

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

Cinética da infecção por *Fasciola hepatica* em  
*Lymnaea (=Pseudosuccinea) columella* proveniente  
do município de Confins - Minas Gerais

**Vinícius Marques Antunes Ribeiro**

Belo Horizonte - MG

2016

**Vinícius Marques Antunes Ribeiro**

Cinética da infecção por *Fasciola hepatica* em  
*Lymnaea (=Pseudosuccinea) columella* proveniente  
do município de Confins - Minas Gerais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia.

**Orientação:** Prof. Dr. Walter dos Santos Lima

**Co-Orientação:** Dra. Cíntia A. J. Pereira

Belo Horizonte - MG

2016

Projeto desenvolvido no Laboratório de Helminologia Veterinária do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

### **COLABORAÇÃO**

Laboratório de Ictiohistologia - ICB/UFMG - Departamento de Morfologia -  
Profa. Dra. Elizete Rizzo

### **SUPORTE FINANCEIRO**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

## AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer:

- Ao Prof. Dr. Walter dos Santos Lima por ter me acolhido e orientado durante a execução dos trabalhos. O Prof. Walter está sempre disponível para ensinar de forma dinâmica e direta, incentivando a busca de resultados com o método "correr na frente tem que ser igual à roda da frente". Obrigado Professor!

- À Dra. Cintia Aparecida de Jesus Pereira pela co-orientação e contribuição ao meu conhecimento, sobretudo, dos moluscos como hospedeiros. Obrigado!

- Ao Prof. Dr. Marcos Pezzi Guimarães pela presença de espírito positiva e motivadora. Grande filósofo e humorista.

- Ao Prof. Dr. Ricardo T. Fujiwara pelo incentivo e orientações durante o processo de minha formação.

- À Profa. Dra. Deborah A. Negrão-Corrêa que sempre esteve com as portas abertas contribuindo com a pesquisa, principalmente durante meu Exame de Qualificação.

- À Profa. Dra. Elizete Rizzo e à técnica Mônica C. P. Ricardo, que contribuíram de sobremaneira para a realização do presente trabalho, por meio da execução dos cortes histológicos seriados.

- Ao Prof. Dr. Alan L. de Melo e aos amigos Fernando, Hudson e Vitor, que foram companheiros durante minha preparação para ingressar no Doutorado.

- À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia - UFMG, especialmente à Sumara e à Sibeles pelo apoio, bom-humor e boa vontade, mesmo nas horas difíceis.

- À Ana Paula Martins pela amizade e agilidade no envio dos artigos do COMUT - UFMG, desde o tempo em que o material vinha impresso.

- Aos amigos e amigas do LabHelVet: Aytube, Ruth, Lanuze, Jordana, Rodolfo, Franciellen, Manoel e ao técnico Hudson Andrade.

- Aos amigos da FUNED e FIOCRUZ: Aristeu, Fábio, Mariana, Heloísa, Aline, Flávia, Rafael e à Dra. Luciana M. Silva, colega de graduação e pesquisadora.

- Ao Sr. Neri e seus salgados salvadores. Pessoa bacana!

- À Sra. Márcia do Biotério pelas boas trocas de ideias sobre a vida.

- Aos meus pais e irmãos por tudo de bom que a vida oferece!

- À Deus.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Agradeço especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia - UFMG, pela oportunidade de realizar o presente estudo, e à Chefe de Departamento Profa. Dra. Élide Mara Leite Rabelo e ao Coordenador do Programa Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara.

## RESUMO

A importância de *Lymnaea columella* é destacada na epidemiologia de *Fasciola hepatica* devido ao crescente número de relatos de infecções naturais do molusco pelo trematódeo no Brasil e em diversos países. O presente trabalho avaliou a sazonalidade de moluscos coletados mensalmente entre janeiro de 2013 a dezembro de 2014, em bebedouros naturais de bovinos localizados em lagoa marginal situada no município de Confins (19°40'17.26" S, 43°57'52.57" O), Estado de Minas Gerais, Brasil. Os moluscos foram coletados em vegetação aquática, troncos de madeira e lama do fundo e margens dos bebedouros. Em laboratório os moluscos e a vegetação foram identificados. Os fatores climáticos de temperatura média e precipitação pluviométrica mensais influenciaram na população dos moluscos *L. columella*, *Biomphalaria* spp., *Melanoides* spp., *Physa* spp. e *Pomacea* spp.. De um total de 1909 gastrópodes coletados, *Physa* spp. foi mais abundante (n=537), seguido de *Melanoides* spp. (n=487), *Pomacea* spp. (n=407), *L. columella* (n=351) e *Biomphalaria* spp. (n=127). O número de *L. columella* coletado em 2014 (n=267) foi maior que no ano 2013 (n=84), quando a precipitação pluviométrica anual total foi 1,7 vezes maior. Durante o estudo, *Biomphalaria* spp. e *Melanoides* spp. apresentaram menor número de espécimes coletados na estação seca, enquanto que *Physa* spp., ocorreu em todo o período do estudo, com distribuição mensal variável entre as estações seca e chuvosa nos dois anos de coleta. Já *Pomacea* spp., obteve maior número durante meses da estação chuvosa de 2013 e de 2014. Não foi observado estágios evolutivos de *F. hepatica* nos espécimes de *L. columella* coletados. A dinâmica da infecção por *F. hepatica* em *L. columella* também foi avaliada por meio da histologia e da contagem de hemócitos circulantes do molusco. Miracídeos foram observados nos tecidos da região cefalopodal e do manto 30 minutos após infecção. Miracídeos/espocistos ocorreram ao 1° dpi, e espocistos totalmente formados foram observados na região cefalopodal ao 7° dpi. Rédias foram localizadas entre o 10° e o 14° dpi, na região cefalopodal e hemocele. Entre o 45° e 50° dpi as rédias continham cercárias e localizavam-se na glândula digestiva do molusco. A análise estatística dos hemócitos totais de *L. columella* infectados por *F. hepatica* foram significativamente diferentes no período de 30 minutos após infecção (p<0,05), 1° dpi (p<0,05), 14° dpi (p<0,001), 21° dpi (p<0,05), 28° dpi (p<0,01) e 45° dpi (p<0,001) em comparação com moluscos não infectados (0 dpi). Portanto, a interferência observada no sistema de defesa interno de *L. columella*, pode ter associação direta com o desenvolvimento de *F. hepatica*.

Palavras-chave: *Lymnaea columella*, sazonalidade, hemócitos, *Fasciola hepatica*, desenvolvimento intramolusco.

## ABSTRACT

The importance of *Lymnaea columella* stands out in *Fasciola hepatica* epidemiology due to growing number of natural infection reports of this mollusc by the trematode in Brazil and several countries. The present work assessed the seasonality of molluscs collected from January 2013 to December 2014 in the border of natural watering troughs of cattle in oxbow lake situated in Confins municipality (19°40'17.26" S, 43°57'52.57" O), Minas Gerais (MG) state, Brazil. The molluscs were collected in aquatic vegetation, tree trunks and mud bottom and in natural watering troughs. In laboratory molluscs and vegetation were identified. The climatic factors of average monthly temperature and rainfall influenced the population of molluscs. *L. columella*, *Biomphalaria* spp., *Melanoides* spp., *Physa* spp. and *Pomacea* spp.. From a total of 1909 collected gastropods, *Physa* spp. was more abundant (n=537), followed by *Melanoides*, spp. (n=487), *Pomacea* spp. (n=407), *L. columella* (n=351) and *Biomphalaria* spp. (n=127). The number of *L. columella* collected in 2014 (n=267) was greater than that by the year 2013 (n= 84), when the total annual rainfall was 1.7 times higher. During the study, *Biomphalaria* spp. and *Melanoides* spp. presented fewer specimens collected in the dry season, while *Physa* spp., occurred throughout the whole study period, with variable monthly distribution between the dry and rainy seasons in the two years of collecting. *Pomacea* spp., obtained the highest number of months during the rainy season of 2013 and 2014. There were not developmental stages of *F. hepatica* in specimens of *L. columella* collected. The dynamic of *F. hepatica* infection in *L. columella* was also assessed by histology and circulating mollusc haemocytes counts. Miracidia were observed in head-foot and mantle tissues at 30 minutes post-infection. Miracidia/sporocysts in the mantle tissues 1° dpi, and fully formed sporocysts were observed in the head-foot at 7° dpi. Rediae became evident between 10° dpi and 14° dpi located between the head-foot and haemocoel. Between 45° e 50° dpi, the rediae in the digestive gland contained cercariae. The statistical analysis of the total haemocytes of *L. columella* infected by *F. hepatica* showed significant differences on the 30 minutes post-infection (p<0.05) and 1° dpi (p<0.05), 14° dpi (p<0.001), 21° dpi (p<0.05), 28° dpi (p<0.01) and 45° dpi (p<0.001) in comparison to uninfected molluscs (0 dpi). Therefore, the interference observed on the internal defence system of *L. columella* may have direct association with the development of *F. hepatica*.

Keywords: *Lymnaea columella*, seasonality, haemocytes, *Fasciola hepatica*, intramolluscal development.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Área de estudo. Localização do município de Confins - MG (seta vermelha), próximo à APA Carste de Lagoa Santa, Minas Gerais (CPRM, 1998). ..... **43**
- FIGURA 2.** Área de estudo. Bebedouro natural (linha vermelha), ribeirão da Mata (seta azul) e sede da fazenda (seta laranja), município de Confins-MG. Barra de escala=500 m. Fonte: Google Earth, 23/07/2015. .... **45**
- FIGURA 3.** Área de estudo. Em A e B vista do bebedouro natural onde foram realizadas as coletas. Em C parcela de 1 m<sup>2</sup> e em D espécime de *Lymnaea* spp. (seta amarela). ..... **46**
- FIGURA 4.** Histologia da região cefalopodal de *Lymnaea columella* não infectada. Observar tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), fibras musculares (fm), fibras colágenas (fc), espaços da hemolinfa (eh), hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm. .... **63**
- FIGURA 5.** Histologia do manto de *Lymnaea columella* não infectada. Observar tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), fibras musculares (fm) e colágenas (fc), espaços da hemolinfa (eh), hemócitos (he), células epiteliais (ce) e fibroblastos (fb). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm. .... **63**
- FIGURA 6.** Histologia da região da glândula digestiva *Lymnaea columella* não infectada. Observar lóbulos glandulares (Lb) e lúmen (lu), intestino (IN), hemocele (HC), manto (MT) tecidos epitelial (Te) e conjuntivo, hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm. .... **64**
- FIGURA 7.** Histologia da região da glândula digestiva *Lymnaea columella* não infectada. Observar hemocele (HC), tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), lúmen (lu) dos lóbulos glandulares (Lb), células com vacúolos (cv), hemócitos (he) na hemocele (HE) e fibroblastos (fb). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm. .... **64**
- FIGURA 8.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Miracídio (M) de *F. hepatica* com placas ciliares (\*) no manto 30 minutos após infecção no tecido conjuntivo (Tc). Observar lacuna (la) e hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm. .... **65**

**FIGURA 9.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Miracídios (M) com placas ciliares (\*) vesículas (v) na região cefalopodal no 1° dpi. Observar tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), lacunas (la), lesão (ls), e hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm..... **65**

**FIGURA 10.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Esporocisto (E) no 2° dpi com células translúcidas (ct) na hemocele (HC). Tecido conjuntivo (Tc), hemocele (HC) e hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm. .... **66**

**FIGURA 11.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Esporocistos (E) no 3° dpi com células translúcidas (ct) na região cefalopodal no tecido conjuntivo (Tc), espaços da hemolinfa (eh) e hemócitos (he): Coloração HE. Barra de escala = 50 µm..... **66**

**FIGURA 12.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Esporocisto (E) no 7° dpi na região da rádula (RD) próximo a fibras musculares (fm). Coloração HE. Barra de escala = 10 µm. .... **67**

**FIGURA 13.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 10° dpi em lacuna (la) na região cefalopodal, tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), espaços da hemolinfa (eh), hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm. .... **67**

**FIGURA 14.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédias (R) no 14° dpi na hemocele (HC), tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), espaços da hemolinfa (eh), hemócitos (he), hemolinfa (hf), rádula (RD), suportes da rádula (SR), esôfago (ES), fibras musculares (fm). Coloração HE. Barra de escala = 100 µm..... **68**

**FIGURA 15.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 14° dpi na hemocele (HC) apresentando faringe (fa), tegumento (te), ceco (cc), células germinativas (cg), tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), espaços da hemolinfa (eh), lesão (le), hemócitos (he) e hemolinfa (hf). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm. .... **68**

**FIGURA 16.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 21° dpi com faringe (fa) na hemocele (HC), hemócitos (he), hemolinfa (hf) e intestino (IN). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm.  
..... **69**

**FIGURA 17.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 28<sup>o</sup> dpi com faringe (fa) em lacuna (la) do manto (MT) entre o colar do manto (CM) e hemocele (HC), tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm. .... **69**

**FIGURA 18.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 35<sup>o</sup> dpi apresentando faringe (fa), ceco (cc) e tegumento (Te), no tecido conjuntivo (Tc), próximo ao esôfago (ES). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm. .... **70**

**FIGURA 19.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) ao 42<sup>o</sup> dpi em lacuna (la) no colar do manto (CM), próxima ao manto (M), apresentando faringe (fa), ceco (cc) e células germinativas (cg). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm. .... **70**

**FIGURA 20.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédias (R) e cercárias (C) com glândulas cistogênicas (cgp) no 55<sup>o</sup> dpi, na região da glândula digestiva (GD), observar lóbulos (lb) e lúmen (lu). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm. .... **71**

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Variação mensal das populações de gastrópodes coletados em 3 m<sup>2</sup> de bebedouros naturais de bovinos, em lagoa marginal do ribeirão da Mata, Confins-MG, entre janeiro/2013 a dezembro/2014..... **56**

**TABELA 2.** Coeficientes de correlação observados na comparação entre as variações de populações das diferentes espécies de gastrópodes coletados em bebedouros naturais de bovinos, em lagoa marginal do ribeirão da Mata, Confins-MG, entre janeiro/2013 a dezembro/2014..... **57**

**TABELA 3.** Perfil do número e desvio padrão médio de hemócitos circulantes totais e mortos na hemolinfa de *Lymnaea columella*, dos grupos não infectado e infectado por *Fasciola hepatica*..... **72**

## LISTA DE GRÁFICOS

**GRÁFICO 1.** Variação da temperatura média (°C) e da precipitação pluvial (mm) de janeiro/2013 a dezembro/ 2014 do município de Confins - MG. .... **53**

**GRÁFICO 2.** Variação do número de *Lymnaea columella* coletados mensalmente e da precipitação pluvial (mm) entre dezembro/2013 e janeiro/2014 em Confins-MG. .... **58**

**GRÁFICO 3.** Variação do tamanho médio das conchas de *Lymnaea columella* coletados mensalmente entre dezembro/2013 a janeiro/2014 em Confins - MG. .... **58**

**GRÁFICO 4.** Contagem do número médio de hemócitos totais e mortos (não viáveis) de *Lymnaea columella* infectada por *F. hepatica*. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , representam diferenças estatísticas do número de hemócitos do grupo infectado em relação ao grupo não-infectado. .... **73**

**GRÁFICO 5.** Comparação das curvas de sobrevivência de *L. columella* infectada por *F. hepatica*. O valor de  $p < 0.002$  representa as diferenças estatísticas observadas entre as curvas de sobrevivência dos moluscos infectados e não infectados no período de 7 semanas após a infecção. .... **74**

## LISTA DE ABREVIATURAS

AT = azul de tripan

APA = Área de Proteção Ambiental

CBSS = Chernin's balanced salt solution

dpi = dia(s) após infecção

ES = produtos de excreção e secreção do parasito

FBG = "*fibrinogen bearing proteins*"

HE = Hematoxilina-eosina

LabHelVet = Laboratório de Helmintologia Veterinária

MG = Estado de Minas Gerais

spi = semana após infecção

0 = grupo não infectado

30' = trinta minutos após infecção

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	22
2.1 A dispersão de <i>F. hepatica</i> .....	22
2.2 Ocorrência do ciclo natural de <i>F. hepatica</i> em limneídeos na América Latina.....	26
2.2.1 Ocorrência de <i>F. hepatica</i> em limneídeos no Brasil .....	29
2.3 Biologia de trematódeos em limneídeos.....	31
3. JUSTIFICATIVA.....	39
4. OBJETIVOS.....	41
4.1 Objetivo geral .....	41
4.2 Objetivos específicos.....	41
5. METODOLOGIA .....	42
5.1 Área de estudo .....	42
5.1.2 Dados climatológicos .....	43
5.1.3 Coleta de moluscos.....	44
5.1.4 Identificação dos moluscos e de estágios evolutivos de <i>F. hepatica</i> em <i>Lymnaea</i> spp. coletados em campo.....	46
5.1.5 Criação de <i>Lymnaea</i> spp. ....	47
5.2 Avaliação da suscetibilidade de <i>Lymnaea</i> spp. frente a <i>F. hepatica</i> ...	48
5.2.1 Obtenção de ovos e miracídios .....	48
5.2.2 Infecção experimental de <i>Lymnaea</i> spp. por <i>F. hepatica</i> .....	49
5.2.3 Histologia de <i>Lymnaea</i> spp. ....	49
5.2.4 Variações na população de hemócitos circulantes de <i>Lymnaea</i> spp. ....	50
5.2.4.1 Coleta de hemolinfa e quantificação de hemócitos de <i>Lymnaea</i> spp. infectado por <i>F. hepatica</i> .....	50
5.2.4.2 Curva de sobrevivência de <i>Lymnaea</i> spp. infectado por <i>F. hepatica</i> .....	51
5.3 Análise estatística .....	52
6. RESULTADOS.....	53
6.1 Variação nas médias mensais de temperatura e precipitação pluvial. 53	
6.1.2 Identificação dos moluscos e de estágios evolutivos de <i>F. hepatica</i> em <i>Lymnaea</i> spp. coletados em campo.....	54
6.1.3 Variação na população de gastrópodes coletados .....	54
6.1.4 Comparação de populações de gastrópodes .....	57
6.1.5 Variação das populações de <i>L. columella</i> .....	57

<b>6.2 Histologia de <i>L. columella</i> durante o desenvolvimento de <i>F. hepatica</i></b>	<b>59</b>
<b>6.3 Hemócitos circulantes de <i>L. columella</i></b>	<b>71</b>
<b>6.3.1 Contagem total e viabilidade dos hemócitos</b>	<b>71</b>
<b>6.4 Curva de sobrevivência de <i>L. columella</i> infectada por <i>F. hepatica</i></b>	<b>73</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>7.1. Variação da população de <i>L. columella</i> em Confins - MG</b>	<b>75</b>
<b>7.2 Histologia de <i>L. columella</i> durante o desenvolvimento de <i>F. hepatica</i></b>	<b>77</b>
<b>7.3 Hemócitos circulantes de <i>L. columella</i></b>	<b>82</b>
<b>7.4 Curva de sobrevivência de <i>L. columella</i> infectada por <i>F. hepatica</i></b>	<b>88</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) é um trematódeo digenético da família Fasciolidae que parasita os ductos biliares e hepáticos de diferentes espécies de mamíferos como ovinos, bovinos, lagomorfos, equinos, suínos, roedores e primatas, incluindo o ser humano. A importância do parasitismo por *F. hepatica* na medicina veterinária é observada pela morte de animais, redução da produção de leite, carne, lã, condenação de fígados, redução da fertilidade e custos com o tratamento (Cordova *et al.*, 1997; Dorny *et al.*, 2009; Knubben-Schweizer & Torgerson, 2015).

