	41	46
DIST.											
A	MD.	2.060,40	2.091,71	2.171,50	2.242,20	2.354,31	2.363,40	2.601,76	2.601,76	2.659,33	2.659,33
	D.P.	201,19	25,02	40,75	42,32	174,12	149,78	104,93	105,74	71,82	71,82
	C.V.	9,76	1,19	1,87	1,88	7,39	6,33	4,03	4,06	2,70	2,76
B	MD.	160,21	160,21	162,51	170,95	182,75	184,00	184,00	184,00	194,58	194,58
	D.P.	4,19	5,53	3,26	10,77	5,39	0	0	0	7,35	7,35
	C.V.	2,61	3,45	2,00	6,30	2,94	0	0	0	3,77	3,77
C	MD.	185,67	186,53	193,49	200,92	213,90	221,95	226,15	233,68	237,59	237,59
	D.P.	3,76	4,77	11,99	12,91	32,52	2,72	62,30	7,59	9,70	9,70
	C.V.	0,20	2,55	6,19	6,42	15,20	1,22	27,54	3,24	4,08	4,08
D	MD.	253,23	253,69	279,68	291,64	304,29	312,80	337,18	337,18	337,64	337,64
	D.P.	15,54	16,52	24,21	23,27	58,32	3,62	22,05	22,33	15,24	15,24
	C.V.	6,13	6,51	8,65	7,97	19,16	1,15	6,53	6,62	4,51	4,51
E	MD.	775,33	821,00	882,28	964,39	1.093,88	1.155,98	1.200,60	1.213,48	1.213,48	1.213,48
	D.P.	52,25	46,04	79,53	11,72	72,12	100,85	16,37	46,25	5,78	5,78
	C.V.	6,73	5,60	9,01	1,21	6,59	8,72	1,36	3,81	0,47	0,47
F	MD.	1.010,39	1.109,29	1.127,69	1.190,25	1.305,48	1.363,90	1.445,78	1.451,30	1.465,10	1.465,10
	D.P.	84,54	62,14	101,01	116,74	6,93	101,79	46,27	43,53	4,10	4,10
	C.V.	8,36	5,60	8,95	9,80	0,53	7,46	3,20	2,99	0,27	0,27
G	MD.	92,98	93,05	96,96	99,03	101,95	105,63	106,55	107,31	109,61	109,61
	D.P.	7,58	2,35	8,89	8,93	3,57	13,42	10,85	11,43	11,86	11,86
	C.V.	8,15	2,52	9,16	9,01	3,50	12,70	10,18	10,65	10,82	10,82
H	MD.	131,62	137,21	140,07	147,89	156,00	160,21	175,39	179,76	180,91	180,91
	D.P.	2,08	5,02	5,80	8,64	5,79	2,40	2,47	5,63	5,17	5,17
	C.V.	1,58	3,65	4,14	5,84	3,71	1,49	1,40	3,13	2,85	2,85
I	MD.	79,42	88,38	92,59	96,20	103,50	106,16	112,70	113,45	114,21	114,21
	D.P.	0,35	5,28	2,40	5,63	0	15,64	4,67	4,86	2,91	2,91
	C.V.	0,44	5,97	2,59	5,85	0	14,73	4,14	4,28	2,54	2,54



Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 21 - larva em 3.^o estadio, com 50 dias. 22 - extremidade anterior da mesma larva. 23 - cauda da mesma larva. 24 - primórdio genital feminino de larva do 3.^o estadio com 27 dias, no hospedeiro definitivo. 25 - primórdio genital masculino da larva em 3.^o estadio com 17 dias, no hospedeiro definitivo. 26 - extremidade anterior da larva em muda do 3.^o para o 4.^o estadio com 45 dias. 27 - cauda da mesma larva.

início logo abaixo do anel nervoso. Continua diretamente no intestino sem formar bulbo. O intestino, ao exame a fresco, mostra uma curvatura logo abaixo da união com o esôfago, mas, quando fixado, é um tubo reto de paredes espessas e com a luz ocupada por granulações refringentes. O ânus abre-se no terço posterior do corpo e tem, em um dos lados, as glândulas

anais, cujo ducto se abre na borda superior do ânus. Na face ventral da larva, ao nível do terço anterior da parte glandular do esôfago, abre-se o poro excretor da glândula excretora muito desenvolvida, que se localiza nas proximidades da junção da porção muscular com a glandular do esôfago (fig. 22 e 23). No terço anterior da face ventral da larva está loca-

lizado o primórdio genital, em forma de um botão bilobado, como se fosse um brotamento da parede do corpo. Sua localização não difere das larvas do segundo estadio, diferindo apenas a forma que é em virgula, quando examinada de perfil e em botão quando examinada de cima.

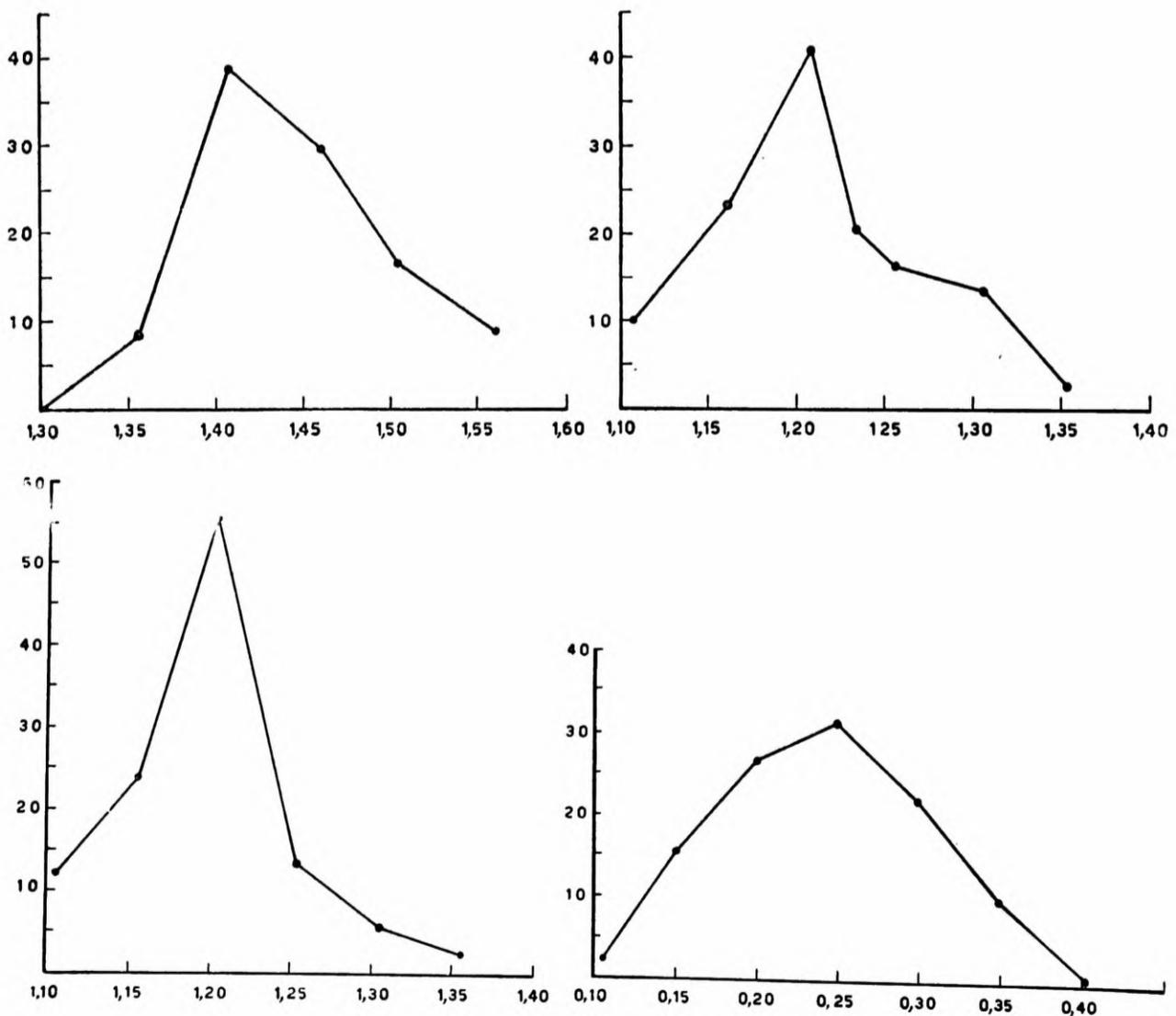
Se o crescimento da larva em terceiro estadio (Quadro V) estacionou no lote 30, mantido nas condições de temperatura registradas no Quadro XI, após 17 dias da muda, isto não quer dizer que as larvas ainda em crescimento não sejam infestantes, pois, os gatos ns. 1 e 2, dos Quadros VII, VIII e IX, foram inoculados com larvas do terceiro estadio, um dia após terem sofrido a muda e a infestação se estabeleceu.

Nossas observações concordam com as de Schell (11), no que dizem respeito ao tipo de reação celular que se processa durante o encistamento.

Os autores que se têm ocupado da

biologia de espécies de fisalopteridas têm descrito diferenças sexuais em larvas de segundo e de terceiro estadio, dizendo que os primórdios genitais se localizam mais posteriormente nas larvas que evoluirão para machos, e mais anteriormente nas que se desenvolverão para fêmeas.

Para verificação de tal fato, tomamos 107 larvas de terceiro estadio, com 95 dias de idade, isto é, larvas com o crescimento já estacionado e cujo comprimento variou de 2,6 mm a 2,7 mm e medimos as distâncias que vão da extremidade anterior ou posterior ao primórdio genital (F e A-F), o comprimento do esôfago (E) e ainda a distância que vai da junção esôfago-intestino ao primórdio genital (F — E); as medidas obtidas (Quadro VI) tiveram toda distribuição unimodal e simétrica, como se vê nos gráficos 1, 2, 3 e 4. Somos, pois, de opinião que, se tal fato



GRAFICOS 1-4

1 distribuição de frequência da medida F em larvas de terceiro estadio com 95 dias. 2 idem da medida A-F. 3 - idem da medida E. 4 idem da medida F-E.

se dá em outros fisalopteridas, a localização do primórdio genital na *P. praeputialis* não constitui caráter que per-

mita a distinção sexual em larvas do segundo ou do terceiro estadio encistadas no hospedeiro intermediário.

QUADRO VI — RESULTADOS DE MEDIDAS EFETUADAS EM 107 LARVAS EM TERCEIRO ESTADIO E COM CRESCIMENTO ESTACIONARIO, A FIM DE VERIFICAR EVENTUAIS DIFERENÇAS SEXUAIS, EXPRESSOS EM μ

F		A-F		E		F-E	
Medidas	Freq.	Medidas	Freq.	Medidas	Freq.	Medidas	Freq.
1.313	1	1.111	10	1.111	12	101	1
1.363	8	1.161	23	1.161	19	151	15
1.414	39	1.212	40	1.212	55	202	26
1.464	30	1.262	17	1.262	13	252	31
1.515	19	1.313	14	1.313	6	303	22
1.565	10	1.363	3	1.363	2	353	10
						404	2

Desde Alicata (1), varios autores têm descrito no hospedeiro intermediário *B. germanica*, cistos de cor acastanhada. Tais formações não foram encontradas por nós em *G. (A.) assimilis*, por mais que estendessemos o tempo de observação. Em hospedeiros outros, por nós estudados, encontramos cistos que chamamos "quitinizados". No inicio revestem-se de uma substancia que se não é quitinosa, será muito semelhante; com o tempo, tal substancia invade os cistos, formando um manquito em torno da larva que morre em consequencia disto. Este assunto será objeto de futuro trabalho.

Alicata (1), dissecando exemplares de *B. germanica* infestados com ovos de *P. turgida*, observou, aos 14 dias após a infestação, larvas do primeiro e segundo estadio livres na cavidade do corpo, e aos 27 dias somente larvas do terceiro estadio encistadas nos tecidos que circunscrevem a cavidade geral. Este fato nunca foi por nós observado nos grilos infestados com *P. praeputialis*.

b) *Periodo extra-cistico no gato*. As larvas em terceiro estadio continuam sua evolução no hospedeiro definitivo, o gato, em um periodo extra-cistico que, pela razão que adiante veremos, poderia ser chamado de fase de diferenciação sexual.

Este periodo, inicia-se com larvas tendo comprimento medio de $2,57 \pm 0,06$ mm; aos 45 dias de infestação do gato, quando termina o terceiro estadio, as formas masculinas atingem o comprimento medio de 7,23 e as femininas alcançam a media de $6,20 \pm 0,78$ mm. As medidas detalhadas são apresentadas no Quadro VII.

A fase extra-cistica do terceiro estadio, inicia-se com a ingestão de grilos infestados e termina aos 45 dias aproximadamente. Pudemos estabelecer este limite porque um dos gatos, o de n.º 12, necropsiado no 45.º dia após a infestação, tinha no estomago 10 larvas em terceiro estadio, 17 formas em quarto estadio e três em muda, que foram incluídas no quarto estadio, visto já apresentarem os caracteres deste.

Não ha modificação das estruturas da larva durante os primeiros dias após a inoculação; por outro lado, o crescimento inicial é lento até o quinto dia (Quadro VII).

Aos 17 dias após a infestação observamos uma pequena modificação na morfologia interna. O primórdio genital, que até então era morfológicamente identico ao encontrado no periodo cistico do terceiro estadio, começa a desenvolver-se posteriormente. Em algumas larvas a porção anterior tem fundo cego e a posterior é bifurcada (fig. 24); em outras a porção anterior é curva em C e a posterior é simples, alongada e delgada (fig. 25). A nosso ver, aqui se inicia a diferenciação sexual. As larvas com primórdio genital bifurcado são formas femininas; os ramos de bifurcação representam os esboços dos dois uteros em desenvolvimento a partir de um tronco comum que dará origem ao ovejector e a à vagina. As formas com primórdio genital não bifurcado são masculinas. Ha larvas, observadas no gato autopsiado no 17.º dia, que ainda possuíam o primórdio em botão bilobado (fig. 21) e nas quais não foi possível reconhecer o sexo. Tais larvas separadas e medidas não mostraram diferenças em tamanho. Por outro lado, este animal albergava nove larvas com primórdio bifurcado e duas com tal primórdio em tubo; sendo o numero de formas muito pequeno para permitir qualquer análise, não pudemos por em evidencia diferenças sexuais de natureza quantitativa.

QUADRO VII. MEDIDAS DAS LARVAS EM TERCEIRO ESTADIO
NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO, EM MM.

Nº do Gato		10	2	508	13	28	14	27	15
Nº de Formas		22	23	25	30	20	21	30	30
Idade de Inf.		18h	26h	5d	10d	17d	20d	23d	27d
A	Md.	2,578	2,579	2,894	3,082	3,883	4,150	4,261	5,272
	D.P.	0,057	0,056	0,057	0,194	0,443	0,433	0,393	1,067
	C.V.	2,21	2,17	5,43	6,29	11,42	10,44	9,22	20,23
B	Md.	0,153	0,154	0,161	0,207	0,213	0,233	0,236	0,248
	D.P.	0,039	0,004	0,013	0,011	0,071	0,022	0,022	0,026
	C.V.	25,49	2,59	8,07	5,31	3,33	9,44	9,32	10,48
C	Md.	0,199	0,199	0,218	0,256	0,279	0,297	0,297	0,313
	D.P.	0,004	0,001	0,021	0,014	0,039	0,031	0,065	0,044
	C.V.	2,01	0,50	9,63	5,46	13,97	10,43	21,88	14,05
D	Md.	0,258	0,263	0,278	0,334	0,337	0,348	0,386	0,414
	D.P.	0,002	0,007	0,023	0,017	0,026	0,034	0,030	0,052
	C.V.	0,77	2,66	8,27	5,08	7,71	9,77	7,77	12,56
E	Md.	1,163	1,163	1,216	1,335	1,500	1,565	1,574	1,675
	D.P.	0,015	0,013	0,052	0,087	0,110	0,107	0,120	0,038
	C.V.	1,30	1,13	4,28	6,53	7,38	6,88	7,62	2,28
F	Md.	1,324	1,325	1,522	1,595	2,348	2,603	2,637	2,718
	D.P.	0,012	0,056	0,147	0,123	0,277	0,436	0,383	0,496
	C.V.	0,97	4,29	9,65	7,73	11,83	16,78	14,55	18,27
G	Md.	0,098	0,099	0,112	0,121	0,149	0,154	0,160	0,172
	D.P.	0,007	0,007	0,008	0,012	0,018	0,015	0,013	0,025
	C.V.	7,14	7,07	7,14	9,91	12,08	9,74	8,12	14,53
H	Md.	0,192	0,196	0,196	0,203	0,247	0,291	0,298	0,324
	D.P.	0,007	0,006	0,008	0,010	0,034	0,061	0,035	0,019
	C.V.	3,64	3,06	4,08	4,92	13,76	20,96	11,74	5,86
I	Md.	0,101	0,110	0,114	0,150	0,150	0,150	0,151	0,154
	D.P.	0,007	0,020	0,003	0,027	0,029	0,024	0,012	0,010
	C.V.	6,93	18,18	2,63	18,00	19,33	16,00	7,94	6,49

QUADRO VIII. MEDIDAS DAS FORMAS FEMININAS NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO, EM MM.