A distribuição geográfica de *F. hepatica* abrange a Europa, África, Ásia, Oceania e Américas, ocorrendo principalmente em áreas temperadas e subtropicais. A maior área enzoótica de *F. hepatica* no Brasil está situada na região Sul, casos humanos e em animais domésticos são relatados em todas as regiões do país, e aumento destes para a região Sudeste onde o parasito encontra-se em expansão (Pile *et al.*, 2000, Lima *et al.*, 2009).

Para que ocorra o ciclo biológico de *F. hepatica* são necessárias condições climáticas e hidrográficas propícias, a presença de mamíferos hospedeiros definitivos e de moluscos do gênero *Lymnaea* hospedeiros intermediários. Esses moluscos colonizam habitats como remansos de rios, áreas pantanosas, margens de coleções hídricas, macrófitas aquáticas e semi-aquáticas, lama e matéria orgânica de origem vegetal em decomposição (Boray, 1969; Paraense, 1983; Rondelaud *et al.*, 2011).

O ciclo biológico de *F. hepatica* é heteroxênico tendo como hospedeiro intermediário diferentes espécies do gênero *Lymnaea*. Os parasitos adultos fazem a postura nos ductos biliares, e os ovos são eliminados para o meio exterior com as fezes. Em coleções de água, desenvolve-se dentro do ovo uma larva ciliada denominada miracídio. Esse eclodirá após 8-14 dias em condições favoráveis de luz, temperatura e se deslocará através de movimentos ciliares até encontrar *Lymnaea* spp.. A infecção de *Lymnaea* spp. ocorre a partir da adesão dos miracídios nos tecidos da região cefalopodal do hospedeiro intermediário por meio do *terebratorium*. O miracídio, após adesão elimina conteúdo enzimático das glândulas de adesão, penetra ativamente atingindo os tecidos internos do molusco. Em seguida perde as placas ciliares transformando-se em esporocisto, que é um aglomerado de células germinativas de intensa atividade mitótica, observado até aproximadamente ao 7° dpi (dia após infecção). A partir de então é iniciada a formação de rédias no interior do esporocisto, e cerca de três semanas ocorre seu rompimento e a liberação das rédias de primeira geração. As rédias iniciam a ingestão dos tecidos do hospedeiro intermediário, preferencialmente da glândula digestiva e do aparelho reprodutor. Pode ocorrer uma 2ª geração de rédias. Por volta da 7ª semana as cercárias são eliminadas do molusco atingindo o meio externo movimentando ativamente com auxílio da cauda nas coleções de água, aderem-se na vegetação, perdem a cauda e liberam o conteúdo das glândulas cistogênicas, formando as metacercárias, que são as formas infectantes do hospedeiro vertebrado (Kendall, 1965; Saint-Guillain, 1968).

Os hospedeiros vertebrados se infectam ao ingerirem a metacercária, que sob ação dos sucos gástricos desencistam, atravessam a parede do

intestino delgado migram pela cavidade peritoneal até alcançar o fígado. Essas formas jovens continuam migrando pelo parênquima hepático alimentando-se de sangue e tecido por um período de 30-40 dias quando atingem os ductos biliares e alcançam a maturidade. A patogenia de *F. hepatica* no hospedeiro vertebrado está associada a fatores como a carga parasitária, estado nutricional e imunológico e a espécie do hospedeiro definitivo (Molina-Hernández *et al.*, 2015). A fase aguda da doença no hospedeiro vertebrado caracteriza-se por uma hepatite traumática causada pela migração do parasito jovem no parênquima hepático, enquanto que na fase crônica ocorrem lesões nos ductos biliares provocadas pelo parasito adulto, causando fibrose hepática, hipoalbuminemia e hiboglobulinemia (Acha & Szifres, 1977). A presença de *F. hepatica* no fígado pode favorecer o surgimento da infecção bacteriana secundária causada por *Clostridium novyi*, conhecida como “black-disease”, que geralmente é fatal para ovinos e bovinos (Boray & Murray, 1999).

A dispersão e o estabelecimento de *F. hepatica* no Brasil e em outros países do mundo depende da presença de limneídeos. No Brasil a ocorrência do parasito está associada à dispersão de *Lymnaea columella* (Say, 1817), *Lymnaea viatrix* (Orbigny, 1835) e *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839), sendo que *L. columella* apresenta maior distribuição geográfica, ocorrendo nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte do país (Mattos *et al.*, 1997). Os autores Medeiros *et al.* (2014) assinalaram a presença de *Lymnaea truncatula* nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, e *L. viatrix* foi considerada a de maior importância epidemiológica na região Sul. Paraense (1982) descreveu *Lymnaea rupestris* no Estado de Santa Catarina, porém até o presente

momento, não existem registros da espécie naturalmente infectada por *F. hepatica*.

A espécie *Lymnaea truncatula* é de importância epidemiológica para a dispersão de *F. hepatica* no mundo, com registros de moluscos naturalmente infectados na Europa, Américas, África, Oriente Médio, Ásia, e Oceania (Mas-Coma *et al.*, 2009).

A utilização da água para atividades agropecuárias como canalização e drenagem de áreas de pastagens em regiões alagadas, o manejo dos rebanhos, a alta densidade de animais por área de pastagens contribuem para disseminação de *F. hepatica* e de seus hospedeiros intermediários (Boray & Murray, 1999; Mas-Coma *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos abordando a influência da sazonalidade de populações de *L. columella* em campo têm demonstrado que variações pluviais e de temperatura entre as estações seca e chuvosa no Brasil não impedem a reprodução dos moluscos, permitindo a manutenção do ciclo biológico de *F. hepatica* no ambiente (Amato *et al.*, 1986; Maure *et al.*, 1998; Coelho & Lima, 2003).

A associação entre *Lymnaea* spp. e macrófitas aquáticas e semi-aquáticas (*Brachiaria* spp., *Juncus* spp., *Heteranthera* spp., *Typha* spp., *Salvinia* spp.) deve ser considerada em levantamentos epidemiológicos de *F. hepatica*, pois são bioindicadoras da presença do molusco hospedeiro intermediário e de metacercárias do parasito, que podem ser ingeridas pelo rebanho durante o pastejo (Lima *et al.*, 2009; Rondelaud *et al.*, 2011; Giraldo & Álvarez, 2013).

A região geográfica de *Lymnaea* spp., de *F. hepatica* e a espécie dos hospedeiros vertebrados, bem como o número de miracídios que infectam os

moluscos, são fatores que também podem influenciar no parasitismo (Gutierrez *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2014; Ueta 1980a; Lee & Lee, 1995).

Trabalhos sobre a interação entre *F. hepatica* e *Lymnaea* spp. mostram que o parasitismo influencia a reprodução, a sobrevivência, o crescimento dos moluscos e o desenvolvimento das formas larvais do parasito (Hodasi, 1972b; Dreyfuss *et al.*, 1999).

A especificidade entre *F. hepatica* e limneídeos está relacionada à susceptibilidade, ao reconhecimento do parasito pelo sistema interno de defesa do molusco, que é realizado pelos hemócitos e fatores solúveis presentes na hemolinfa, que são semelhantes em interações de outras espécies de trematódeos com gastrópodos (Lockyer *et al.*, 2004; Adema & Locker, 2015).

Desde o final do século XX a imunobiologia da interação entre trematódeos digenéticos e gastrópodos vêm sendo estudada e a caracterização do sistema interno de defesa tem sido realizada em modelos como *Biomphalaria* X *Schistosoma*, *Biomphalaria* X *Echinostoma*, *Lymnaea* X *Trichobilharzia* (Loker & Bayne 1982; Mounkassa & Jourdane, 1990; Amen *et al.*, 1991; Sapp & Loker 2000a, 2000b; Martins-Souza *et al.*, 2009; Yoshino *et al.*, 2013).

Os autores Gourbal *et al.* (2008) relataram a importância da realização de estudos imunobiológicos sobre *Lymnaea* X *F. hepatica*, que são escassos na literatura e merecem atenção, devido à grande relevância epidemiológica do parasito que infecta diferentes espécies de *Lymnaea* spp., facilitando seu estabelecimento e dispersão geográfica, além de possuir semelhanças à outros trematódeos como *Schistosoma mansoni* e *Echinostoma caproni* quanto aos

mecanismos moleculares utilizados para evasão do sistema interno de defesa do molusco hospedeiro intermediário, que possivelmente podem atuar no parasitismo de *F. hepatica* no hospedeiro vertebrado.

O gastrópode *L. columella* é o principal hospedeiro intermediário de *F. hepatica* no sudeste brasileiro, sendo encontrados naturalmente infectados em Minas Gerais (MG) aonde os relatos de caso de infecção do rebanho vêm aumentando.

O conhecimento da interação com *Lymnaea* spp. faz-se necessário, pois, é crescente a ocorrência de relatos de infecção, podendo agravar as perdas econômicas na pecuária, além de intensificar problemas na saúde.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A dispersão de *F. hepatica*

A dispersão de *F. hepatica* pode ser explicada pela transumância de animais domésticos, principalmente de caprinos, ovinos e bovinos, e a introdução de moluscos limneídeos de diferentes regiões geográficas, principalmente no período das grandes navegações, favorecendo o estabelecimento do ciclo biológico do parasito na África, Américas, Ásia e Oceania em regiões que apresentavam características favoráveis de temperatura, disponibilidade de água-doce e possibilidade de associações fitossociológicas e faunísticas (Honer, 1979; Mas-Coma *et al.*, 2009).

A introdução de *F. hepatica* nas Américas decorreu da colonização humana e da capacidade do parasito infectar os limneídeos *Galba* spp., *Fossaria* spp. e *Lymnaea* spp., ocorrendo o desenvolvimento intramolusco completo (Malek, 1985; Bargues *et al.*, 2007).

No Brasil *F. hepatica* tem sido registrada em bovinos e ovinos em várias Unidades Federativas: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Goiás, e Minas Gerais (Girão & Ueno, 1985a; Amato *et al.*, 1986; Serra-Freire *et al.*, 1992; Araújo *et al.*, 1995; Pile *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2002; Tostes *et al.*, 2004; Bellato *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009; Bernardo *et al.*, 2011). A maior área enzoótica de *F. hepatica* no país está localizada na região sul, havendo focos menores de ocorrência do parasito nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (Cunha *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009; Dracz & Lima 2014). Estudos epidemiológicos de *F. hepatica* no Brasil são baseados principalmente em levantamentos realizados

em abatedouros, frigoríficos e por meio de exames coprológicos do hospedeiro vertebrado (Honer *et al.*, 1979).

No Estado do Rio Grande do Sul, Pêcego (1925) encontrou prevalência média de 9,84% de bovinos positivos para *F. hepatica*. Rey (1957) relatou prevalências de 0,18 a 48,47% em bovinos, que variaram entre as regiões fisiográficas. Ueno *et al.* (1982) observaram em abatedouros porcentagens de fígados condenados por *F. hepatica* de 13% em bovinos e 7% em ovinos. De acordo com Mattos *et al.* (1997) o endemismo e a alta frequência anual de *F. hepatica* encontrado no rebanho dessa Unidade Federativa são favorecidos pela presença de *L. columella* e pela relevo topográfico plano que permite a formação de áreas alagáveis. Cunha *et al.* (2007) relataram entre os anos de 2000 a 2005, 8,87% de fígados de ovinos condenados por *F. hepatica* em matadouros e frigoríficos no Estado.

No Estado de Santa Catarina, após 12 anos de estudo, os autores Serra-Freire & Nuernberg (1992) observaram ovos de *F. hepatica* em fezes de bovinos (27,86%), bubalinos (24,72%), ovinos (16,92%) e caprinos (15,66%) e identificaram a região do Vale do Itajaí como endêmica. No município de Timbó, Bellato *et al.* (2009) relataram a presença de ovos de *F. hepatica* em 47,36% dos bovinos e em 25% de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) em 19 propriedades amostradas, incluindo o Centro Poliesportivo da cidade, mostrando a importância do roedor, que vêm se tornando espécie sinantrópica, podendo participar da disseminação de *F. hepatica*.

No Estado do Paraná Queiroz *et al.* (2002) constataram a ocorrência de *F. hepatica* em 10% do rebanho dos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do

Paraná, sendo que *L. columella* foram encontradas nas áreas estudadas, mas não albergavam o trematódeo.

No Estado de Goiás Araújo *et al.* (2007) encontraram em 959 bovinos abatidos e avaliados pelo Serviço de Inspeção Federal - SIF e pela Superintendência Federal de Agricultura - SFA prevalências de *F. hepatica* variando entre 0,95% no município de Mineiros a 20% nos municípios de Palmeiras e Trindade.

No Estado de São Paulo, França (1969) observou a condenação de 10,1% de fígados de 941 bovinos no matadouro municipal de Taubaté, Vale do Paraíba e Serra-Freire *et al.* (1995) examinaram fezes de 1.200 bovinos e prevalências de 6,7% para a mesma região, havendo maior número de animais positivos em Taubaté (17,3%) e Piquete (22,6%). Os autores Tostes *et al.* (2004) no município de Presidente Prudente, relataram 2,12% de perdas de fígados de bovinos entre os anos de 2001 a 2002 no Distrito de Montalvão, onde foi encontrado *Lymnaea* spp., indicando a possibilidade de estabelecimento de foco de *F. hepatica* na região.

No Estado do Rio de Janeiro, Silva (1936) constatou infecção por *F. hepatica* em 0,23% dos bovinos abatidos em matadouros. Pile *et al.* (2001) identificaram ovos de *F. hepatica* em 2,5% de 120 amostras de fezes de búfalos. Gomes *et al.* (2002) confirmaram o estabelecimento de foco da fasciolose causada por *F. hepatica* no município de Campos dos Goytacazes, relatando prevalências de aproximadamente 15,83% de bovinos parasitados pelo trematódeo, identificado por exames de fezes, sendo encontrado pelos autores 5,22% de 134 espécimes de *L. columella* infectados naturalmente pelo parasito.

No sul do Estado do Espírito Santo, no município de Atílio Vivácqua, Bernardo *et al.* (2011) obtiveram entre os anos de 2006 e 2009, prevalência de fígados condenados por *F. hepatica* de: 15,24% em 2006; 23,93% em 2007; 28,57% em 2008; e 28,24% em 2009 indicando o estabelecimento do parasitismo na região.

No Estado de Minas Gerais, Carvalho (1940) relatou a primeira ocorrência de *F. hepatica* em bovino da raça holandesa sem procedência definida, enviado ao município de Viçosa, pela Secretaria da Agricultura - MG. Até o ano de 1988 a literatura mostrou a presença de focos de *F. hepatica* apenas na região do vale do rio Paraíba, abrangendo os Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, na fronteira com MG, sendo desconhecida a existência de casos seguramente autóctones nesse último Estado (Dacal *et al.*, 1988). Os autores Caldas *et al.* (1995) obtiveram em torno de 1,5% de amostras positivas para *F. hepatica* examinadas a partir de 3.086 bovinos de seis mesorregiões de MG, sendo que a maior prevalência ocorreu no município de Itajubá (9,05%) e recentemente, Lima *et al.* (2009) observaram que 70% dos bovinos examinados na região de Itajubá apresentavam ovos de *F. hepatica* nas fezes e dos 135 *L. columella* coletados no município, 2,96% dos moluscos abrigavam formais larvais de *F. hepatica*. Esses autores constataram *F. hepatica* em bovinos de 16 dos 120 municípios de MG pesquisados, em um total de 1.251 amostras de fezes. Na região do vetor Norte do município de Belo Horizonte - MG, Dracz & Lima (2014) encontraram de um total de 250 amostras de fezes (176 de bovinos e 74 de bubalinos) provenientes dos municípios de São José da Lapa e Pedro Leopoldo, 54 animais positivos para *F. hepatica*, sendo 33 bovinos (18,75%) e 21 bubalinos (28,37%).

## 2.2 Ocorrência do ciclo natural de *F. hepatica* em limneídeos na América Latina

Paraense (1982) revisou a ocorrência de espécies de Lymnaeidae em países Neotropicais e relatou haver *Lymnaea* spp. no México, Cuba, Jamaica, Haiti, República Dominicana, Porto Rico, Martinica, Santa Lúcia, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Equador, Peru, Bolívia, Chile, Argentina, Uruguai e Brasil e, excepcionalmente no Equador ocorreu somente *Lymnaea cousini* (Jousseume, 1887) sendo que no Peru e Chile ocorreu *Lymanea viatrix* (Orbigny, 1835) e nos demais países, as espécies identificadas foram *L. viatrix* e *L. columella* (Say, 1817) que mostraram sobreposição populacional.

Os primeiros relatos da ocorrência de *L. viatrix* naturalmente infectados por *F. hepatica* na América do Sul foram de Bacigualupo (Nuernberg, 1983) nas proximidades da cidade de Buenos Aires, na Argentina e Tagle (1943) no Chile.

A fasciolose causada por *F. hepatica* no Chile é de importância veterinária e em saúde e sua transmissão é atribuída à *L. viatrix* (Alcaíno & Apt 1989). Recentemente, de Artigas *et al.* (2011) observaram, por meio de estudos filogenéticos moleculares de limneídeos do Chile, haverem 2 espécies autóctones desses moluscos *L. viatrix* e *Lymnaea diaphana* (King & Broderip, 1832), sendo que a espécie exótica nesse país é *Galba (Lymnaea) truncatula*.

Darrigan (1989) relatou a ocorrência de *F. hepatica* na Argentina, nas regiões Norte, Andina, Central, da Patagônia Atlântica e da província de Buenos Aires, e região de influência dos rios Paraná e da Plata, sendo *L. viatrix* o hospedeiro intermediário. Os autores Kleiman *et al.* (2007) acompanharam a população de *L. viatrix* entre os anos de 1998 e 2002 nos vales andinos da

Patagônia Argentina, onde ocorreram bovinos infectados por *F. hepatica* a prevalência de *F. hepatica* em *L. viatrix* variou de 0,9 a 14%, entre o verão e o outono. Já Prepelitchi *et al.* (2003) realizaram o primeiro relato de *L. columella* naturalmente infectado por *F. hepatica* na Argentina, encontrando o parasito em 8,8% dos 500 moluscos coletados em Berón de Astrada, região próxima ao norte do Paraguai, oeste do Brasil e sudeste do Uruguai. Esses autores observaram que a prevalência de *L. columella* infectado poderia ser favorecida pelo surgimento de novos ambientes propícios à dispersão do molusco, devido ao barramento do rio Paraná para a construção da usina hidrelétrica de Yacyretá.

Cruz-Mendonza *et al.* (2010) estudaram no México a dinâmica da infecção natural por *F. hepatica* de ovinos caprinos, bovinos e dos limneídeos *Fossaria humilis* e *F. bulimoides* entre os anos de 2004 e 2007, quando foram realizados exames de fezes no rebanho e foi observada a liberação espontânea de cercárias pelos moluscos. Os autores observaram que a administração de anti-helmínticos no rebanho reduzia o número de limneídeos naturalmente infectados que albergavam *F. hepatica* no ambiente.

Na Costa Rica, Brenes *et al.* (1968) encontraram 50% de 400 espécimes de *L. columella* infectados por *F. hepatica* em dois anos de amostragem realizada na região da província de Cartago, onde haviam matadouros com bovinos infectados pelo trematódeo. Os autores López *et al.* (2008) relataram em Rionegro a ocorrência de *Lymnaea truncatula* e de *L. columella* naturalmente infectados por *F. hepatica*.

Em Cuba Gutiérrez *et al.* (2011) fizeram o primeiro relato de *L. columella* naturalmente infectados por *F. hepatica* na região de El Pilon, onde bovinos e

caprinos frequentavam áreas alagadas destinadas ao cultivo de arroz. Os autores mencionaram que *L. columella* foi encontrada em ambientes rurais, enquanto que *Fossaria cubensis* ocorreu próximo a áreas urbanas e seria a espécie hospedeira intermediária de *F. hepatica* mais antiga do Caribe.

No Equador Angel-Villavicencio *et al.* (2005) relataram a importância de estudos sobre os hospedeiros intermediários de *F. hepatica* no país, que é endêmico para a fasciolose animal e humana. Esses autores fizeram o primeiro relato de *L. cousini* naturalmente infectados por *F. hepatica* na região da Província de Pichincha em fazenda com bovinos infectados pelo trematódeo, onde existiam solos encharcados de origem vulcânica, revestidos por pastagens e plantas aquáticas.

Na Colômbia as espécies *Lymnaea bogotensis* (Pilsbry, 1935) e *L. columella* são tidas como hospedeiras intermediárias do parasito no país (Salazar *et al.*, 2006).

Na região do Altiplano da Bolívia, Ueno *et al.* (1975) estudaram a epidemiologia de *F. hepatica* em ovinos e alpacas, onde as taxas de infecção pelo parasito impossibilitavam a criação de ovinos nas proximidades do lago Titicaca. Esses autores relataram a presença de *L. viatrix* e *L. cubensis* infectadas por *F. hepatica*. Tal região é considerada hiperendêmica da fasciolose e tem características biogeográficas favoráveis ao estabelecimento do parasito, como latitudes equatoriais para a manutenção da temperatura, disponibilidade de água da neve andina, desenvolvimento intramolusco de *F. hepatica* prolongado com eliminação de metacercárias no ambiente por todo o ano, e a presença de *L. truncatula* introduzido da Europa (Meunier *et al.*, 2001; Mas-Coma *et al.*, 2009).

Na Venezuela Pointier *et al.* (2004) fizeram o primeiro relato de *L. cousini* (Jousseume, 1887) em um lago permanente a 3.760 metros de altitude, onde foi também encontrado *L. truncatula*. Entre os anos de 2005 e 2009 os autores Pointier *et al.* (2009) observaram haver no país outra espécie exótica *L. columella*, além das espécies locais *L. cubensis* e *L. cousini* e reiteram a importância desses moluscos na disseminação de *F. hepatica*, pois apresentam ampla distribuição geográfica tanto em regiões montanhosas quanto próximas ao nível do mar.

Larrea *et al.* (2007) coletaram durante 10 anos os moluscos *L. columella*, *L. viatrix*, *L. diaphana* (King, 1830) e *L. cousini* (Jousseume, 1887) de diferentes localidades do Peru e encontraram *L. columella* e *L. viatrix* naturalmente infectados por *F. hepatica*. O molusco *L. viatrix* obteve o maior número de espécimes albergando o parasito. Experimentalmente os autores observaram que *L. diaphana* e *L. cousini* não se infectavam experimentalmente.

### **2.2.1 Ocorrência de *F. hepatica* em limneídeos no Brasil**

No Brasil, Lutz (1921) fez o primeiro relato de *F. hepatica* no Estado do Rio de Janeiro, onde encontrou espécimes de *L. cubensis* infectados no município de Três Rios. Nesse mesmo Estado, Gomes *et al.* (2002) relataram na microrregião de Campos dos Goytacazes, o estabelecimento de focos de fasciolose bovina causada por *F. hepatica*, comprovado por exames de fezes e foi encontrado *L. columella* naturalmente infectado pelo trematódeo.

No Estado de São Paulo, município de Piquete, região do Vale do rio Paraíba, Ueta (1980b) relatou prevalências de infecção natural de *L. columella*

para os anos 1977 e 1978 variando de 1,22% a 0,14% correspondentes a 327 e 725 moluscos amostrados por ano, e na mesma região, Amato *et al.* (1986) realizaram levantamento epidemiológico entre julho de 1980 e maio de 1983 e observaram que a população de *L. columella* decrescia ciclicamente entre setembro e janeiro, e aumentava entre março e setembro, sendo encontrado os maiores espécimes entre março e julho e entre novembro e dezembro, enquanto que os menores moluscos ocorreram entre janeiro e fevereiro e entre agosto e outubro, sugerindo haver duas gerações de *L. columella* por ano. As maiores prevalências de *L. columella* infectado foram: primeiro ano em junho 8,82%, setembro 9,09% e outubro 10,52%; no segundo ano março 6,25% e abril 6,89%; no terceiro ano em julho 7,69%, agosto 10,25%, no quarto ano em abril 17,91% e maio 13,91%. A maior disponibilidade de metacercárias ocorreu entre junho e outubro e entre março e abril, e os ovinos traceadores, utilizados para verificação de infecção por *F. hepatica*, mostraram-se infectados durante todo o período experimental. Na região do Vale do Ribeira, Oliveira *et al.* (2002) observaram nos municípios de Miracatu e Eldorado, *L. columella* infectados por *F. hepatica* com prevalências variando entre 5,26% e 1,06% nos meses de outubro de 1996 a fevereiro de 1997.

Segundo Maure *et al.*, (1998) estudos relacionados à variáveis climáticas têm demonstrado que no período de altas temperaturas ocorre o declínio populacional de limneídeos, concomitantemente ao aumento do volume das chuvas, indicando que as variações ambientais ao longo do ano influenciam na presença do hospedeiro intermediário e da disseminação da fasciolose.

Existem registros de *L. columella* nos Estados da Paraíba, Bahia e Amazonas (Abílio & Watanabe, 1998), havendo casos confirmados de infecção humana por *F. hepatica* nesse último Estado (Oliveira *et al.*, 2007).

Em Minas Gerais (MG), Silva *et al.* (1995) realizaram o primeiro registro de *L. columella* naturalmente infectadas por *F. hepatica* em várzeas do município de Itajubá. Na mesma localidade, Coelho & Lima (2003) relataram que de um total de 626 espécimes de *L. columella* coletado entre os anos de 1999 e 2000, ocorreram maiores prevalências do molusco infectado entre os meses de setembro de 1999 (5,2%) e julho de 2000 (3,9%). Dando continuidade aos trabalhos na região do município de Itajubá, Coelho (2007) estudou a dinâmica populacional de *L. columella* entre os anos de 2003 e 2006 e relatou uma prevalência média de moluscos positivos para *F. hepatica* de 1,7%, sendo que a maior prevalência (18,8%) ocorreu no mês de dezembro de 2004. Lima *et al.* (2009) encontraram ovos de *F. hepatica* nas fezes de bovinos em 16 dos 120 municípios pesquisados sendo que em Itajubá, área enzoótica de *F. hepatica*, 70% dos bovinos e 2,96% de espécimes de *L. columella*, amostrados na região do município estavam infectados.

### **2.3 Biologia de trematódeos em limneídeos**

A susceptibilidade de limneídeos à *F. hepatica* é variada. Gomes (1985) em *L. columella* observou que infecções com três miracídios proporcionavam maiores taxas de sobrevivência dos moluscos e de produção de metacercárias do que com cinco miracídios, e que a procedência dos ovos dos hospedeiros definitivos (bovino e ovino) não alterava a infecção. Por outro lado, Lee & Lee (1995) observaram em *L. viridis* que a produção de metacercárias em

espécimes infectados com três ou cinco miracídios de *F. hepatica* foi maior nos moluscos infectados somente com um miracídio.

A espécie do hospedeiro vertebrado que elimina ovos de *F. hepatica* pode alterar a biologia da infecção, como observado por Mendes *et al.* (2008) em infecções experimentais de *L. columella* pelo trematódeo. Os autores relataram um maior número de rédias e cercárias recuperadas entre 60° dpi e 74° dpi em moluscos infectados com miracídios eclodidos de ovos de bovinos (*Bos taurus*), se comparado ao grupo infectado com miracídios de ovos de fezes do sagüi (*Callithrix penicillata*). No experimento os moluscos infectados do grupo *C. penicillata* sobreviveram por mais tempo em relação ao grupo de *Bos taurus*.

Hodasi (1972b) realizou a infecção experimental de *L. truncatula* por *F. hepatica* e observou, por meio de necropsias dos moluscos, o desenvolvimento do parasito dos estádios de esporocisto a rédia. Após três semanas ocorreu migração das rédias para os tecidos hepatopâncreas e ovotestis, que foram progressivamente consumidos, enquanto as rédias desenvolviam. Foi observado pelo autor que a atividade reprodutiva dos moluscos cessava entre a 5ª e a 6ª semanas após infecção (spi), período em que houve abertura da boca e do tubo digestivo das rédias, iniciando a eliminação de cercárias por volta da 7ª spi.

Tepper (2000) investigou lesões nos tecidos através da histologia de *L. viatrix* infectado por *F. hepatica*, até às 72 horas após a infecção. A reação tissular realizada pelos hemócitos ocorreu nas primeiras 48 horas após a penetração dos miracídios e formação de esporocistos na região cefalopodal. A morte dos esporocistos ocorreu após 72 horas, devido ao sistema interno de

defesa do molusco, quando os hemócitos envolveram os esporocistos de *F. hepatica* formando cápsulas causando a morte do parasito.

Ao longo do desenvolvimento de *F. hepatica* em seus hospedeiros intermediários, ocorrem oscilações na biodisponibilidade de lipídios e carboidratos, como relatado por Humiczewska & Rajski (2005) que pesquisaram os efeitos de esporocistos, rédias e cercarias sobre conteúdo lipídico da glândula digestiva de *L. truncatula*. Foi observado que ao 20° dpi, o nível lipídico da glândula digestiva havia reduzido em cerca de 50%, e aos 40° e 60° dpi os lipídeos diminuíram em 80%, quando comparados ao grupo de *L. truncatula* não infectado por *F. hepatica*. Estes autores relataram que a mobilização de gorduras da glândula digestiva dos moluscos infectados, ocorreu para compensar a deficiência de carboidratos, que são intensamente consumidos por *F. hepatica* no início da infecção. Os autores observaram que os tecidos dos esporocistos, rédias e cercárias de *F. hepatica* apresentavam abundância de conteúdo lipídico e intensa atividade metabólica, sugerindo a utilização também de lipídeos como fonte energética para seu desenvolvimento no hospedeiro intermediário.

A compatibilidade entre *F. hepatica* e as linhagens de *L. columella* pode variar, como relatado por Gutiérrez *et al.* (2003) em *Pseudosuccinea* (= *Lymnaea*) *columella* proveniente de Cuba. Esses autores demonstraram que uma das linhagens utilizada em seus experimentos era 100% resistente à infecção por *F. hepatica*, mesmo com cargas parasitárias de até 20 miracídios, formando após 24 horas de infecção reação tissular de encapsulamento no entorno dos esporocistos.

Os gastrópodes, no controle das infecções, utilizam o sistema de defesa interno, constituído por hemócitos e fatores solúveis presentes na hemolinfa (Coustau *et al.*, 2015). Na interação entre gastrópodes e trematódeos, os hemócitos circulantes constituem a principal linha de defesa, podendo realizar reconhecimento, adesão, encapsulamento, fagocitose do tegumento sincicial, liberando componentes citotóxicos, promovendo a destruição da larva de trematódeos, e reparação de tecidos (Adema *et al.*, 1994a 1994b; Yoshino & Vasta 1996).

A heterogeneidade das populações de hemócitos circulantes em *B. glabrata* e *L. stagnalis* varia fenotípica e funcionalmente, quanto ao conteúdo enzimático hidrolítico, peptídios antimicrobianos e produção de lectinas solúveis (Sminia & Van Der Knaap, 1987).

Os autores Martins-Souza *et al.* (2009) observaram três tipos de hemócitos circulantes em *Biomphalaria* spp. por citometria de fluxo. Em *B. tenagophila* X Taim, que é linhagem mais resistente ao parasito, o perfil celular foi alterado pela infecção com o trematódeo, quando ocorreu o aumento das células de defesa de perfil de granulosidade média e baixa em relação às encontradas em *B. glabrata*-BH (altamente susceptível) e *B. tenagophila*-CF (moderadamente susceptível), sugerindo a participação dos hemócitos da linhagem mais resistente ao combate contra o trematódeo.

Pela heterogeneidade morfológica e bioquímica há dois tipos celulares de hemócitos circulantes em moluscos, os granulócitos e os hialinócitos (Cheng *et al.*, 2004).

Amen *et al.* (1992) não observaram heterogeneidade da população de hemócitos circulantes de *L. stagnalis* marcados com anticorpos monoclonais

(Ls-4) em análise por citometria de fluxo do molusco infectado por *T. ocellata*, em diferentes períodos de infecção.

Van der Knaap & Loker (1990) mostraram que a interação entre trematódeos e moluscos é complexa. Nesse processo lectinas participam do reconhecimento de larvas de trematódeos. Esses autores observaram que tais proteínas podem estar presentes na hemolinfa ou expressas na superfície dos hemócitos, possibilitando diferentes tipos de ligações entre o hemócito e o parasito, como: a ligação direta da lectina expressa na membrana do hemócito aos carboidratos do tegumento do parasito; a lectina atuar como uma ponte entre carboidratos da membrana do hemócito e carboidratos do tegumento do parasito; a lectina do tegumento do parasito liga-se aos carboidratos da membrana dos hemócitos.