Nº do Gato		12		11	7	9		1	5
Idade de Inf.		45d		60d	75d	95d		132d	152d
Estádios		3º	4º	4º	4º	4º	5º	5º	5º
Nº de Formas		8	13	16	19	17	4	3	6
A	Md.	6,201	8,658	12,568	16,142	30,676	40,371	44,567	51,108
	D.P.	0,782	0,984	2,612	0,332	9,537	1,063	0,578	2,987
	C.V.	12,61	11,36	20,78	2,05	31,08	2,63	1,29	5,84
B	Md.	0,265	0,277	0,350	0,396	0,525	0,651	0,675	0,699
	D.P.	0,011	0,025	0,066	0,056	0,118	0,083	0,083	0,058
	C.V.	4,15	9,02	18,85	14,14	22,47	12,74	12,29	8,29
C	Md.	0,328	0,358	0,528	0,583	0,667	0,832	0,868	0,959
	D.P.	0,038	0,026	0,101	0,082	0,126	0,068	0,014	0,100
	C.V.	11,58	7,26	19,12	14,06	18,89	7,69	1,61	10,42
D	Md.	0,426	0,485	0,616	0,702	0,827	0,832	1,003	1,128
	D.P.	0,036	0,052	0,107	0,087	0,157	0,182	0,016	0,073
	C.V.	8,45	10,72	17,37	12,39	18,98	21,87	1,59	6,47
E	Md.	1,844	2,134	2,821	3,296	4,662	5,281	6,172	6,557
	D.P.	0,168	0,096	0,043	0,035	0,986	0,364	0,441	0,506
	C.V.	9,11	4,49	1,52	1,06	21,14	6,89	7,14	7,71
F	Md.	3,085	3,649	5,886	6,537	12,476	15,989	17,170	18,472
	D.P.	0,269	0,146	1,256	2,049	3,518	2,718	2,625	1,163
	C.V.	8,71	4,00	21,33	31,34	28,19	16,99	15,28	6,29
G	Md.	0,199	0,200	0,287	0,330	0,534	0,723	0,897	0,998
	D.P.	0,034	0,098	0,052	0,061	0,154	0,118	0,104	0,035
	C.V.	17,08	49,00	18,11	18,48	28,83	16,32	11,59	3,50
H	Md.	0,320	0,383	0,517	0,566	0,912	1,237	1,234	1,277
	D.P.	0,080	0,055	0,097	0,071	0,206	0,031	0,060	0,097
	C.V.	25,00	14,36	18,76	12,54	22,58	2,50	4,86	7,59
I	Md.	0,156	0,202	0,238	0,276	0,410	0,520	0,588	0,593
	D.P.	0,014	0	0,037	0,027	0,092	0,012	0,072	0,079
	C.V.	8,47	0	15,54	9,78	22,43	2,30	12,24	13,32

O corpo destas larvas apresenta-se coberto por duas cutículas, uma interna, aderida ao corpo, e outra externa, mais frouxa, que forma uma coleira cuticular ao nível da cabeça (fig. 26). Os fasmides e os deirides são rudimentares e pouco perceptíveis.

Na cabeça persistem os dois pseudolábios salientes com o apice agudo, cada um com um par de papilas basais. Os deirides situam-se abaixo do anel nervoso, ao nível do poro excretor, e têm localização lateral.

As glândulas cefálicas, talvez devido ao espessamento da cutícula, são pouco visíveis, mas as anais e esofágicas persistem bem evidentes.

Aos 27 dias as estruturas internas, principalmente o aparelho reprodutor, tornam-se mais individualizadas. O corpo reveste-se por três cutículas, a externa, frouxa e estriada, formando, junto com a mediana, um anel cuticular ao nível da cabeça; a interna, muito delicada, reveste intimamente o corpo.

Em 30 formas observadas, nove possuíam o primórdio em tubo e 21 apresentavam-no bifurcado. Surge aqui um carácter nas formas com primórdio genital bifurcado, isto é, a porção anterior deste proemina na cutícula interna, mas não ha ainda abertura genital externa (fig. 24). As medidas das formas masculinas e femininas analisadas não mostraram diferenças.

O animal 12, necropsiado aos 45 dias de infestação, mostrou dez formas em terceiro estadio (Quadros VIII e IX); tanto as masculinas como as femininas apresentam um par de papilas caudais situadas no terço medio da distancia que vai do anus à ponta da cauda. Estas papilas partem da cutícula interna e proeminam na media, sendo obliterada pela cutícula externa (fig. 27). Todas as formas em terceiro estadio possuíam três cutículas revestindo o corpo (fig. 26 e 27). Além disto, formas em muda para o quarto estadio, em numero de três, foram por nós observadas; mostravam a cutícula externa frouxa e corrugada nos pontos de inserção cefálica e anal. As formas em muda já possuem as estruturas cefálicas do quarto estadio.

Os machos observados aos 45 dias de idade e em numero de dois foram medidos separadamente; apresentam, em media, o comprimento do esofago e a distancia que vai do anus à ponta da cauda (distancias E e G na fig. 20), ligeiramente maiores que as femeas. Não possuem espículos nesta idade.

Durante o periodo extra-cístico do terceiro estadio, medimos 201 formas de sexos indiferenciados, dois exemplares masculinos e oito

formas femininas como mostram os Quadros VIII e IX.

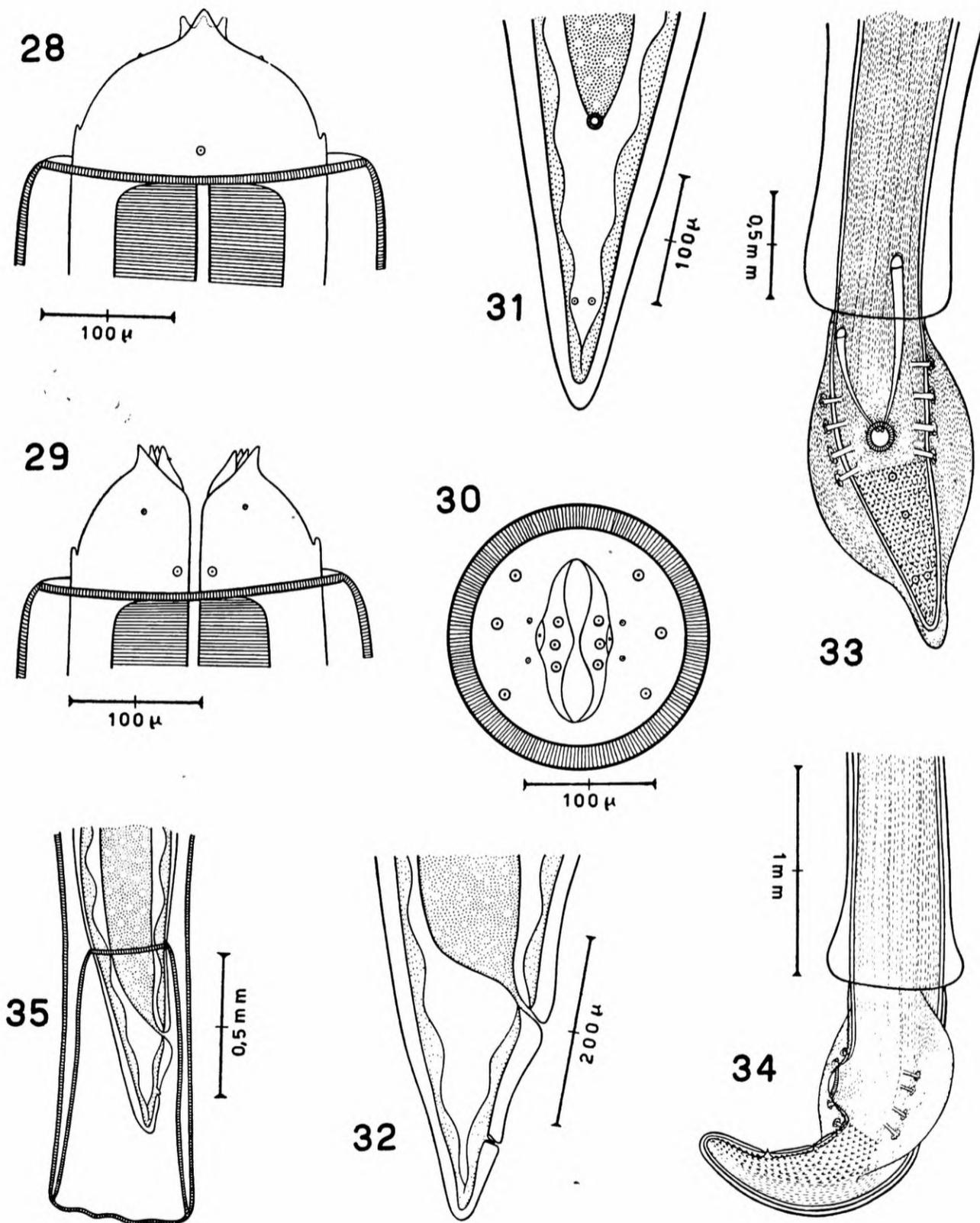
Em resumo, diremos que esta fase, do terceiro estadio, dura cerca de 45 dias e se caracteriza morfológicamente pelo desenvolvimento do primórdio genital que inicia a diferenciação sexual.

4. — *Quarto estadio.* — O gato 12, necropsiado aos 45 dias após a infestação, além de 10 larvas em terceiro estadio e 3 em muda para o quarto, apresentou 17 formas em quarto estadio. As três formas em muda foram incluídas no quarto estadio que, assim, se acha representado por 20 formas, sendo sete masculinas e 13 femininas. Os gatos 11 e 7, necropsiados com 60 e 75 dias respectivamente, somente apresentaram formas em quarto estadio, sendo 19 masculinas e 35 femininas, e o gato 9, autopsiado aos 95 dias após a infestação, possuía 18 exemplares em quarto estadio, sendo 17 femeas e 1 macho e 11 em quinto, sendo 7 machos e 4 femeas. Ficou estabelecido o prazo de 50 dias para a duração aproximada do quarto estadio (Quadros VIII e IX).