Genes de lectinas do gastrópode *B. glabrata* têm sido isolados e sequenciados e o de "*FBG - fibrinogen bearing proteins*" também conhecido como *FREP-like*, mostra uma diversidade de transcritos e formas dessa molécula, incluindo na estrutura proteica a superfamília de imunoglobulinas (Ig-SF) no domínio terminal amina e FGB no terminal carboxil (Zhang *et al.*, 2001), sendo considerado molécula importante para o imunidade de moluscos.

Adema *et al.* (1997) observaram o aumento de até 3 x na expressão de *FREP-like* em hemócitos de *B. glabrata* infectados por *E. paraensei* após quatro dias de infecção pelo trematódeo. Semelhanças nas sequências de DNA que codificam essas proteínas em *L. stagnalis*, dentre outros gastrópodes, foram também observadas.

Plows *et al.* (2005) relataram que hemócitos de *L. stagnalis* reconheciam glicoconjugados presentes na camada sincicial de *Schistosoma*. No entanto,

não é completamente conhecida a participação dessa via na regulação da infecção em moluscos.

Knigh *et al.* (2014) relataram a respeito da capacidade de regulação gênica de *Schistosoma mansoni* sobre o DNA de *Biomphalaria glabrata*, para a manutenção do parasitismo, e ressaltaram a importância de avanços nos estudos moleculares para a compreensão da interação entre esses organismos.

Os autores Gordy *et al.* (2015) observaram a capacidade dos hemócitos circulantes de *B. glabrata* reconhecerem epítomos no tegumento de esporocistos de trematódeos por meio de FREPs. Segundo os autores esse processo poderia estimular a produção de hemócitos expressando subtipos de FREPs que, após liberados na hemolinfa, auxiliariam no processo de encapsulamento do parasito. Entretanto, os autores reforçaram a necessidade da condução de estudos futuros para compreensão das vias de sinalização envolvidas no processo.

Diversos estudos têm sido conduzidos com hemócitos circulantes de gastrópodes (Sminia, 1972; Van der Knaap, 1981). Estes tipos celulares circulantes variam entre os moluscos. Os autores Van Der Knaap *et al.* (1981) verificaram a presença de opsonina/aglutinina na superfície de amebócitos de *L. stagnalis*, sugerindo que a presença destas proteínas exercem função de receptores citofílicos no reconhecimento de material externo.

Os hemócitos à medida que se desenvolvem, aumenta gradativamente a adesão em lâminas de vidro, a capacidade de emissão de pseudópodes e de atividade fagocitária (Van Der Knaap *et al.*, 1993). De acordo com Monick *et*

al.(2000) esses processos envolvem vias de ativação intracelular como as proteínas quinases C (PKCs) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).

As PKCs constituem uma família de quinases serina/treonina que são presentes em tecidos animais e desempenham funções na regulação de diferentes processos celulares como a diferenciação, o crescimento celular, a secreção e a contração muscular (Kruse *et al.*, 1996).

Buscando compreender o sistema interno de defesa de *L. stagnalis*, Walker & Plows (2003) estimularam cultura de hemócitos de *L. stagnalis* com lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular de bactérias gram-negativas, e observaram ativação de vias de sinalização de PKCs.

Lacchini *et al.* (2006) relataram que após a ativação de PKCs, os hemócitos de *L. stagnalis* podem produzir espécies reativas intermediárias do oxigênio (ROIs), sugerindo que este mecanismo de sinalização celular atua na resposta imune de *L. stagnalis*, podendo participar no reconhecimento de patógenos.

Os hemócitos desempenham papel predominante na eliminação de patógenos, e um dos mecanismos de destruição de trematódeos é a produção de reativos intermediários do oxigênio (ROIs) e do nitrogênio (RNS). As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio possuem meia vida curta, mas, devido à velocidade de ação sobre o tegumento sincicial do parasito, são muito efetivas. Os ROIs são radicais livres que contêm átomos de oxigênio, sendo constantemente gerados quando os hemócitos circulantes entram em contato com trematódeos, especialmente o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que tem sido demonstrado como efetivo na destruição de esporocistos. Os hemócitos durante a fagocitose possuem a capacidade de sintetizar óxido nítrico (NO)

pela enzima NO-sintase que reage com o peróxido de hidrogênio formando o peroxinitrito que é um potente bactericida (Gourdon *et al.*, 2001).

Estudos da imunobiologia de *Lymnaea spp.* e *F. hepatica* são importantes, visto que a expansão dessa zoonose é crescente em todas as regiões brasileiras, e pouco se conhece da relação entre moluscos e esse helminto no país.

### 3. JUSTIFICATIVA

A fasciolose causada por *Fasciola hepatica* é uma zoonose, subnotificada, tanto na população humana quanto nos rebanhos e está em expansão por todas as regiões brasileiras. Os relatos de fasciolose na região Sudeste do Brasil são emergentes e mesmo que os dados de prevalência não sejam conhecidos, vale ressaltar que a fasciolose além de constituir um problema de saúde pública, causa prejuízos econômicos graves à pecuária mundial de bovinos e ovinos.

Apesar dos moluscos limneídeos serem essenciais para estabelecimento do parasito na natureza, estudos da interação intramolusco no modelo de *F. hepatica* são escassos. Compreender a relação desse trematódeo com hospedeiro intermediário é fundamental, visto que pouco se conhece da associação entre *Lymnaea* spp. X *F. hepatica*.

Em Minas Gerais, a fasciolose em rebanhos de bovinos já foi relatada em 18 municípios, sendo que na mesorregião Sul, principal área enzoótica, *L. columella* foi diagnosticado com rédias e metacercárias do parasito. Casos autóctones de bovinos e bubalinos foram registrados recentemente na mesoregião metropolitana de Belo Horizonte, nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa (Dracz & Lima, 2014), e em capivaras no município de Confins (Dracz *et al.*, 2015 *in press*), o que reforça a necessidade de compreender a dispersão do parasito e dos fatores associados a sua ocorrência na bacia hidrográfica do rio das Velhas, uma vez que nesse local há captação de água potável para abastecimento da população humana e criação de rebanhos.

O município de Confins está inserido na bacia hidrográfica do rio das Velhas e no presente estudo buscou-se analisar a influência da sazonalidade com a presença do gastrópode em campo, e o curso da infecção por *F. hepatica* em *Lymnaea columella* proveniente da localidade.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Acompanhar a variação sazonal e a cinética da infecção por *F. hepatica* em *Lymnaea* spp. do município de Confins - MG.

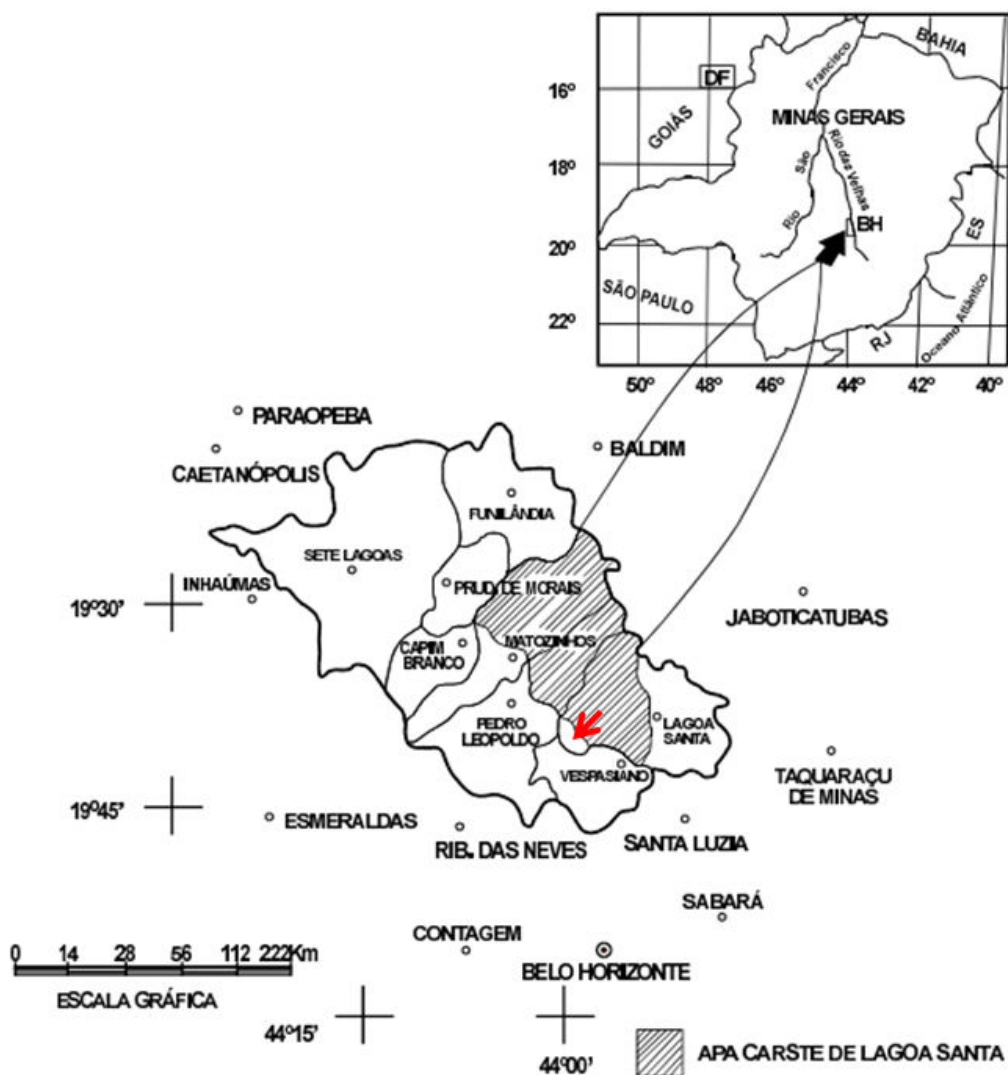
### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar a espécie de *Lymnaea* spp. que ocorre no município de Confins - MG;
- Acompanhar a variação sazonal da população de *Lymnaea* spp. no município de Confins - MG em campo;
- Avaliar a ocorrência de infecção natural de *Lymnaea* spp. por *F. hepatica* no município de Confins - MG;
- Manter a criação e avaliar a susceptibilidade de *Lymnaea* spp. do município de Confins - MG em condições de laboratório;
- Acompanhar a cinética dos estágios evolutivos de *F. hepatica* utilizando cortes histológicos;
- Padronizar coleta de hemócitos circulantes de *Lymnaea* spp. infectado experimentalmente por *F. hepatica*;
- Avaliar a cinética do desenvolvimento de *F. hepatica* em *Lymnaea* spp. infectado experimentalmente por meio da contagem total de hemócitos circulantes.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Área de estudo

A área de estudo situada nas coordenadas geográficas (19°40'17.65" S; 43°57'53.13" O) está inserida no município de Confins, fazendo limite com a Área de Proteção Ambiental (APA) - Carste de Lagoa Santa, localizada na Microrregião de Belo Horizonte - Minas Gerais. A região de estudo está inserida no alto da bacia hidrográfica do rio das Velhas (FIG. 1). A vegetação predominante é de campo de pastagem e feições fitogeográficas de Mata Atlântica e do Cerrado (Meyer *et al.*, 2010). O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo tropical de altitude com inverno seco (maio - agosto) e verão chuvoso (setembro - abril). Os meses de junho, julho e agosto são os meses com menor índice de precipitação pluvial. Novembro, dezembro e janeiro são os mais chuvosos (Pinheiro & Baptista, 1998; Mello & Silva, 2009).



**FIGURA 1.** Área de estudo. Localização do município de Confins - MG (seta vermelha), próximo à APA Carste de Lagoa Santa, Minas Gerais (CPRM, 1998).

### 5.1.2 Dados climatológicos

Os valores mensais de precipitação pluvial e das médias das temperaturas, foram obtidos na Estação Meteorológica de Belo Horizonte - Pampulha do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (<http://www.inmet.gov.br>) distantes de 22 km da área de estudo experimental.

### 5.1.3 Coleta de moluscos

A coleta dos moluscos foi realizada às margens de lagoa marginal do ribeirão da Mata (FIG. 2), bacia hidrográfica do rio das Velhas, o qual participa do abastecimento de água da região norte da Região Metropolitana de Belo Horizonte, e ocorre intensa atividade de extração de argila, areia e cascalho desde 1940 (Meyer *et al.*, 2010). A pastagem em volta da lagoa é formada por *Brachiaria brizantha*. No interior da lagoa encontram-se macrófitas aquáticas taboa (*Typha* spp.), água-pé (*Eichornia* spp.) e salvínia (*Salvinia* spp.).

Os moluscos foram coletados mensalmente em três bebedouros naturais do rebanho de bovinos onde existiam ciradouros de *Lymnaea* spp. às margens da lagoa (FIG. 2), que foram selecionados previamente pela existência de espécimes e da postura de desovas. As coletas foram realizadas mensalmente, no período da manhã, entre 8:00 e 11:00 horas, utilizando-se o método dos “quadrats” (Amato *et al.*, 1986; Gaasenbék *et al.*, 1992; Coelho, 2007). Em cada bebedouro foi demarcado aleatoriamente 1m<sup>2</sup>, utilizando um quadro constituído com ripas de madeira de 1m x 1m. Esse quadro era colocado perpendicularmente às margens da lagoa com 50 cm dentro d’água e 50 cm fora d’água. Nesse quadrado realizou-se a coleta de moluscos hospedeiros com várias conchadas, utilizando peneiras com 20,5 cm de diâmetro e malha de aço com capacidade de reter partículas de 1 mm. A vegetação também foi removida para identificação e coleta de moluscos (Souza & Lima, 1997; Coelho, 2007).

Os moluscos coletados foram acondicionados em recipientes plásticos contendo água da lagoa e levados ao Laboratório de Helmintologia Veterinária do Departamento de Parasitologia-Instituto de Ciências Biológicas-

Universidade Federal de Minas Gerais (LabHelVet) para identificação, quantificação e biometria, juntamente com amostras de vegetais que foram identificadas e examinadas em microscópio estereoscópico no aumento de 40X para verificar a presença de metacercárias.



**FIGURA 2.** Área de estudo. Bebedouro natural (linha vermelha), ribeirão da Mata (seta azul) e sede da fazenda (seta laranja), município de Confins-MG. Barra de escala=500 m. Fonte: Google Earth, 23/07/2015.



**FIGURA 3.** Área de estudo. Em A e B vista do bebedouro natural onde foram realizadas as coletas. Em C parcela de 1 m<sup>2</sup> e em D espécime de *Lymnaea* spp. (seta amarela).

#### **5.1.4 Identificação dos moluscos e de estágios evolutivos de *F. hepatica* em *Lymnaea* spp. coletados em campo**

Para identificação específica 15 espécimes de *Lymnaea* spp. coletados durante o período experimental foram acondicionados em sacos plásticos com água da lagoa e encaminhados ao Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ-MG para identificação de acordo com Paraense (1983). Foram observados os parâmetros morfológicos de formato da concha, do túbulo renal, do aparelho genital e da rádula. Os demais gastrópodes foram identificados ao nível genérico no LabHelVet-ICB/UFMG, assim como a vegetação coletada na região do estudo.

Os espécimes de *Lymnaea* spp. coletados foram mantidos em cubas plásticas forradas com filme plástico contendo água isenta de cloro, fragmentos de alface durante 15 dias. Diariamente, os recipientes ficavam expostos a um

foco de luz de 60 watts numa distância de 40 cm, durante 4 horas, para verificação da eliminação de cercárias de *F. hepatica*. Após esse período o filme plástico e o conteúdo aquoso foram analisados em microscópio estereoscópico no aumento de 40X para pesquisa de cercárias e metacercarias.

Diariamente, os moluscos mortos foram removidos do recipiente, e as partes moles foram retiradas das conchas com auxílio de uma pinça, seguido de dissecação com estiletos ao microscópio estereoscópico para verificação da presença de formas evolutivas de *F. hepatica*.

#### **5.1.5 Criação de *Lymnaea* spp.**

Após 15 dias espécimes de *Lymnaea* spp. eram transferidos para cubas de criação para obtenção de desovas destinadas aos experimentos posteriores. Esses moluscos foram mantidos em temperatura ambiente média de 24 °C em cubas plásticas de 25x30x20 cm contendo 1,5 L de água isenta de cloro e 03 fragmentos de isopor de 4 cm<sup>2</sup> para realização das desovas. Os moluscos foram alimentados com folhas de alface. As cubas foram cobertas com telas de malha de 3 mm presas com elástico e o fundo foi limpo por sucção com pipeta Pasteur. A água era trocada uma vez por semana, período em que era adicionado cerca de 200mg de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). Quando os moluscos atingiram o tamanho, a partir de 4 mm, eram utilizados nos protocolos de infecção descritos a seguir.

## **5.2 Avaliação da suscetibilidade de *Lymnaea* spp. frente a *F. hepatica***

### **5.2.1 Obtenção de ovos e miracídios**

Ovos utilizados para obtenção de miracídios foram coletados em amostras de fezes de bovinos naturalmente infectados por *F. hepatica* em propriedades rurais da região de estudo. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, acondicionadas em sacos plásticos, em seguida transportadas em caixas de isopor até o LabHelVet-ICB/UFMG, onde foi realizado exame coprológico utilizando a técnica de 4 tamises descrita por Girão & Ueno (1985b).