Podemos defini-lo como o periodo de crescimento e diferenciação sexual externa. As formas, embora imaturas, já possuem, principalmente os machos, os caracteres dos adultos, exceto a estrutura cefálica, que ainda se modifica no quinto estadio; os órgãos genitais também não se apresentam ainda completamente desenvolvidos. O quarto estadio inicia-se com formas masculinas apresentando comprimento medio de $8,79 \pm 2,33$ mm e as femininas $8,65 \pm 0,98$ mm; termina aos 95 dias após a infestação com formas masculinas medindo 27,49 mm e femininas com $30,68 \pm 9,53$ mm.

Se observarmos o Quadro IX, veremos que os machos, até aos 75 dias de infestação, crescem mais rapidamente que as femeas (Quadro VIII); somente quando as femeas se aproximam do quinto estadio é que o crescimento se torna mais rapido.

Os caracteres morfológicos das larvas em quarto estadio, aos 45 dias de infestação são: corpo revestido por duas cutículas, uma interna, aderida intimamente ao corpo e recobrendo as papilas, e outra a externa, frouxa e espessa, que, ao nível das papilas, se insere em sua base deixando o apice livre, o mesmo ocorrendo para os orificios naturais. A cabeça quando examinada por cima (fig. 30), mostra o anel cuticular formado pela cutícula externa e dois fortes lábios com cinco pares de papilas; em cada labio se localizam cinco papilas: uma mediana e duas laterais, dispostas regularmente na base e guardando entre si aproximadamente a mesma



Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 28 - extremidade anterior da larva em 4.º estadio com 45 dias, vista pela face dorsal. 29 - idem vista pela face lateral. 30 - idem vista de frente. 31 - cauda da mesma larva vista pela face ventral. 32 - idem vista pela face lateral. 33 - cauda da larva em 4.º estadio (forma masculina) com 60 dias, vista pela face ventral. 34 - idem vista pela face lateral. 35 - cauda de larva em 4.º estadio (forma feminina) com 75 dias, vista pela face lateral.

distancia, e um par localizado acima da parte mediana do labio. Entre os labios fica a boca, cuja luz tem a forma de ampulheta. Os labios apresentam o apice denticulado, havendo um dente externo, maior e rigido e três pequenos denticulos internos dispostos em uma só fileira. Os denticulos são mais baixos que o dente externo, de modo que, ao exame pela face dorsal ou ventral, se vêem apenas os dois denticulos laterais, ficando o mediano escondido pelo dente externo (fig. 28). Ao exame pela face lateral (fig. 29) a cabeça mostra as papilas cefalicas localizadas na base dos labios, sendo a mediana proeminente e os denticulos internos dispostos em fileira.

Ao nível do poro excretor e colocados lateralmente, estão os deirides bem desenvolvidos e em numero de um par.

As estruturas caudais nos dois sexos permanecem idênticas às das formas no fim do terceiro estadio; apenas o par de papilas caudais se torna bem mais individualizado, como se vê nas figuras 31 e 32, que mostram a extremidade caudal vista pelas faces ventral e lateral respectivamente.

Aos 60 dias após a infestação, 15 dias depois da muda, o corpo de alguns exemplares já se reveste de três cutículas. Na cauda inicia-se diferenciação sexual. Os machos já possuem as asas caudais com nervuras longitudinais e apresentam rudimentos de quatro pares de papilas pedunculadas (fig. 33) visíveis com forte aumento. Aparecem dois espiculos subiguais, cuja extremidade distal se insinua em uma cloaca saliente, onde existem nervuras radiais. A cauda apresenta quatro papilas, sendo duas distais, uma mediana e outra próxima à cloaca. No ponto onde termina a protuberância cloacal, a cauda se reveste ventralmente de escamas em V, dispostas simetricamente em linhas transversais. Os testiculos começam a esboçar-se e aparecem como duas pequenas esferas, uma ao lado da outra, localizadas um pouco adiante do anus. Os espiculos são iguais, muito pequenos, mostram-se como se fossem duas linhas quitinosas localizadas, uma de cada lado, e convergindo para a cloaca (fig. 33). Os machos apresentam ainda outras diferenças que nos permitem separá-los das fêmeas. Assim, a distancia que vai do anus à ponta da cauda, nos machos (Quadro IX) é quase duas vezes maior que nas fêmeas (Quadro VIII). A cauda do macho é mais fina e assume aspecto de bota; nas fêmeas a cauda é romba. As fêmeas não possuem expansão cuticular, são, em media, mais curtas que os machos. Seus uteros, já

bem desenvolvidos, são enovelados posteriormente.

Aos 75 dias todas as formas se mostram revestidas por três cutículas e as estruturas acima descritas se tornam mais evidentes, a olho nu já sendo possível separar com precisão os sexos; os machos possuem extremidade caudal curva e dirigida ventralmente ao passo que as fêmeas possuem cauda reta.

Nos machos aparecem nitidamente as asas caudais (fig. 34) e estruturas anexas, tais como quatro pares de papilas pedunculadas. A face ventral da asa é constituída por uma serie de cerca de nove veias longitudinais, onduladas e circulares ao nível da cloaca. A cloaca é proeminente nesta idade. As papilas localizadas na face ventral da cauda são nítidas. O par posterior é saliente e proemina para fora sob a forma de dois pequenos espinhos.

Nas fêmeas persiste o par de papilas posteriores salientes como nos machos (fig. 35); a cutícula externa se prende na epiderme acima do anus formando um anel que dá origem à expansão cuticular, por crescimento da cutícula; nem todas as fêmeas, aos 75 dias possuem expansão cuticular; umas têm-na em formação, isto é, a cutícula externa constitui apenas um anel acima do anus; em outras a cutícula externa se dobra sobre a cauda mas não a cobre; em outras ainda a dobra da cutícula externa se prolonga além da cauda, como mostra a figura 35. As expansões cuticulares das fêmeas são facilmente desfeitas quando a cutícula externa é tracionada cranealmente.

As 18 formas colhidas aos 95 dias no gato 9 não diferem morfológicamente das observadas aos 75 dias; apenas é de se notar que a distancia que vai do anus à ponta da cauda (distancia G) é nos machos (Quadro IX) o dobro da das fêmeas (Quadro VIII); embora esta distancia tenha sido tomada em um só macho, em nenhuma das 17 fêmeas encontramos máximas que pudessem ser confundidas com a do macho.

Durante o quarto estadio necropsiamos quatro gatos: dois nos periodos de mudas e dois no intervalo de 45 a 95 dias. Medimos um total de 65 fêmeas e 27 machos.

5. *Quinto estadio.* — Aos 95 dias após a infestação as formas estavam passando para o quinto estadio. O gato necropsiado nesta época mostrou, além de formas em quarto estadio, 11 formas em quinto estadio, sendo sete machos (Quadro IX) e quatro fêmeas (Quadro VIII).

Acompanhamos este estadio até 152 dias após a infestação, ou seja, durante 57 dias após a quarta muda e, contudo, não alcançamos a es-

QUADRO IX MEDIDAS DAS FORMAS MASCULINAS NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO, EM MM.

Nº DO GATO		12		11	7	9		1	5
IDADE DE INF.		45		60	75	95		132	152
ESTÁDIOS		3º	4º	4º	4º	4º	5º	5º	5º
Nº DE FORMAS		2	7	8	11	1	7	3	4
A	MD.	7,235	8,791	13,347	16,941	27,493	33,396	37,795	43,158
	D.P.	0	2,337	1,141	2,812	-	1,483	0,765	1,364
	C.V.	0	26,58	8,54	16,59	-	4,44	2,02	3,16
B	MD.	0,252	0,276	0,350	0,402	0,491	0,557	0,588	0,687
	D.P.	0	0,025	0,052	0,155	-	0,054	0,016	0,072
	C.V.	0	9,05	14,85	38,50	-	9,69	2,72	10,48
C	MD.	0,353	0,386	0,531	0,573	0,665	0,702	0,800	0,976
	D.P.	0	0,023	0,212	0,056	-	0,054	0,072	0,072
	C.V.	0	5,95	39,92	9,77	-	7,69	9,00	7,37
D	MD.	0,454	0,510	0,632	0,726	0,926	0,959	0,964	1,193
	D.P.	0	0,021	0,047	0,043	-	0,069	0,083	0,039
	C.V.	0	4,11	7,43	5,92	-	7,19	8,60	3,26
E	MD.	2,025	2,145	2,857	3,339	4,051	5,000	5,458	5,498
	D.P.	0	0,089	0,241	0,262	-	0,464	0,028	0,409
	C.V.	0	4,14	8,43	7,84	-	9,28	0,51	7,43
J	MD.	-	-	0,909-0,713	0,941-0,755	1,010-0,770	1,024-0,822	1,111-1,000	1,186-1,010
	D.P.	-	-	0,121-0,115	0,091-0,070	-	0,038-0,038	0 0	0,005-0,002
	C.V.	-	-	13,31-16,12	9,67-9,27	-	3,71-4,62	0 0	0,42-0,19
G	MD.	0,217	0,223	0,586	0,807	1,302	1,479	2,025	2,061
	D.P.	0	0,022	0,040	0,109	-	0,078	0	0,217
	C.V.	0	9,86	6,82	13,50	-	5,27	0	10,52
H	MD.	0,319	0,390	0,549	0,573	0,694	0,888	1,080	1,114
	D.P.	0	0,030	0,080	0,077	-	0,054	0,042	0,038
	C.V.	0	7,69	14,57	13,43	-	6,08	3,88	3,41
I	MD.	0,161	0,217	0,231	0,263	0,376	0,421	0,482	0,484
	D.P.	0	0,023	0,021	0,035	-	0,051	0,016	0,014
	C.V.	0	10,59	9,09	13,30	-	12,11	3,31	2,89

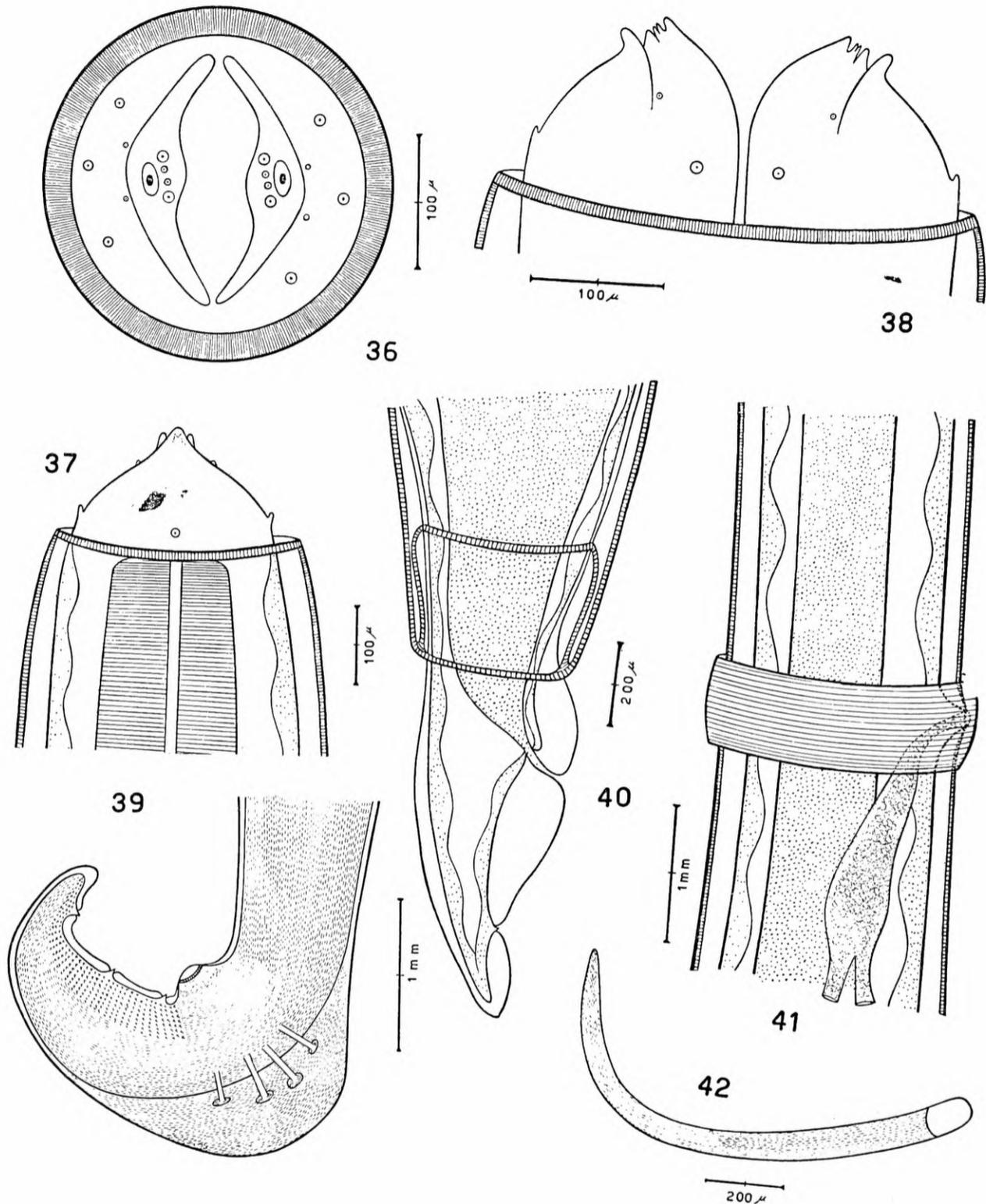
tabilização do crescimento. Os exemplares medidos aos 132 dias mostraram-se bem menores que os medidos aos 152 dias (Quadros VIII e IX). Não prolongamos as observações além deste período visto que os helmintos já haviam atingido a maturidade sexual e os gatos parasitados exibiam ovos nas fezes (Quadro X). Foram assim sacrificados. Aliás não visamos verificar o crescimento máximo dos exemplares e sim atingir e observar o fechamento do ciclo.

Aos 95 dias após a infestação, os exemplares machos mediram, em média $33,39 \pm 1,48$ mm e aos 152 dias alcançaram $43,15 \pm 1,36$ mm (Quadro IX); as fêmeas iniciaram este estágio com comprimento médio de $40,37 \pm 1,06$ mm e aos 152 dias atingiram $51,10 \pm 2,98$ mm (Quadro VIII).

As formas em quinto estágio são morfologicamente muito próximas das em quarto estágio, diferindo por pequenos detalhes da cabeça e da cutícula.

O corpo é revestido por duas cutículas, uma interna, fina e mais delicada, e outra externa grossa e estriada. As cutículas inserem nas bordas dos orifícios naturais de modo a deixá-los livres, o mesmo ocorrendo com relação às papilas.

A cabeça quando vista de frente (fig. 36) mostra o anel cefálico formado pela cutícula externa; em cada labio ha, como no quarto estágio, cinco papilas, que, com as do outro labio, formam cinco pares, dispostos simetricamente. Os apices dos labios modificam-se, mostrando quatro denticulos, em consequência da



Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 36 extremidade anterior de adulto jovem, com 95 dias, vista pela frente. 37 idem vista pela face dorsal. 38 idem vista pela face lateral. 39 - cauda de macho jovem, com 95 dias vista pela face lateral. 40 cauda de femea jovem, com 95 dias, vista pela face lateral. 41 anel quitinoso em torno da vulva. 42 - espiculo do macho.

bifurcação do denticulo mediano; os dois denticulos resultantes são mais finos e mais baixos que os laterais. O dente externo do labio persiste desenvolvido e cobre os denticulos, tornando difícil sua visibilidade. Diafanizada a cabeça, nota-se, porem, a bifurcação do denticulo mediano (fig. 37). Ao exame da cabeça pela face lateral (fig. 38) é que se verificam com exatidão, as diferenças entre os exemplares de quarto e quinto estadio.

A cauda do macho é semelhante à das larvas masculinas do quarto estadio, diferindo por se apresentar revestida por duas cuticulas (fig. 39) e ter os órgãos masculinos completamente desenvolvidos; os espiculos são subiguais (fig. 42) e se mostram como dois órgãos alongados e espessos que proeminam na cloaca.

A femea tem cauda idêntica à das larvas femininas em quarto estadio; aos 95 dias encontram-se femeas com inicio de expansão (fig.

QUADRO X — RESUMO DAS OBSERVAÇÕES EM OITO GATOS QUE SE DESTINARAM A FECHAR O CICLO COM APARECIMENTO DE OVOS NAS FEZES

N.º do gato	Data da Inoculação	Data em que apareceram ovos nas fezes	Duração do ciclo em dias até o aparecimento de ovos nas fezes	OBSERVAÇÕES
1	9-9-55	19-1-56	132	parasitismo pelos dois sexos
6	17-9-55	28-1-56	133	parasitismo pelos dois sexos
8	17-9-55	14-2-56	150	parasitismo pelos dois sexos
5	15-9-55	13-2-56	151	
4	15-9-55	—	—	parasitismo só por fêmeas
3	13-9-55	—	—	parasitismo só por fêmeas
326	12-8-55	13-1-56	154	parasitismo pelos dois sexos
461	12-8-55	—	—	parasitismo só por fêmeas

40) e outras já com expansão cuticular, que ultrapassa a extremidade da cauda. Duas das quatro fêmeas colhidas aos 95 dias foram dissecadas, encontrando-se ovos não embrionados nos uteros; nestas, assim como nas outras, verificamos a vulva obliterada por um anel de coloração castanha escura (fig. 41). Tal anel estava presente em todas as fêmeas que continham ovos nos uteros, mas não foi encontrado nas fêmeas obtidas de gatos que não apresentavam machos em parasitismo. As fêmeas, colhidas nos gatos que mostraram ovos nas fezes possuíam o anel quitinoso em torno da vulva e efetuaram postura em solução fisiológica. A postura dá-se por contração do ovejector que empurra os ovos contidos na vagina e os força a se exteriorizarem por fendas existentes entre a cutícula e o anel. Durante a fixação, o anel geralmente se desprende do corpo ou fica frouxamente ligado à fêmea. A presença do anel ao nível da vulva parece, assim, a manifestação externa de que a fêmea foi fecundada. As fêmeas que não o possuem apresentam ovulos nos uteros, como ocorreu nos gatos ns. 3, 4 e 461 que, não tendo aparecido com ovos nas fezes, foram necropsiados e a necropsia mostrou parasitismo só por fêmeas.