Amostras de fezes foram colocadas em béquer, diluídas em água e homogeneizadas com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, a mistura foi passada em um conjunto de quatro tamises sobrepostos na sequência de ordem 100, 180, 200 e 250 malhas/polegadas, com aberturas de 174, 96, 87 e 65 µm, respectivamente. Os três primeiros tamises retêm detritos alimentares. Os ovos de *F. hepatica* são armazenados no último tamis (250 malhas/polegada), quando foram recolhidos em um copo plástico, utilizando um jato de água no sentido oposto ao da lavagem.

Nos copos plásticos esse conteúdo foi decantado e o sedimento transferido para placa de Petri, os ovos foram coletados em microscópio estereoscópico no aumento de 20 X com auxílio de uma pipeta de Pasteur e alocados em uma placa de Petri contendo água isenta de cloro e incubados em estufa a 27 °C. Após o 8º dia as placas foram examinadas diariamente em microscópio estereoscópico, para acompanhar o desenvolvimento dos miracídios no interior dos ovos. Quando estes estavam completamente

formados, as placas foram colocadas sob foco de luz de 60 watts a uma distância de 50 cm para induzir a eclosão dos miracídios utilizados no protocolo abaixo.

### **5.2.2 Infecção experimental de *Lymnaea spp.* por *F. hepatica***

Os moluscos utilizados para as infecções experimentais foram provenientes de desovas obtidas de *Lymnaea spp.* coletados em Confins-MG e mantidos em laboratório conforme o item 5.1.5.

Foram utilizados espécimes com comprimento mínimo de 4 mm de concha que foram colocados individualmente em poços de uma placas de poliestireno (FALCON 3047) contendo 2 mL de água onde adicionou-se 2 miracídios recuperados com auxílio de uma pipeta de Pasteur. As placas foram tampadas, expostas a foco de luz de 60 W a uma distância de 50 cm por 24 horas. Ao final desse período cada poço foi inspecionado em microscópio estereoscópico, juntamente com a superfície externa dos moluscos em aumento de 40X para confirmação da infecção. Esses moluscos foram utilizados nos itens 5.2.3 e 5.2.4.

### **5.2.3 Histologia de *Lymnaea spp.***

O desenvolvimento de *F. hepatica* em *Lymnaea spp.*, proveniente do município de Confins-MG, criado no LabHelVet-ICB/UFMG, foi avaliado por meio da histologia. Cinco espécimes de moluscos foram fixados por imersão em solução de Bouin por 24 horas nos intervalos de 30 minutos, 1°, 2°, 3°, 7°, 10°, 14°, 21°, 28°, 35°, 42° e 55° dia(s) após a infecção (dpi) e no grupo não infectado (0 dpi). Posteriormente, os tecidos moluscos foram retirados das

conchas e incluídos em parafina para preparação histológica utilizando técnicas descritas por Pan (1958), Plesh *et al.* (1975). A desidratação foi realizada em quatro banhos de álcool 70%, 80%, 90% e 100%, seguida da diafanização que foi feita em três banhos de xilol. As peças foram incluídas em parafina a 56 °C e cortes seriados de 5-7µm foram obtidos em micrótomo. Os cortes histológicos foram hidratados, passando o material em séries de xilol, álcool e água corrente. A coloração com hematoxilina-eosina (HE) foi realizada por quinze minutos e em seguida, foi feita lavagem por 10 minutos em água corrente e então os cortes foram imersos em eosina por 30 minutos e lavados novamente em água corrente, desidratada em álcool, clarificados em xilol e montados com Entellan (Merk). As lâminas prontas com os cortes de cada período de infecção foram examinadas ao microscópio Olympus BX41N, acoplado em câmera digital Olympus DP12 para o registro fotográfico.

#### **5.2.4 Variações na população de hemócitos circulantes de *Lymnaea* spp.**

##### **5.2.4.1 Coleta de hemolinfa e quantificação de hemócitos de *Lymnaea* spp. infectado por *F. hepatica***

Um grupo de 150 moluscos foi utilizado para observar o comportamento dos hemócitos à infecção por *F. hepatica*. Foram utilizados para coleta de hemolinfa 15 moluscos em cada um dos seguintes intervalos: 30 minutos após infecção, 1°, 7°, 10°, 14°, 21°, 28°, 45° e 50° dpi e o grupo não infectado (0 dpi). Os moluscos foram imersos em solução de Pentobarbital Sódico (Hypnol-Cristalia) a 0,4mg/mL diluído em *Chernin's balanced salt solution*- CBSS (47,7 mM de NaCl, 2,0 mM de KCl, 0,49 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro, 1,8 mM de MgSO<sub>4</sub> .

7H<sub>2</sub>O, 3,6 mM de CaCl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O, 0,59 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM de glicose e 3 mM de trealose, pH 7.2). Após 4 horas de imersão em temperatura ambiente ocorreu anestesia dos espécimes, segundo protocolo adaptado de Martins-Souza *et al.* (2003). Em seguida as conchas foram limpas com papel absorvente embebido em álcool 70%.

Para coleta de hemolinfa um tubo capilar heparinizado de micro-hematócrito (Glasscyto - 80UI/mL de heparina sódica, 75 mm de comprimento x 1,6 mm de diâmetro externo) foi inserido em movimentos circulares na região cefalopodal do molusco até a transposição da musculatura e o alcance da cavidade corporal. A hemolinfa coletada de três moluscos, por capilaridade, foi agrupada sobre filme plástico a 4 °C formando um “pool” para análise posterior. Em seguida, diluiu-se 10µl da hemolinfa do “pool” de 1:10 em solução CBSS/Citrato/EDTA suplementado com 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL estreptomicina (Sigma, St. Louis MO, USA) contendo corante vital Azul de Tripán 4% (SIGMA) para quantificar e avaliar a viabilidade dos hemócitos por meio de câmara de Neubauer como descrito por Martins-Souza *et al.* (2003) e Pereira *et al.* (2008).

#### **5.2.4.2 Curva de sobrevivência de *Lymnaea spp.* infectado por *F. hepatica***

Para análise da curva de sobrevivência 70 *Lymnaea spp.* infectados individualmente com dois miracídios de *F. hepatica* conforme descrito no item 5.2.2 e 70 moluscos não infectados foram mantidos em cubas nas condições descritas acima. As cubas foram acompanhadas diariamente por 7 semanas após a infecção (spi) para quantificação dos moluscos mortos.

### **5.3 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no *Software Graphpad Prism 5.0*.

Os dados das coletas foram tratados estatisticamente por meio da correlação de Spearman entre as densidades populacionais dos moluscos registradas em cada mês e os fatores climáticos (precipitação pluvial e temperatura média).

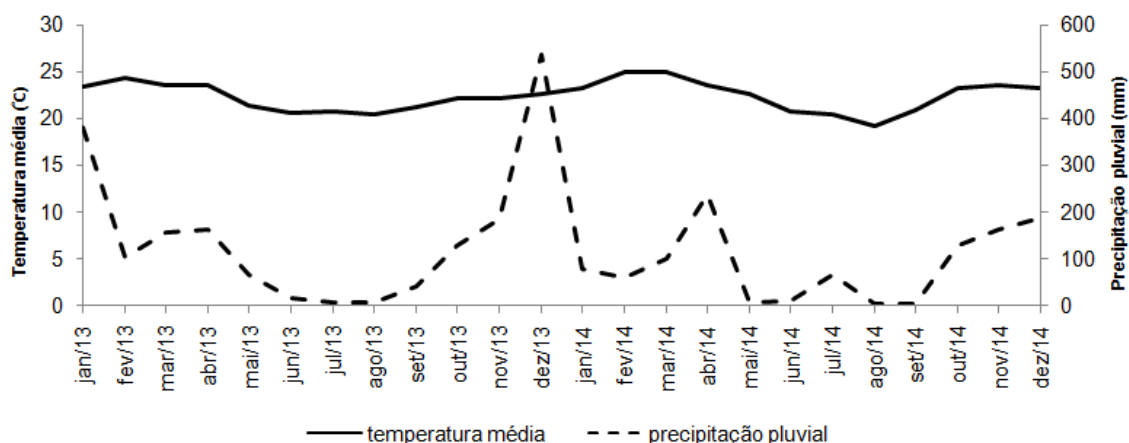
O número médio das contagens de hemócitos circulantes foi comparado entre *Lymnaea spp.* não infectados e infectados por *F. hepatica*, por meio do teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

A curva de sobrevivência dos moluscos foi analisada pelos testes de Kaplan-Meier Survival Curves e Log-Rank Test.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Variação nas médias mensais de temperatura e precipitação pluvial

As variações das médias de temperatura e da precipitação pluvial mensais estão representadas no Gráfico 1.



**GRÁFICO 1.** Variação da temperatura média (°C) e da precipitação pluvial (mm) de janeiro/2013 a dezembro/2014 do município de Confins - MG.

O índice de precipitação pluvial mensal no ano de 2013 reduziu gradativamente de 381 mm em janeiro até 0 mm em julho e agosto. Em setembro iniciou-se o período chuvoso atingindo 536 mm em dezembro de 2013, que foi o maior valor registrado durante os dois anos de estudos. No ano de 2014 entre os meses de janeiro e março a precipitação pluvial variou de 77 a 100 mm, atingindo o maior valor médio de 237 mm em abril diferente do que normalmente ocorre no período do ano nessa região. Nos meses de agosto e setembro o nível de precipitação pluvial foi de 0 mm, subindo até 186 mm em dezembro. Em 2013 a precipitação pluvial reduziu de janeiro a agosto, enquanto que em 2014, a precipitação pluvial total foi menor e não seguiu a mesma distribuição do ano anterior. As menores médias de temperatura registradas em 2013 e 2014 ocorreram em agosto, e foram 20,4 °C e 19,1 °C,

respectivamente. As maiores temperaturas médias registradas foram 24,3 °C que ocorreram em fevereiro de 2013 e 24,9 °C registrada em março de 2014.

### **6.1.2 Identificação dos moluscos e de estágios evolutivos de *F. hepatica* em *Lymnaea* spp. coletados em campo**

*Lymnaea* spp. foi identificado morfológicamente segundo Paraense (1983) como *Lymnaea columella* (Say, 1817). Os gastrópodes *Biomphalaria* spp. (Preston, 1910), *Physa* spp. (Draparnaud, 1801), *Melanoides* spp. e *Pomacea* spp. (Olivier, 1804) foram identificados de acordo com o Manual de Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica no sítio eletrônico [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs). Os moluscos coletados durante o período experimental estão representados na Tabela 01.

Durante as análises de moluscos *L. columella* não foram identificadas formas evolutivas de *F. hepatica*.

### **6.1.3 Variação na população de gastrópodes coletados**

As dimensões aproximadas da lagoa marginal obtidas no “software - *Google Earth*” e foram: 1.670 m de perímetro; 180 m de largura; 301 m de comprimento; área total de 5,4 ha. Os bebedouros naturais onde foram realizadas as coletas apresentaram cerca de 110 m, dos quais foram amostrados 3 m<sup>2</sup>/mês. Após 24 meses de amostragem, foram coletados 1909 espécimes de gastrópodes, sendo que *Physa* spp. foi mais abundante, com 537 (28,13%) indivíduos capturados, seguidos de *Melanoides* spp. com 487(25,51%), *Pomacea* spp. com 407 (21,32%), *L. columella* com 351 (18,36%) e *Biomphalaria* spp. com 127 (6,65%) espécimes.

Em 2013 os meses de maio e julho, estação de menor precipitação, ocorreram os maiores números de espécimes coletados de *L. columella*, 27 e 09 respectivamente por m<sup>2</sup> amostrado. No ano de 2014 observou-se os maiores números de moluscos capturados na estação seca que se estendeu até setembro. *Biomphalaria* spp. e *Melanoides* spp. tiveram os menores números de espécimes amostrados na estação seca de 2013 e de 2014. *Physa* spp. foi encontrado em quase todos os meses, com exceção de abril de 2014. *Pomacea* spp. foi coletado durante todo o período de estudo, com maior número durante os meses da estação chuvosa. Na Tabela 1 está representada a variação das populações de gastrópodes nos dois anos do experimento.

**TABELA 1.** Variação mensal das populações de gastrópodes coletados em 3 m<sup>2</sup> de bebedouros naturais de bovinos, em lagoa marginal do ribeirão da Mata, Confins-MG, entre janeiro/2013 a dezembro/2014.

Mês/ano	<i>L. columella</i>	<i>Biomphalaria</i> spp.	<i>Melanooides</i> spp.	<i>Physa</i> spp.	<i>Pomacea</i> spp.
jan/13	11	11	34	15	18
fev/13	1	1	37	3	18
mar/13	9	8	32	13	47
abr/13	5	6	39	15	15
mai/13	27	2	19	28	17
jun/13	3	1	17	5	2
jul/13	9	3	8	30	10
ago/13	2	0	13	36	7
set/13	3	1	5	13	9
out/13	5	3	4	25	5
nov/13	5	0	23	21	8
dez/13	4	0	16	7	5
jan/14	1	2	56	61	47
fev/14	1	35	6	21	33
mar/14	4	21	32	20	56
abr/14	1	3	25	0	22
mai/14	4	9	31	5	24
jun/14	30	0	0	7	4
jul/14	58	1	14	1	4
ago/14	33	3	17	61	1
set/14	75	3	20	48	7
out/14	45	10	10	53	29
nov/14	7	3	9	35	13
dez/14	8	1	20	14	6
Total	351	127	487	537	407

#### 6.1.4 Comparação de populações de gastrópodes

Os testes de correlação mostraram que houve pouca semelhança entre as variações de populações das diferentes espécies de gastrópodes quando foi comparado o número de moluscos coletados entre os dois anos de amostragem (TAB. 2).

A correlação estatística de *L. columella* com *Biomphalaria* spp. foi positiva e fraca ( $r_s = 0,09$ ), enquanto que em relação à *Melanooides* spp. foi negativa e fraca ( $r_s = -0,20$ ) e à *Physa* spp., foi observado o maior valor de correlação positiva, porém fraco ( $r_s = 0,26$ ). Entre *L. columella* e *Pomacea* spp. ocorreu o maior valor de correlação negativa ( $r_s = -0,33$ ), também considerado fraco.

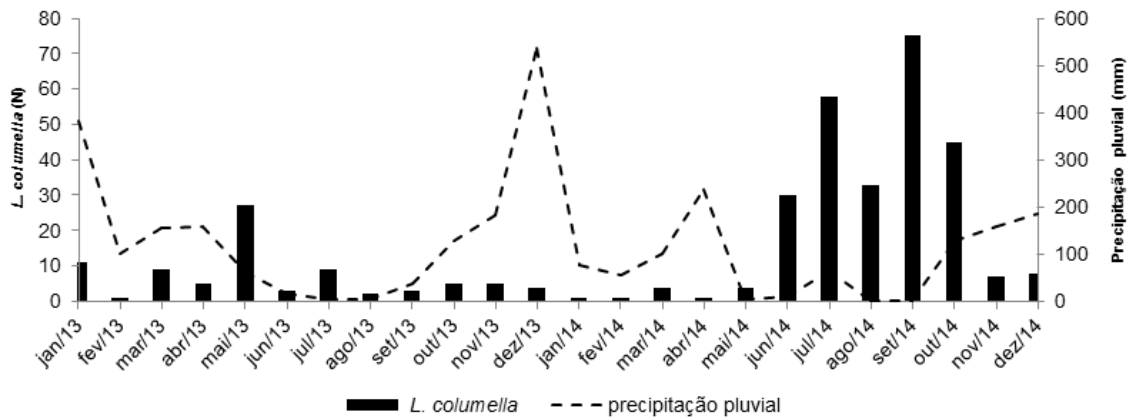
As correlações estatisticamente significativas entre os gastrópodes coletados ocorreram entre *Biomphalaria* spp. e *Pomacea* spp. ( $r_s = 0,65$ ) e entre *Melanooides* spp. e *Pomacea* spp. ( $r_s = 0,50$ ).

**TABELA 2.** Coeficientes de correlação observados na comparação entre as variações de populações das diferentes espécies de gastrópodes coletados em bebedouros naturais de bovinos, em lagoa marginal do ribeirão da Mata, Confins-MG, entre janeiro/2013 a dezembro/2014.

	<i>L. columella</i>	<i>Biomphalaria</i> spp.	<i>Melanooides</i> spp.	<i>Physa</i> spp.	<i>Pomacea</i> spp.
<i>L. columella</i> spp.	x	0,10	-0,20	0,26	-0,33
<i>Biomphalaria</i> spp.	0,09	x	0,23	0,21	0,65
<i>Melanooides</i> spp.	-0,20	0,23	x	-0,13	0,50
<i>Physa</i> spp.	0,26	0,21	-0,13	x	0,10
<i>Pomacea</i> spp.	-0,36	0,65	0,48	0,10	x

#### 6.1.5 Variação das populações de *L. columella*

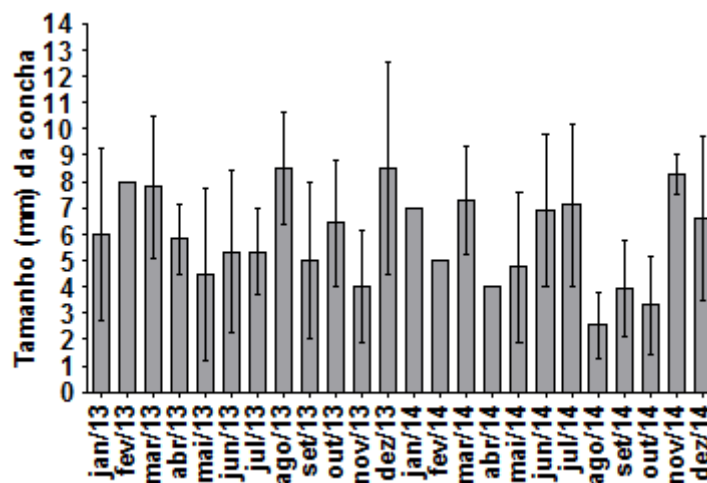
A análise descritiva nos dois anos de coleta mostrou que a redução da precipitação pluvial entre os meses de abril e setembro de 2013 e 2014, coincidiu com o aumento do número de espécimes *L. columella* (GRAF. 2).



**GRÁFICO 2.** Variação do número de *Lymnaea columella* coletados mensalmente e da precipitação pluvial (mm) entre dezembro/2013 e janeiro/2014 em Confins-MG.

O coeficiente de correlação da população de *L. columella* entre os dois anos de coleta foi fraco e negativo ( $r_s = -0,2$ ).

As correlações estatísticas entre *L. columella* e a precipitação pluvial foram fracas ( $r_s = -0,15$ ), enquanto que para temperatura foi de ( $r_s = -0,40$ ).



**GRÁFICO 3.** Variação do tamanho médio das conchas de *Lymnaea columella* coletados mensalmente entre dezembro/2013 a janeiro/2014 em Confins - MG.

Os valores médios do tamanho das conchas de *L. columella* variaram durante os dois anos de amostragem e estão representados no Gráfico 3. As maiores médias dos tamanhos da concha foram observadas em agosto de

2013 ( $X=8,5$ ,  $DP=2,12$ ) e dezembro de 2013 ( $X=8,5$ ,  $DP=4,04$ ) e a menor média desses valores ocorreram em agosto de 2014 ( $X=2,54$ ,  $DP=1,27$ ). Foram observados tamanhos menores das conchas de *L. columella* entre os meses de abril, maio e junho e julho de 2013 e agosto, setembro e outubro de 2014. Nos meses da estação chuvosa de 2013, a partir de fevereiro, ocorreram moluscos com conchas menores até o mês de maio, seguido do aumento de tamanho das conchas de maio a agosto, reduzindo novamente de outubro a novembro. No ano de 2014 os moluscos com conchas de tamanhos maiores variaram de janeiro a maio, aumentando em junho e julho, atingindo os menores valores em agosto, voltando a aumentar até dezembro. As variações do tamanho médio das conchas dos moluscos observadas nos dois anos de estudo sugeriram haver sucessão de gerações de *L. columella*, durante todo o ano, com maiores tendências para os meses de menor precipitação pluvial.

## **6.2 Histologia de *L. columella* durante o desenvolvimento de *F. hepatica***

A região cefalopodal dos moluscos do grupo não infectado de *L. columella* mostrou-se revestido por epitélio cilíndrico formado por células prismáticas polarizadas, de núcleo basal. O citoplasma das células epiteliais apresentou discreta basofilia. Foi observada no tecido conjuntivo a presença de fibroblastos de citoplasma basófilos com prolongamentos em meio à matriz do tecido conjuntivo e fibras musculares transversais, oblíquas e longitudinais. Ocorreram hemócitos dispersos pelo tecido conjuntivo em espaços onde fluia a hemolinfa (FIG. 4).

Na região do manto de *L. columella* do grupo não infectado o tecido epitelial era constituído por células prismáticas, e logo abaixo ocorreu tecido conjuntivo frouxo formado por espaços onde fluía a hemolinfa, fibras colágenas e musculares em diferentes planos. Outros tipos celulares encontrados foram fibroblastos e hemócitos (FIG. 5).

A luz da glândula digestiva era revestida por epitélio prismático com células ciliadas e mucosecretoras, onde foram observados vacúolos translúcidos. Abaixo do tecido epitelial glandular a lâmina própria, formada por tecido conjuntivo continha fibras colágenas e musculares com fibroblastos em meio a matriz extracelular. Em regiões da luz do intestino, próximas à glândula digestiva ocorreram células prismáticas e cúbicas revestidas por muco. A hemocele continha hemócitos livres nos espaços interlobulares (FIG. 6 e 7).

Aos 30 minutos após infecção os miracídios de *F. hepatica*, revestidos por placas ciliares remanescentes, estavam no tecido conjuntivo das regiões cefalopodal e manto. Nessas regiões ocorreram lacunas no entorno desses miracídios, devido ao rompimento de fibras musculares dispostas nos planos transversal e longitudinal, localizadas próximo aos fibroblastos. Também foram verificados hemócitos dispersos em espaços íntegros onde fluía a hemolinfa do molusco e aderidos aos miracídios (FIG. 8).

Observou-se ao 1º dpi, na região cefalopodal dos moluscos, miracídios revestidos por placas ciliares, aderidos ao epitélio pela papila anterior, causando o estiramento do tecido epitelial e conjuntivo formando lacunas com formato de túnel. O interior dessas lacunas apresentou vesículas, possivelmente formadas pela liberação de células das placas ciliares do

miracídio. Nesses locais, hemócitos dispersos e aderidos aos miracídios e presentes no tecido conjuntivo foram constatados (FIG. 9).

No 2° e 3° dpi na região cefalopodal e hemocele de *L. columella*, foram observados esporocistos com formato sacular, contendo células translúcidas arredondadas. Nesse período ocorreu o rompimento do tecido conjuntivo com formação de lacunas no entorno dos esporocistos. No 3° dpi alguns esporocistos encontravam-se próximos a fibras musculares rompidas. Além disso, haviam hemócitos dispersos no tecido conjuntivo do molusco e próximos aos esporocistos (FIG. 10 e 11).

No 7° dpi esporocistos arredondados estavam presentes na região cefalopodal de *L. columella*, próximos à rádula, com a presença de fibras musculares rompidas nessa região. A camada muscular dessas larvas estava formada e envolvia células germinativas de intensa basofilia, que se desenvolveriam em rédias (FIG. 12).

No 10° dpi na região cefalopodal rédias em desenvolvimento apresentavam faringe e ceco. Esse estágio larval estava presente em lacunas do tecido conjuntivo rompido do molusco. Foram observados hemócitos aderidos às rédias com reações hemocitárias discretas (FIG. 13).

No 14° dpi rédias em diferentes estágios de desenvolvimento estavam livres na hemocele. Algumas apresentavam células que originariam o tegumento, faringe, ceco e células germinativas, e outras rédias já apresentavam essas estruturas formadas. Na hemocele dos moluscos foram observados infiltrados celulares contendo hemócitos na hemolinfa no entorno das rédias caracterizando uma reação hemocitária (FIG. 14 e 15).

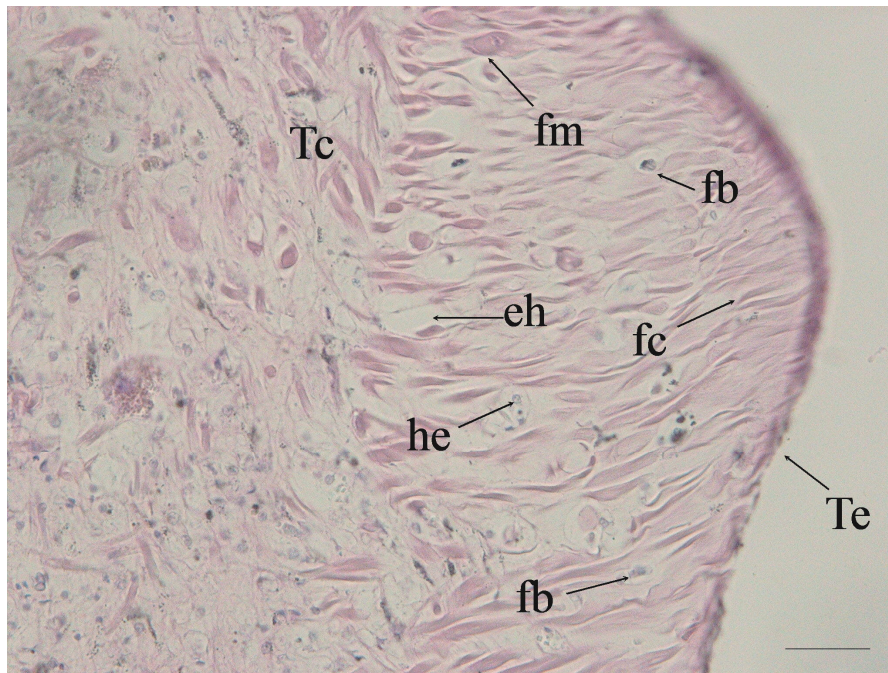
No 21° dpi rédia com faringe desenvolvida foi observada na região da hemocele próxima ao esôfago. Observou-se hemócitos na hemolinfa próximos ao parasito (FIG. 16).

No 28° dpi as rédias apresentavam faringe desenvolvida, tegumento, ceco e células germinativas, formando lacunas no tecido conjuntivo rompido do manto de *L. columella* (FIG. 17).

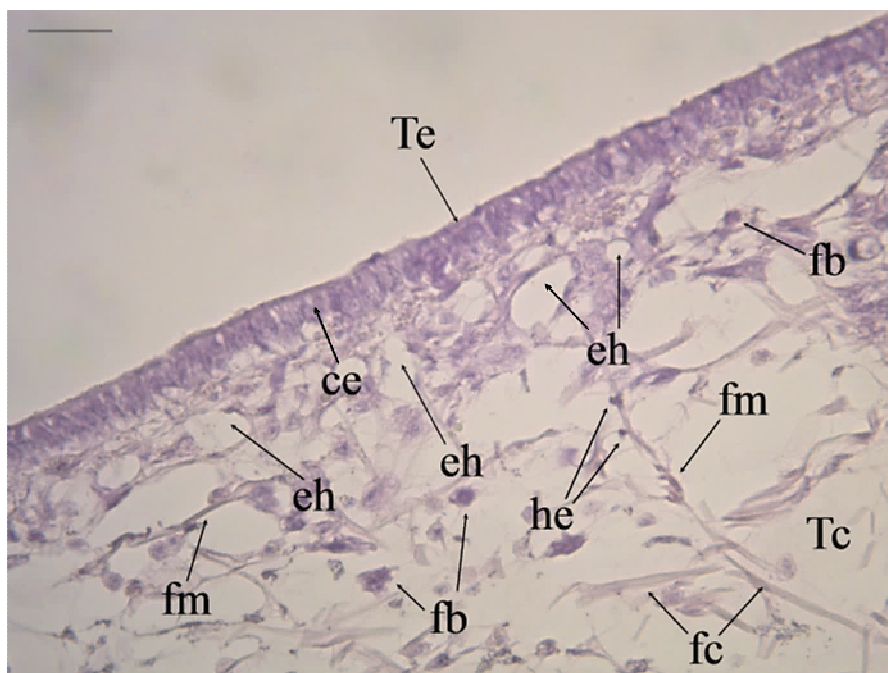
No 35° dpi observou-se rédia de *F. hepatica* em desenvolvimento caracterizado com a presença ceco, faringe e células germinativas no tecido conjuntivo próximo ao esôfago de *L. columella*, sem formação de infiltrado de hemócitos (FIG. 18).

No 42° dpi foi observada rédia com faringe e ceco formados no tecido conjuntivo próximo ao esôfago e rádula. Não foi observado infiltrado de hemócitos nesse período de infecção (FIG. 19).

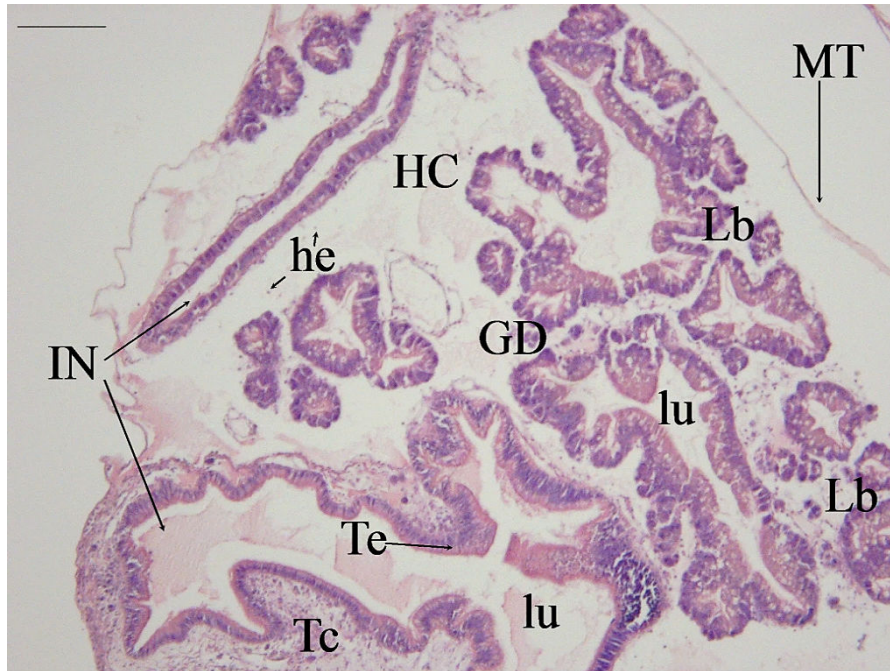
No 55° dpi na glândula digestiva, as rédias albergavam rédias filhas e cercárias em desenvolvimento, com desorganização da estrutura dos tecidos epitelial e conjuntivo dos lóbulos da glândula digestiva causada pela presença do parasito. Algumas dessas cercárias continham produtos da glândula cistogênica de cor bronze. Essas rédias ocupavam grandes porções da glândula digestiva dos moluscos (FIG. 20).



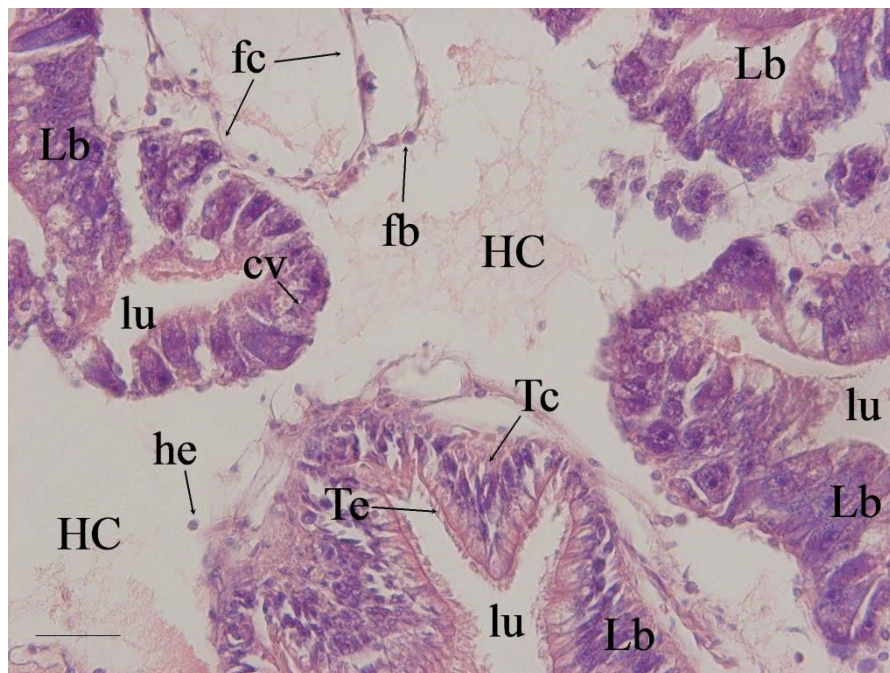
**FIGURA 4.** Histologia da região cefalopodal de *Lymnaea columella* não infectada. Observar tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), fibras musculares (fm), fibras colágenas (fc), espaços da hemolinfa (eh), hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 50  $\mu$ m.



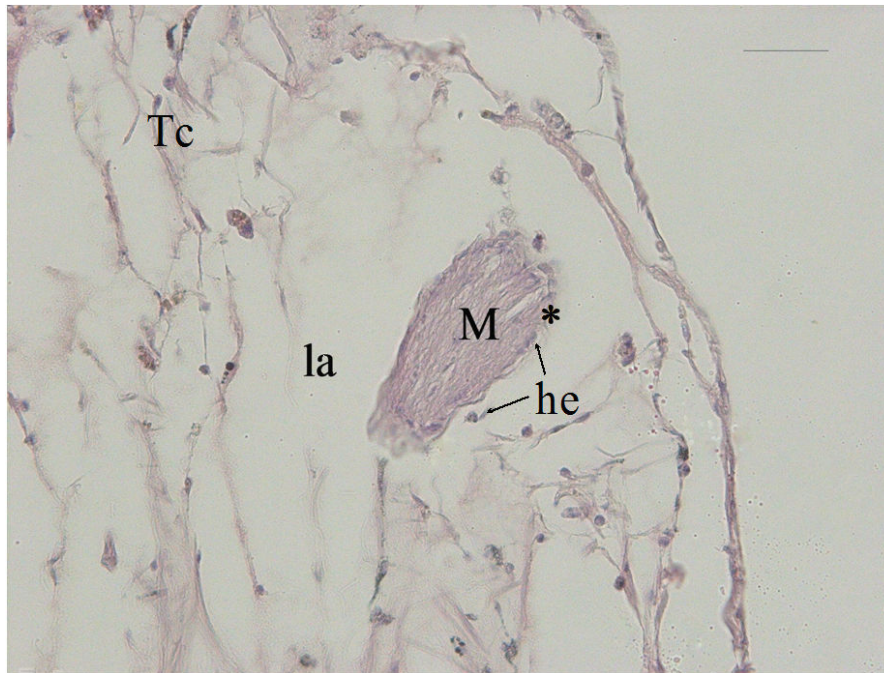
**FIGURA 5.** Histologia do manto de *Lymnaea columella* não infectada. Observar tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), fibras musculares (fm) e colágenas (fc), espaços da hemolinfa (eh), hemócitos (he), células epiteliais (ce) e fibroblastos (fb). Coloração HE. Barra de escala = 25  $\mu$ m.