Uma vez surpreendido o quinto estadio, 95 dias após a inoculação, passamos a examinar diariamente as fezes dos gatos pelos métodos direto e de sedimentação. Como se vê no Quadro X, cinco gatos eliminaram ovos nas fezes dentro de um período que variou entre 132 e 154 dias após a infestação. Os gatos ns. 4, 3 e 461 foram necropsiados após 158, 161, 178 dias respectivamente e em parasitismo encontramos apenas fêmeas em número de 2, 1 e 8

respectivamente. No Quadro VIII estas fêmeas não foram tomadas em consideração, por serem menores e mais finas que as fêmeas fecundadas.

No Quadro X incluímos o animal 326 que foi omitido nos Quadros VIII e IX pela seguinte razão: aos 154 dias, as fezes deste animal foram positivas para ovos de *Physaloptera*; no dia seguinte observamos um macho e uma fêmea eliminados espontaneamente com as fezes; no terceiro dia as fezes ainda foram positivas, mas na necropsia praticada neste dia verificamos que o estômago não apresentava parasitas. Omitimos também nos Quadros VIII e IX os animais 6 e 8 por terem sido autopsiados com infestações tendo a mesma idade que as dos gatos 1 e 5 respectivamente.

VI — DURAÇÃO DO CICLO EVOLUTIVO

Em virtude das dificuldades inerentes a trabalhos desta natureza, não conseguimos verificar a duração do período de desenvolvimento embrionário dos ovos, como aliás, também não o fizeram os diversos autores que estudaram o ciclo evolutivo dos diferentes fisalopteridas. Conseguimos, entretanto, com muita precisão, determinar a duração do ciclo evolutivo no hospedeiro intermediário e, com grande aproximação, no hospedeiro definitivo.

1. *Duração do ciclo no hospedeiro intermediário.* Alicata (1), trabalhando com *P. turgida* em *Blatella germanica*, observou que as larvas atingiram o terceiro estadio 27 dias após haverem

ingerido ovos embrionados, mas não pôde determinar a duração dos estádios iniciais, visto que só conseguiu infestar duas baratas.

Hobmaier (2), estudando o ciclo da *P. maxillaris* no mesmo hospedeiro, observou larvas de terceiro estadio quatro ou seis semanas após a infestação, mas não dá outras informações.

Petri (7), infestando *B. germanica* com ovos de *P. rara* e mantendo-a à temperatura ambiente (não precisa qual a temperatura), obteve as primeiras larvas do segundo estadio 11 dias depois; as primeiras larvas do terceiro estadio foram observadas 21 dias depois da infestação.

Schell (10, 11), estudando o ciclo da *P. hispida* na *B. germanica* e operando à temperatura de 28°C-30°C, verificou larvas do segundo estadio 14 a 17 dias após a infestação; as larvas do terceiro estadio apareceram 30 a 35 dias depois da infestação de ovos.

De um modo geral, estes autores não tiveram o cuidado de transferir os hospedeiros intermediários, após o repasto infestante, para recipientes limpos. Pelo contrario, deixavam-nos permanecer em presença do alimento até que este fosse completamente ingerido. Daí certa irregularidade nos resultados obtidos e o fato de haver Petri (7) observado, em suas infestações experimentais, larvas dos três estádios dentro do mesmo cisto. Isto, como já tivemos ocasião de dizer, se deve indiscutivelmente a superinfestações do hospedeiro por ovos ingeridos em épocas diversas.

Para poder determinar com segurança a duração do ciclo no hospedeiro intermediário tivemos o cuidado de usar lotes numerosos de grilos que eram in-

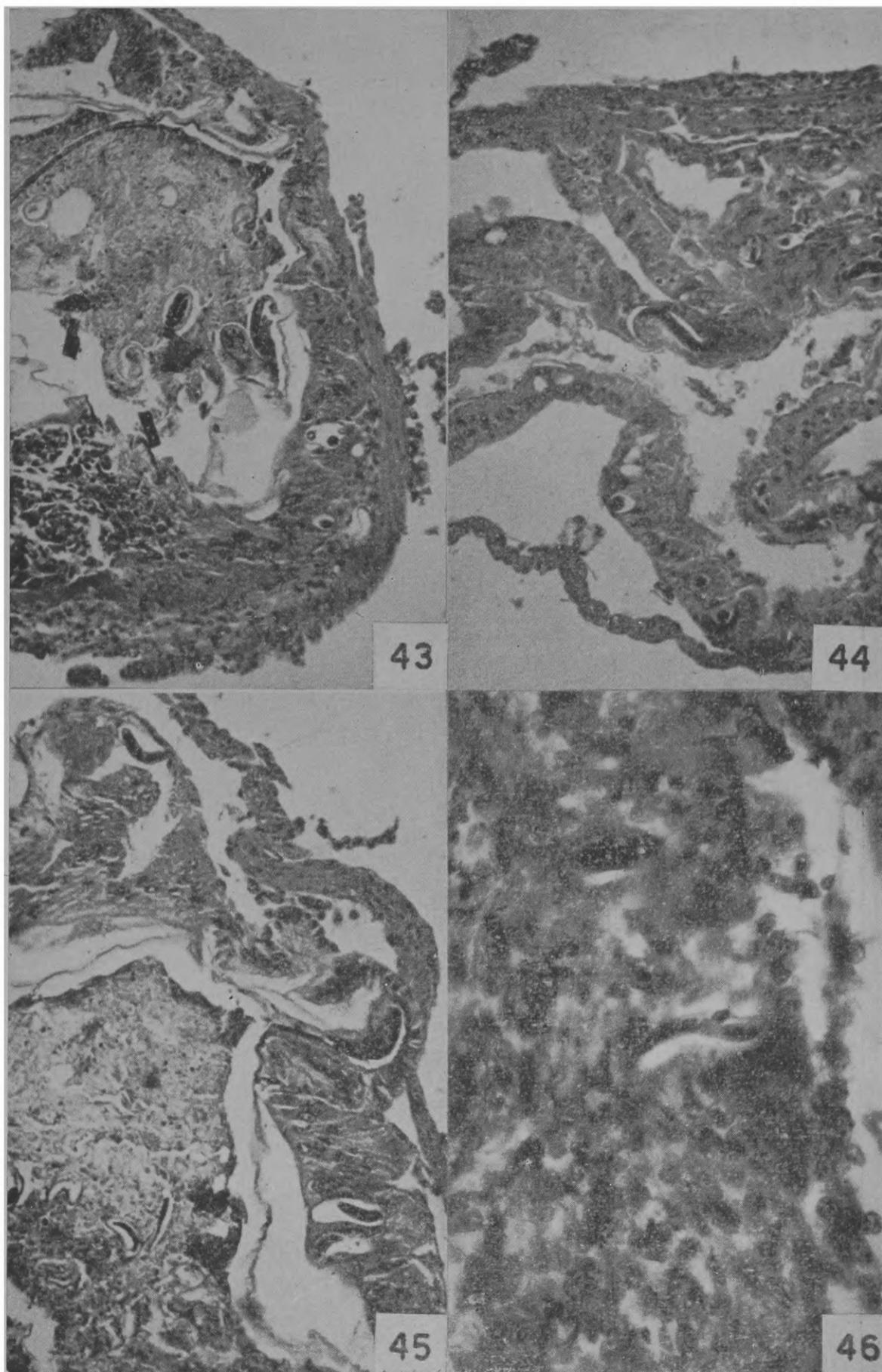
festados todos ao mesmo tempo e retirados da presença do alimento ou do meio contaminado. Operando com grilos jovens e adultos, mantidos em diversas temperaturas, verificamos que a duração do ciclo e suas fases parece depender da temperatura ambiente (Quadro XI).

A menor duração foi observada no lote 30, constituído por 220 ninfas mantidas em ambiente onde a média das temperaturas mínimas foi de 22,3°C e das máximas 23,9°C. Nestas condições, verificamos que a primeira muda se deu 12 dias após a infestação e a segunda muda 23 dias depois da ingestão dos ovos. Assim o primeiro estadio durou 12 dias e o segundo 11. É interessante assinalar o notável sincronismo no desenvolvimento das larvas, todas sofrendo as mudas nos períodos supra indicados. Note-se que o número grande de grilos usados nesta experiência torna muito segura nossa observação.