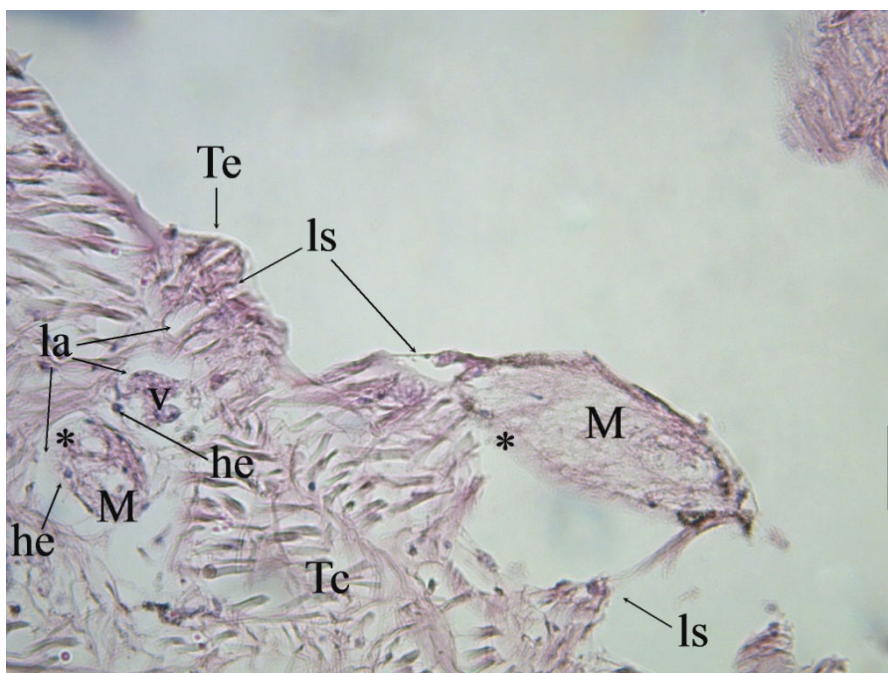
**FIGURA 6.** Histologia da região da glândula digestiva *Lymnaea columella* não infectada. Observar lóbulos glandulares (Lb) e lúmen (lu), intestino (IN), hemocele (HC), manto (MT) tecidos epitelial (Te) e conjuntivo, hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 50  $\mu$ m.



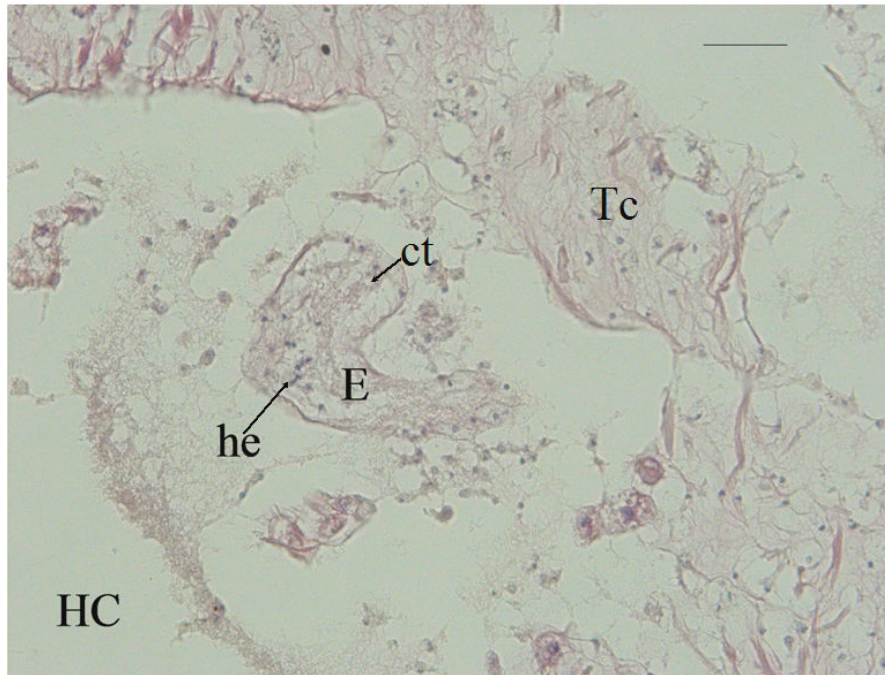
**FIGURA 7.** Histologia da região da glândula digestiva *Lymnaea columella* não infectada. Observar hemocele (HC), tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), lúmen (lu) dos lóbulos glandulares (Lb), células com vacúolos (cv), hemócitos (he) na hemocele (HE) e fibroblastos (fb). Coloração HE. Barra de escala = 25  $\mu$ m.



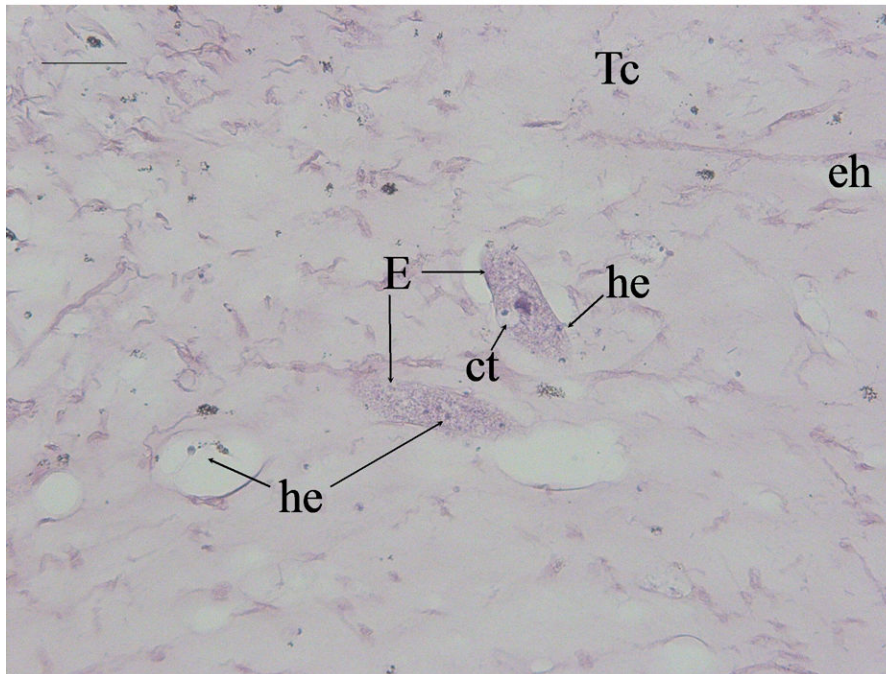
**FIGURA 8.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Miracídio (M) de *F. hepatica* com placas ciliares (\*) no manto 30 minutos após infecção no tecido conjuntivo (Tc). Observar lacuna (la) e hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 25  $\mu$ m.



**FIGURA 9.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Miracídios (M) com placas ciliares (\*) vesículas (v) na região cefalopodal no 1° dpi. Observar tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), lacunas (la), lesão (ls), e hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 25  $\mu$ m.



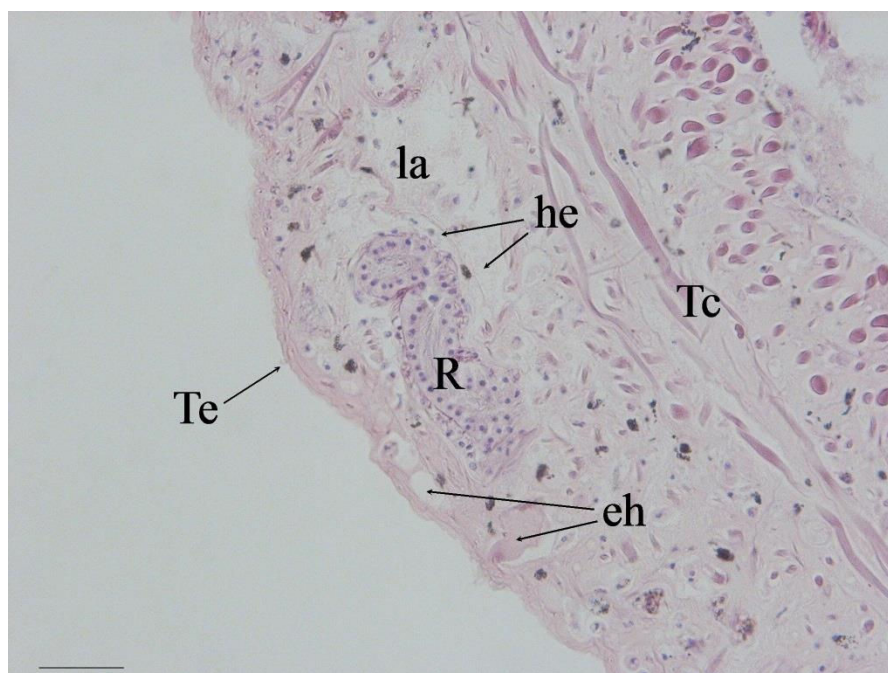
**FIGURA 10.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Esporocisto (E) no 2<sup>o</sup> dpi com células translúcidas (ct) na hemocele (HC). Tecido conjuntivo (Tc), hemocele (HC) e hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm.



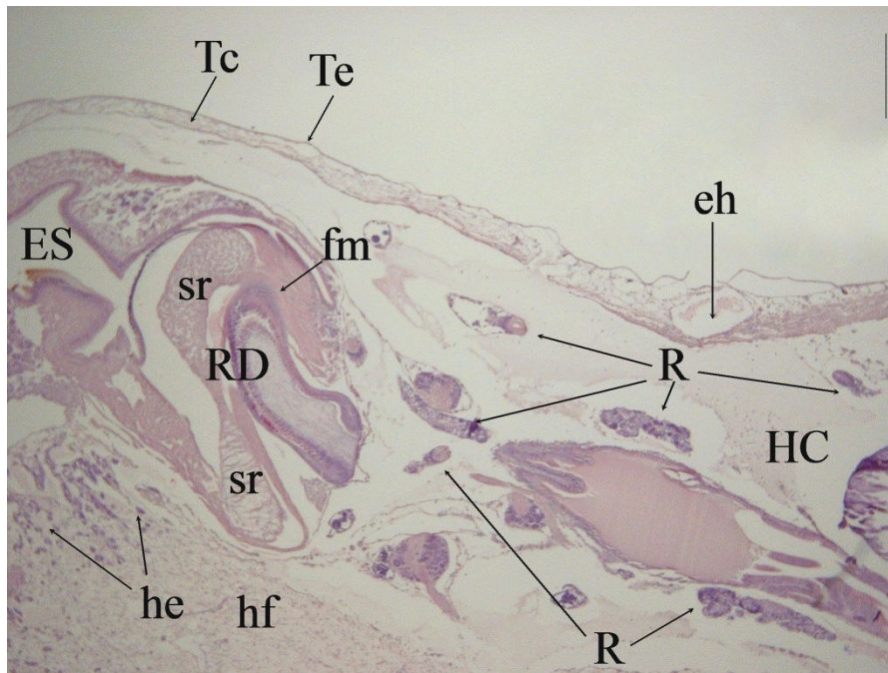
**FIGURA 11.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Esporocistos (E) no 3<sup>o</sup> dpi com células translúcidas (ct) na região cefalopodal no tecido conjuntivo (Tc), espaços da hemolinfa (eh) e hemócitos (he): Coloração HE. Barra de escala = 50 µm.



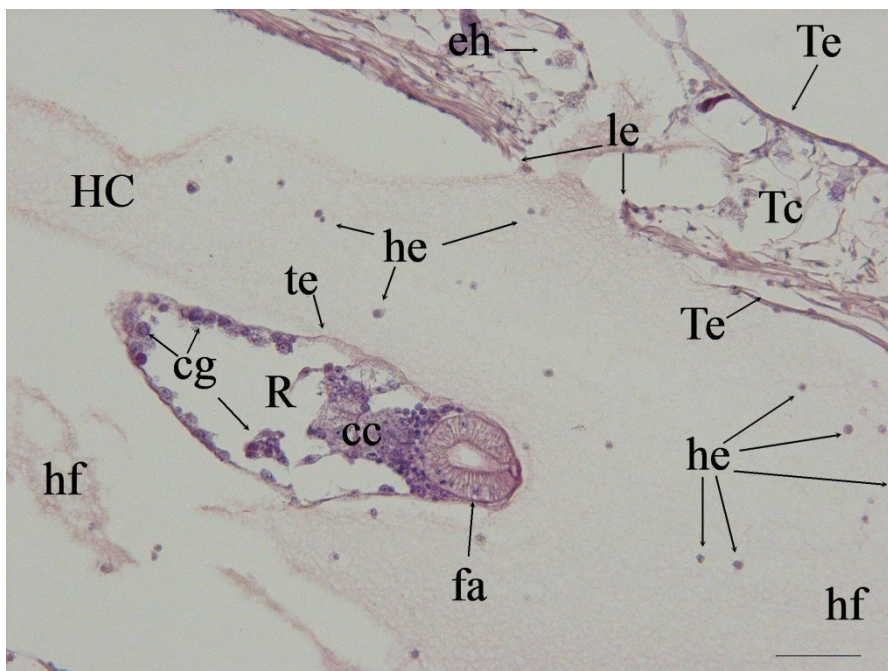
**FIGURA 12.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Esporocisto (E) no 7<sup>o</sup> dpi na região da rádula (RD) próximo a fibras musculares (fm). Coloração HE. Barra de escala = 10 µm.



**FIGURA 13.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 10<sup>o</sup> dpi em lacuna (la) na região cefalopodal, tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), espaços da hemolinfa (eh), hemócitos (he). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm.



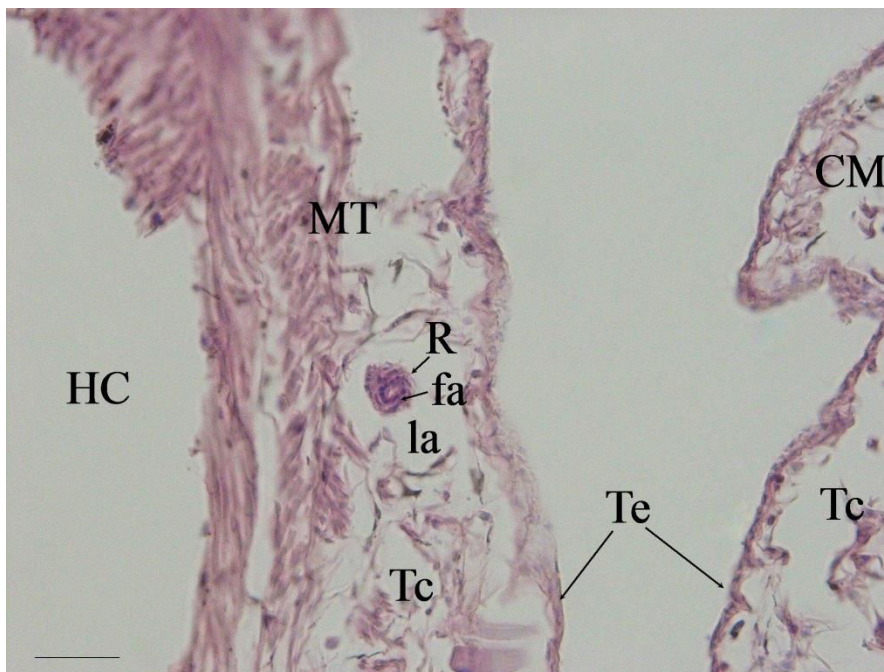
**FIGURA 14.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédias (R) no 14<sup>o</sup> dpi na hemocele (HC), tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), espaços da hemolinfa (eh), hemócitos (he), hemolinfa (hf), rádula (RD), suportes da rádula (SR), esôfago (ES), fibras musculares (fm). Coloração HE. Barra de escala = 100 µm.



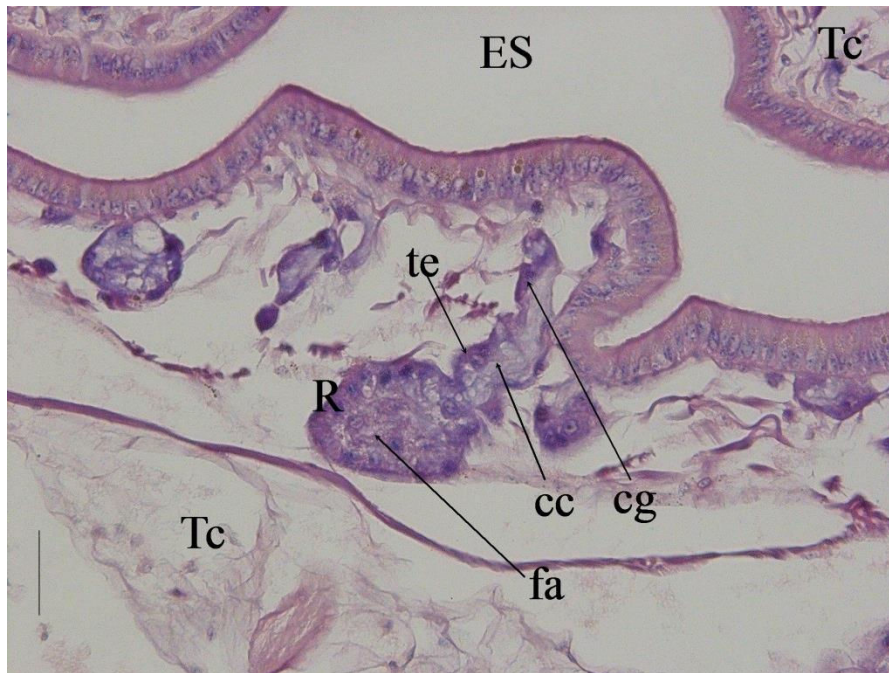
**FIGURA 15.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 14<sup>o</sup> dpi na hemocele (HC) apresentando faringe (fa), tegumento (te), ceco (cc), células germinativas (cg), tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc), espaços da hemolinfa (eh), lesão (le), hemócitos (he) e hemolinfa (hf). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm.