A influencia da temperatura pode ser apreciada no Quadro XI. De fato, nos lotes 7 e 11, constituídos por 147 e 124 grilos adultos respectivamente e mantidos aproximadamente nas mesmas condições de temperaturas médias (17,1°C-19,3°C, para o lote 7, e 16,7°C-18,9°C para o lote 11), a duração do ciclo até a segunda muda (terceiro estadio) foi de 43-45 dias, havendo as larvas passado para o segundo estadio entre o 24.º e o 26.º dia após a infestação. Já no lote 29, constituído por 35 adultos e mantido em ambiente cujas temperaturas médias foram, 19,6°C e 22,2°C respectivamente para as mínimas e máximas, a duração do ciclo foi de 29 dias, havendo o segundo estadio sido atingido no 13.º dia após a infestação.

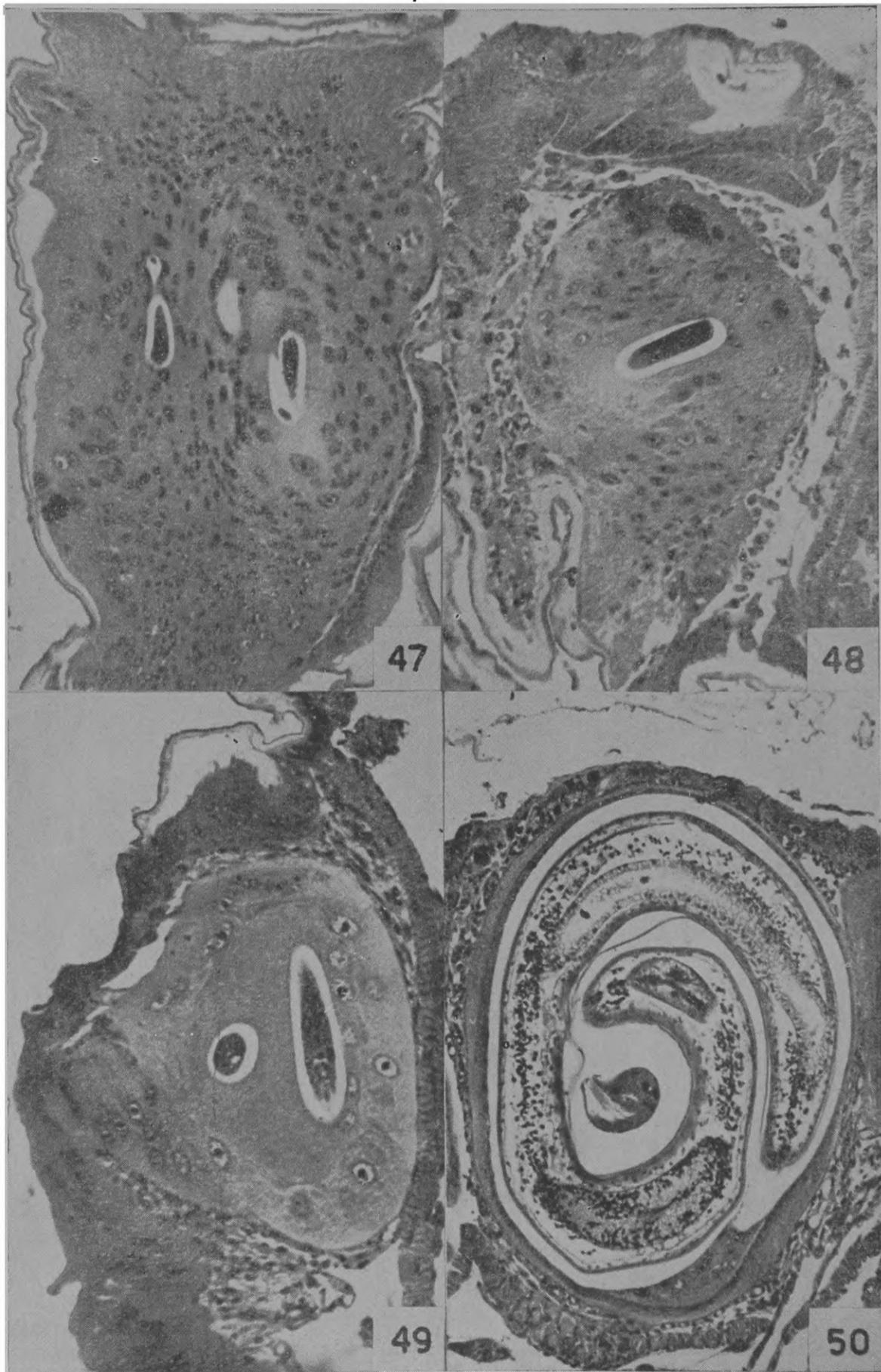
QUADRO XI — DURAÇÃO DO CICLO EVOLUTIVO NO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO

N.º do lote	Fase	N.º de grilos	1.ª muda	2.ª muda	Temp. media °C	
					Max.	Min.
7	Adulto	147	24 a 26 d.	42-45 d.	19,29	17,06
11	Adulto	124	24 a 26 d.	43-45 d.	18,89	16,72
27	Ninfa	113	13 a 14 d.	30 d.	21,76	19,21
29	Adulto	35	13 d.	29 d.	22,15	19,63
30	Ninfa	220	12 d.	23 d.	23,91	22,31



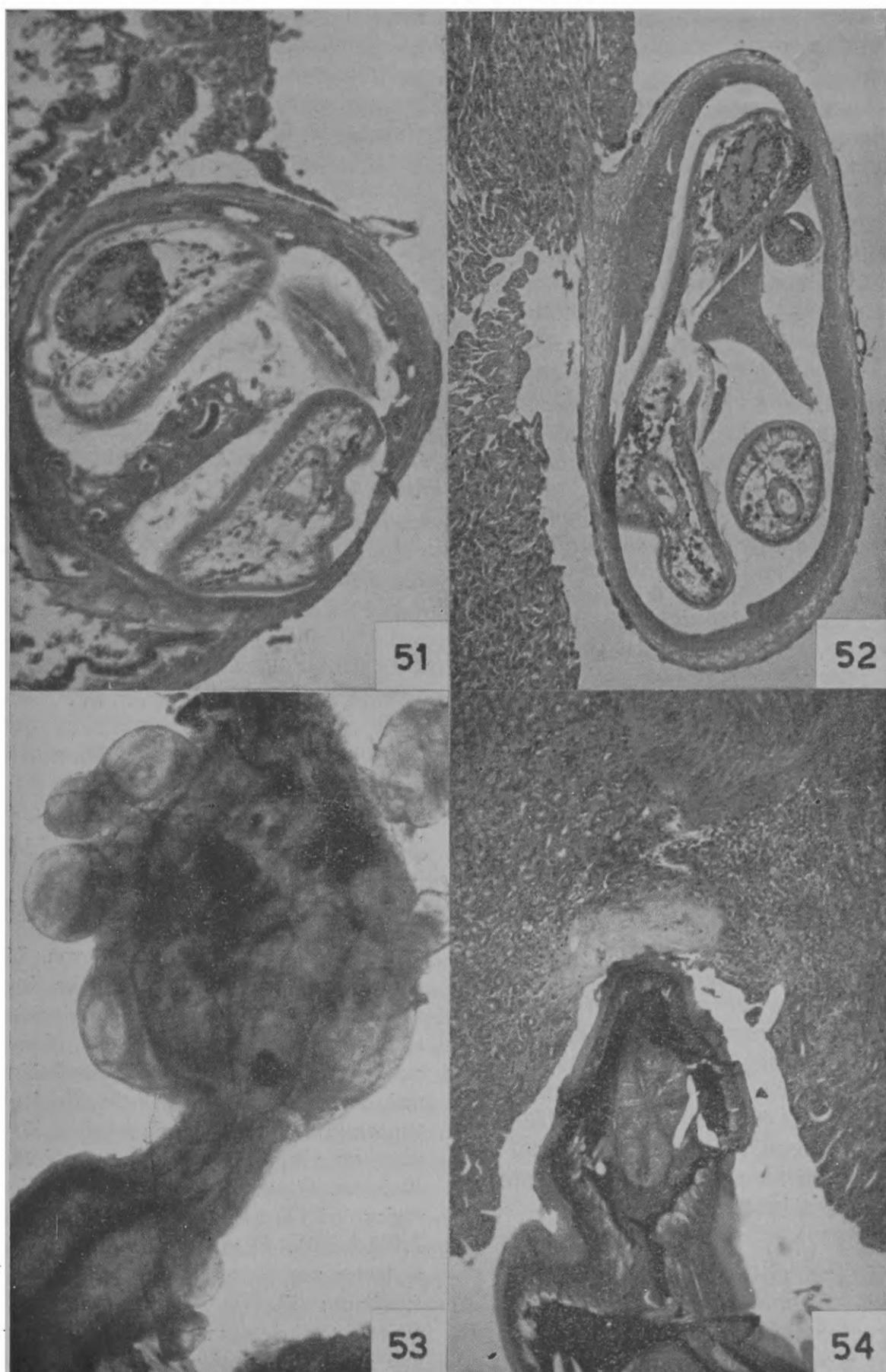
Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 43 ovos e larvas em 1.º estágio, na luz do reto do grilo, 6 horas após a infestação. 44 - penetração de uma larva na parede do reto, 6 horas após a infestação. 45 - larvas na parede do reto, 20 horas após a infestação: notar a destruição celular. 46 - fase inicial da reação celular contra a larva, 40 horas após a infestação



Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 47 reação celular em torno de larvas, 60 horas após a infestação. 48 - idem 4 dias após a infestação. 49 idem 6 dias depois da infestação. 50 - cisto completamente desenvolvido com larva em 3.º estágio, 50 dias após a infestação.



Physaloptera praeputialis von Linstow, 1889:

Figuras: 51 cisto completamente desenvolvido, com larva em 3.º estadio com 50 dias, e uma larva com 5 dias, proveniente de superinfecção. 52 cisto apendicular com 50 dias. 53 - reto e empola retal do grilo com cistos, 50 dias após a infestação. 54 extremidade anterior de um adulto implantado na mucosa gastrica do gato.

Com grilos jovens (dois meses de idade) observa-se o mesmo fato. É o que indicam os dados fornecidos pelos lotes 27 e 30, constituídos por 113 e 220 ninfas respectivamente.

A idade do grilo, se tem influencia na intensidade da infestação, como já dissemos, não afeta, porém, a duração do ciclo. Assim, nos lotes 27 e 29, constituídos respectivamente por 113 ninfas e 35 adultos, mas mantidos aproximadamente nas mesmas condições de temperatura, verificamos praticamente a mesma duração das fases do ciclo.

Durante as observações realizadas sobre os três lotes de adultos com que trabalhamos e já mencionadas, procuramos registrar separadamente os resultados obtidos com grilos dos dois sexos. Estes resultados foram absolutamente iguais e assim não mencionamos os sexos, ao apresentá-los no Quadro XI.

2. *Duração do ciclo no hospedeiro definitivo.* Alicata (1) trabalhando com a *P. turgida*, cujo hospedeiro definitivo é o gambá, *Didelphis virginiana*, e Hobmaier (2), estudando a *P. maxillaris*, parasita do *Spilogale putorius*, *S. gracilis gracilis* e *S. gracilis sexatilis* e outros animais tentaram a infestação de varios animais de laboratorio por não disporem dos hospedeiros definitivos naturais, mas não conseguiram resultados positivos.

Como já vimos, Petri (7) tentou a infestação de um cão e um gato com larvas de *P. rara*; o gato, sacrificado 29 dias depois, mostrou duas formas imaturas. No cão encontrou, um mês após, formas jovens, machos e femeas. Petri e Ameel (9) conseguiram, porém, encontrar adultos em um gato 83 dias após a inoculação.

Schell (10) trabalhando com a *P. hispida*, parasita natural do rato do algodão, *Sigmodon hispidus littoralis*, parece ter sido o unico a conseguir observar a evolução de uma fisaloptera no hospedeiro definitivo até a maturidade sexual com alguns detalhes, mas não surpreendeu mudas e, assim, não pode determinar a duração dos diversos estadios. Verificou, porém, a presença de ovos nas fezes de ratos 73 a 90 dias após a infestação.

Para acompanhar a evolução da *P. praeputialis* no gato, servimo-nos de 20 animais. Apesar do pequeno numero de animais com que trabalhamos, tivemos a oportunidade de surpreender todas as mudas e, assim, determinar com grande aproximação a duração das varias fases. Os resultados que obtivemos foram os seguintes: terceira muda (quarto estadio) aos 45 dias; quarta muda (quinto estadio) aos 95 dias; postura (maturidade sexual, fecundação e desenvolvimento dos ovos) aos 131-156 dias.

Em resumo, tomando em consideração o lote de grilos n.º 30, que foi mais numeroso e no qual as observações foram mais precisas, temos as seguintes durações para as diferentes fases do ciclo evolutivo da *P. praeputialis*.

- A) Em *G. (A.) assimilis*
 primeiro estadio 12 dias
 segundo estadio 11 "
- B) Em *Felis catus domesticus*
 terceiro estadio 45 dias
 quarto estadio 50 "
 quinto estadio36 a 61 "
- C) Duração minima do ciclo completo 154 dias

RESUMO E CONCLUSÕES

A *Physaloptera praeputialis* von Linstow, 1889 vive fixada à mucosa gastrica do gato e as femeas eliminam ovos embrionados que saem com as fezes do hospedeiro para o meio exterior. Quando retiradas do seu habitat normal e conservadas em solução fisiologicas, à temperatura ambiente ou de estufa a 37°C, permanecem vivas e efetuam postura durante até 12 horas. O numero de ovos assim eliminados variou de 2.100 a 19.060 (mediana: 4.540, ICMd: 2.960-5.540). O numero de ovos embrionados restantes nos uteros variou de 8.200 a 51.900 (mediana: 17.000, ICMd: 15.000-24.500) e assim o total de ovos embrionados que uma femea pode conter variou de 10.940 a 58.960 (mediana: 22.540, ICMd: 18.400-29.960). O numero de ovos não embrionados contidos nos uteros variou de 65.500 a 248.000 (mediana: 127.000, ICMd: 114.000-156.000). O numero total de ovos que uma femea pode conter variou de 84.360 a 293.400 (mediana: 159.940, ICMd: 138.400-177.980) .

Por outro lado, ainda que nossas observações não tenham tido a extensão que fora de desejar, verificamos que a duração do ciclo no *G. (A.) assimilis* varia com a temperatura.

REFERENCIAS

1. ALICATA, J. E. — Larval development of the spirurid nematode, *Physaloptera turgida*, in the cockroach, *Blatella germanica*. *Papers on Helm. 30 yr. Jubileum, K. I. Skrjabin*, p. 11-4, 1937.
2. HOBMAIER, M. — Extramammalian phase of *Physaloptera maxillaris* Molin, 1860 (*Nematoda*). *J. Parasit., Urbana* 27 (3): 233-5, 1941.
3. LEE, S. H. — The mode of egg dispersal in *Physaloptera phrynosoma* Ortlepp (*Nematoda: Spiruroidea*), a gastric nematode of Texas horned toads, *Phrynosoma masoni*, *J. Parasit., Urbana* 41 (1): 70-4, 1955.
4. MORGAN, B. B. — A summary of the *Physalopterinae* (*Nematoda*) of North America. *Proc. helm. Soc. Washington* 8 (1): 28-30, 1941.
5. NAIR, K. R. — Table of confidence interval for the median in samples from any continuous populations. *Sankhye: J. Statistic*, 4: 551-8, 1940.
6. OPINION 299: Validation under the Plenary Powers, of the generic names *Tetigonia* and *Acrida* in the Order Orthoptera (Class Insecta) as from Linnaeus, 1758 (Ruling supplementary to the Ruling given in *Opinion 124*). *Opin. and Decl. rend. Intern. Comm. Zool. Nomenclature*, 8 (16): 209-236, 1954.
A proposito de nomes invalidados em Orthoptera, inclusive *Gryllulus* Uvarov, 1935.
7. PETRI, L. H. Life cycle of *Physaloptera rara* Hall and Wigdor, 1918 (*Nematoda: Spiruroidea*) with the cockroach, *Blatella germanica*, serving as the intermediate host. *Trans Kans. Acad. Sci.* 53 (3): 331-7, 1950.
8. PETRI, L. H. — Comunicação epistolar, 1950.
9. PETRI, L. H. & AMEEL, D. J. — Studies on the life cycle of *Physaloptera rara* Hall and Wigdor, 1918, and *Physaloptera praeputialis* Linstow, 1889. *J. Parasit., Urbana* 36 (6, sec. 2) supplement, p. 40, 1950.
10. SCHELL, S. C. — Studies on the life cycle of *Physaloptera hispida* Scheel (*Nematoda: Spiruroidea*) a parasite of cotton rat (*Sigmodon hispidus littoralis* Chapman). *J. Parasit., Urbana* 38 (5): 462-9, 1952.
11. SCHELL, S. C. — Tissue reactions of *Blatella germanica* L. to the development larva of *Physaloptera hispida* Schell, 1950 (*Nematoda: Spiruroidea*). *Trans. Amer. micr. Soc. Menasha* 71 (3): 293-302, 1952.
12. TRAVASSOS, L. — *Introdução ao estudo da Helminologia*. Edição da Rev. Brasil., Biol., R. de Janeiro, 173 p., 197 fig., 1950.
13. ZAGO F.º, H. — O *Gryllulus assimilis* (Fabricius, 1775) como hospedeiro intermediário natural da *Physaloptera praeputialis* von Linstow, 1889 (*Nematoda: Spiruroidea*). *Folia Clin. Biol., S. P.*, 26 (1-6): 15-6, 1956.
14. ZAGO F.º, H. & BARRETTO, M. P. — Estudo sobre a prevalência e intensidade de infestação por helmintos intestinais em cães e gatos de Ribeirão Preto, S.P. *Rev. brasil. Malariol., Rio de Janeiro* 9 (2): 295-304, 1957.