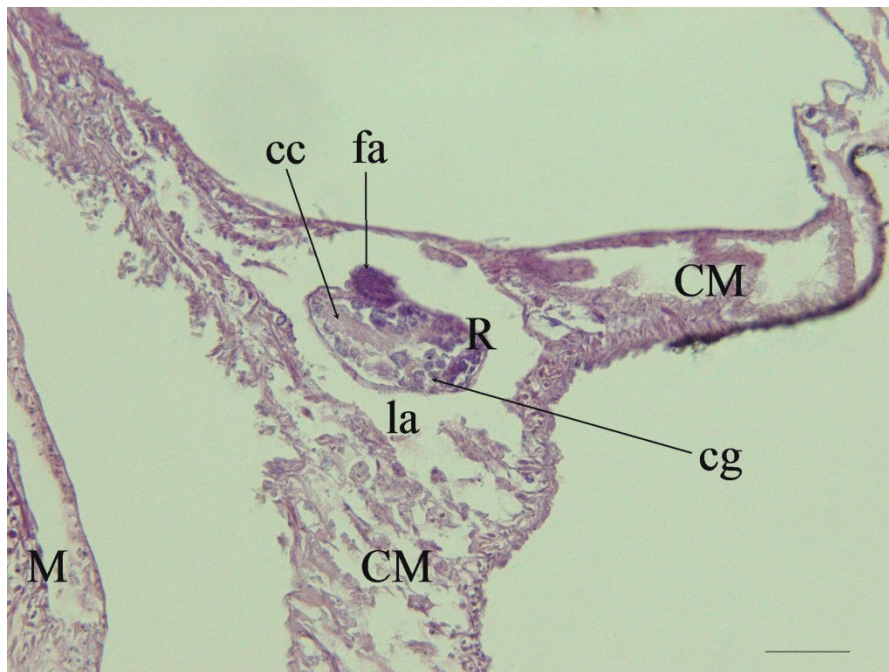
**FIGURA 16.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 21<sup>o</sup> dpi com faringe (fa) na hemocele (HC), hemócitos (he), hemolinfa (hf) e intestino (IN). Coloração HE. Barra de escala = 25  $\mu$ m.



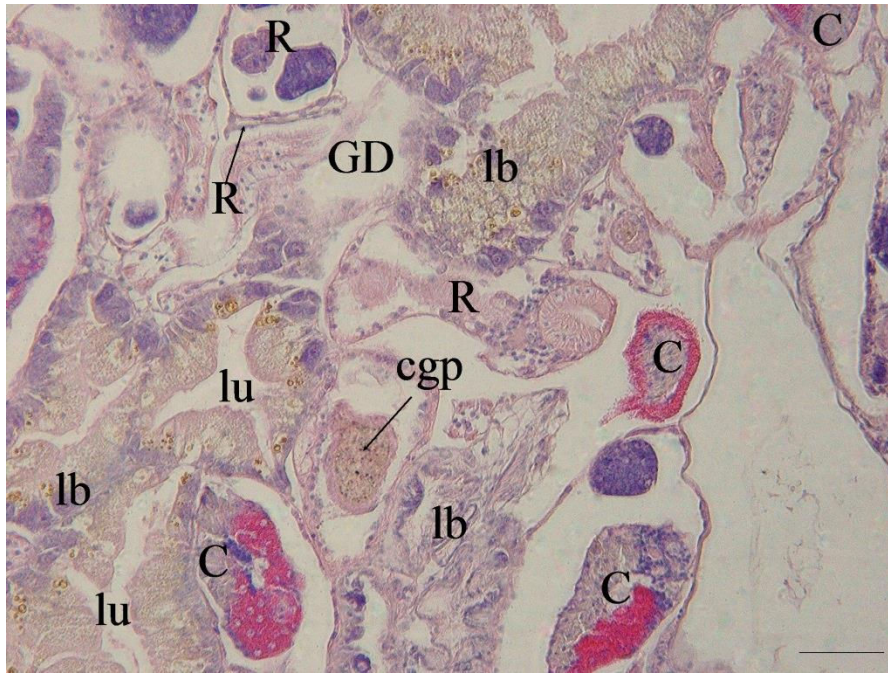
**FIGURA 17.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 28<sup>o</sup> dpi com faringe (fa) em lacuna (la) do manto (MT) entre o colar do manto (CM) e hemocele (HC), tecidos epitelial (Te) e conjuntivo (Tc). Coloração HE. Barra de escala = 50  $\mu$ m.



**FIGURA 18.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) no 35° dpi apresentando faringe (fa), ceco (cc) e tegumento (Te), no tecido conjuntivo (Tc), próximo ao esôfago (ES). Coloração HE. Barra de escala = 25 µm.



**FIGURA 19.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rédia (R) ao 42° dpi em lacuna (la) no colar do manto (CM), próxima ao manto (M), apresentando faringe (fa), ceco (cc) e células germinativas (cg). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm.



**FIGURA 20.** Histologia do desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella*. Rídias (R) e cercárias (C) com glândulas cistogênicas (cgp) no 55° dpi, na região da glândula digestiva (GD), observar lóbulos (lb) e lúmen (lu). Coloração HE. Barra de escala = 50 µm.

### 6.3 Hemócitos circulantes de *L. columella*

#### 6.3.1 Contagem total e viabilidade dos hemócitos

Foram observadas variações no número médio de hemócitos circulantes na hemolinfa de *L. columella* do grupo infectado por *F. hepatica*, em relação ao grupo não infectado. Os dados demonstrados referem-se a cinco repetições de contagens realizadas aos 30 minutos após infecção 1°, 7°, 14°, 10°, 21°, 28°, 45° e 50° dpi e 0 dpi (grupo não infectado).

**TABELA 3.** Perfil do número e desvio padrão médio de hemócitos circulantes totais e mortos na hemolinfa de *Lymnaea columella*, dos grupos não infectado e infectado por *Fasciola hepatica*.

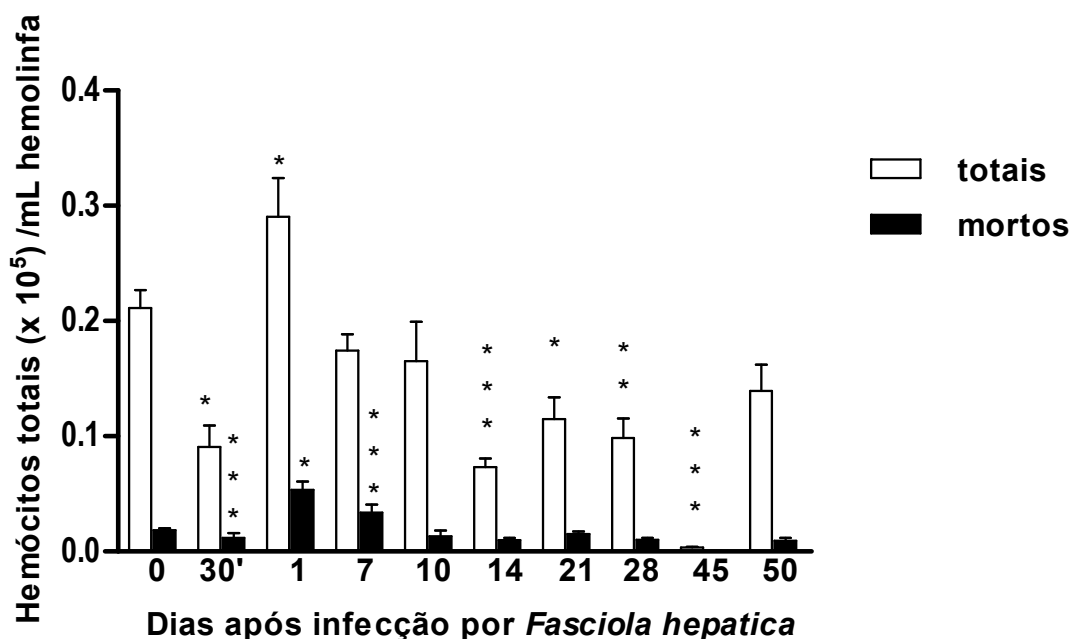
Intervalo de Infecção	Hemócitos totais ( $\times 10^5/\mu\text{L}$ )	Hemócitos mortos ( $\times 10^5/\mu\text{L}$ )
0 (não infectado)	0,21 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01 (8,6%)
30 minutos após infecção	0,09 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,01 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup> (11,1%)
1°	0,29 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup> (16,6%)
7°	0,17 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup> (19,4%)
10°	0,16 $\pm$ 0,10	0,01 $\pm$ 0,01 (6,3%)
14°	0,07 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	0,01 $\pm$ 0,01 (12,8%)
21°	0,11 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,01 (8,3%)
28°	0,09 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,01 $\pm$ 0,07 (11,1%)
45°	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 (0%)
50°	0,14 $\pm$ 0,09	0,01 $\pm$ 0,01 (7,1%)

A letra "a" representa  $p < 0,05$ , a letra "b" representa  $p < 0,01$ , a letra "c" representa  $p < 0,001$ , que são diferenças estatísticas entre o número de hemócitos do grupo infectado em relação ao grupo não infectado.

O número médio de hemócitos totais oscilou ao longo da infecção (TAB. 3, GRAF. 4), houve redução aos 30 minutos após infecção (0,09  $\pm$  0,06), aumento no 1° dpi quando se quantificou os maiores valores de células (0,29  $\pm$  0,18), redução no 7° dpi (0,17  $\pm$  0,06), 10° dpi (0,16  $\pm$  0,10), 14° dpi (0,07  $\pm$  0,04), com aumento no 21° dpi (0,11  $\pm$  0,09), redução aos 28° dpi (0,09  $\pm$  0,07) e 45° dpi (0,00  $\pm$  0,01) e aumento ao 50° dpi (0,14  $\pm$  0,09). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos infectado e não infectado nos intervalos 30 minutos após infecção, 1°, 21° dpi ( $p < 0,05$ ), 28° dpi ( $p < 0,01$ ), 14° e 45° dpi ( $p < 0,001$ ).

Variações também foram observadas no número médio de hemócitos mortos ao longo da infecção (TAB. 3, GRAF. 4). Oscilações no número médio

de células não viáveis foram semelhantes na maioria dos dias analisados. No entanto, aos 30 minutos após infecção ( $0,01 \pm 0,01$ ), 1 dpi ( $0,05 \pm 0,04$ ) e 7 dpi ( $0,04 \pm 0,03$ ) ocorreram diferenças estatísticas entre grupo não infectado, ( $0,18 \pm 0,01$ ) representadas respectivamente por  $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ .

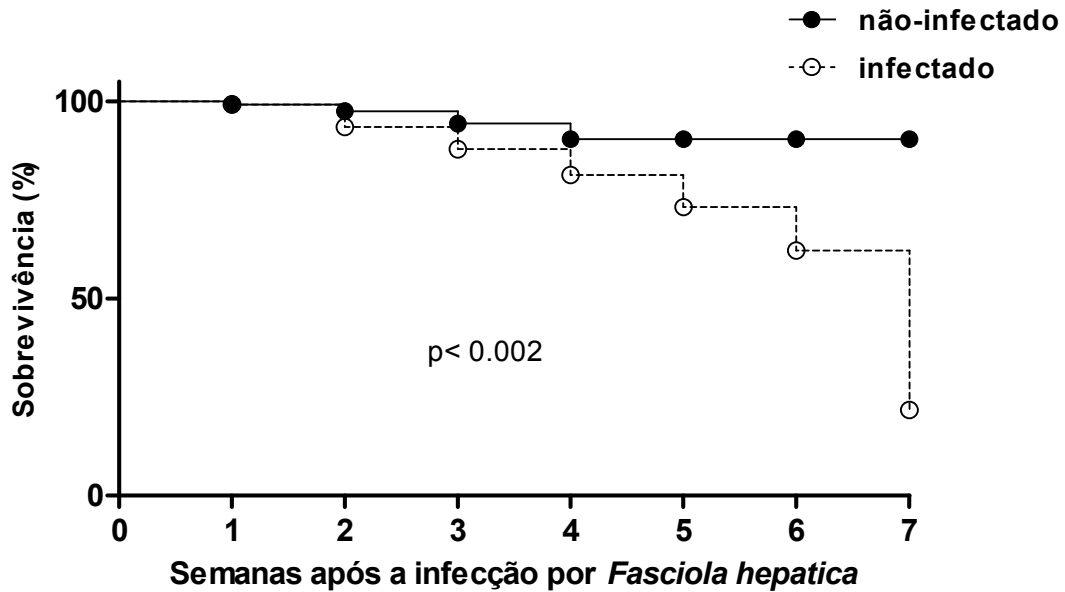


**GRÁFICO 4.** Contagem do número médio de hemócitos totais e mortos (não viáveis) de *Lymnaea columella* infectada por *F. hepatica*. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , representam diferenças estatísticas do número de hemócitos do grupo infectado em relação ao grupo não-infectado.

#### 6.4 Curva de sobrevivência de *L. columella* infectada por *F. hepatica*

Foram observadas diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevivência de *L. columella* do grupo infectado e não infectado durante o experimento ( $p < 0,002$ ). No grupo de moluscos infectados por *F. hepatica*, o padrão de mortalidade aumentou a partir da 2ª semana após infecção (spi), no final da 4ª spi 20% dos espécimes infectados morreram, e entre a 5ª e a 6ª

semana, mais 20% dos moluscos infectados morreram. Sendo que ao final do experimento, somente 20% dos *L. columella* infectados permaneceram vivos, enquanto que dos moluscos não infectados 92,5% permaneceram vivos (GRAF. 5).



**GRÁFICO 5.** Comparação das curvas de sobrevivência de *L. columella* infectada por *F. hepatica*. O valor de  $p < 0.002$  representa as diferenças estatísticas observadas entre as curvas de sobrevivência dos moluscos infectados e não infectados no período de 7 semanas após a infecção.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Variação da população de *L. columella* em Confins - MG

No período de janeiro de 2013 a dezembro de 2014 foi coletado um total de 351 espécimes *L. columella* em bebedouros naturais de lagoa marginal do ribeirão da Mata nos 24 meses de estudo, sendo encontrada diversidade de outros gastrópodes formada por *Biomphalaria* spp., *Melanoides* spp., *Physa* spp. e *Pomacea* spp.. Esses moluscos ocorreram durante as estações seca e chuvosa nos dois anos de amostragem, devido às características da lagoa marginal no período em que foi realizado o presente trabalho, que se mantiveram como um ambiente lântico, conforme proposto por Esteves (1998), sendo constituído por um corpo d'água de baixa força de corrente com águas quase paradas e lentamente renovadas, uma vez que não foi inundada pelo ribeirão da Mata nas duas estações chuvosas.

No presente estudo os gastrópodes coletados apresentaram fracas correlações estatísticas com *L. columella*. Tal resultado pode ser explicado por meio da análise descritiva do número de moluscos, *Biomphalaria* spp., *Melanoides* spp., *Physa* spp. e *Pomacea* spp., que apresentaram oscilações populacionais entre as estações seca e chuvosa nos dois anos do estudo. Todavia, de forma independente da sazonalidade, a diversidade de gastrópodes coletados foi constante o que pode ser atribuído á semelhança de habitat desses moluscos, relatada também por outros autores, como Martello *et al.* (2008), que observaram em planícies permanentes de inundação do rio Iguaçu, afluente do rio Uruguai, município de São Borja-RS, a preferência de *L. columella* pela região do talo de *Eichornia* spp., enquanto que *Biomphalaria* spp., *Pomacea* spp. e *Stenophysa* spp. estavam associadas às raízes do

vegetal. As taboas (*Typha* spp.), água-pés (*Eichornia* spp.) e salvínias (*Salvinia* spp.) serviram como substrato de desenvolvimento de *L. columella* e dos outros gastrópodes coletados. Essas macrófitas ocorreram associadas à presença dos moluscos durante todo o período amostral, e tal associação é corroborada pela literatura em estudos epidemiológicos sobre *F. hepatica* no Brasil em margens do açude Bodocongó, Campina Grande - Paraíba (Abílio *et al.*, 2006) e em Itajubá – MG, reconhecida área enzoótica de *F. hepatica* (Coelho *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2009).

Não foi observada eliminação espontânea de cercárias, nem a presença de rédias de *F. hepatica* nos espécimes selvagens de *L. columella* analisados em laboratório. Entretanto, a suscetibilidade do gastrópode ao trematódeo ocorreu experimentalmente no presente estudo, sendo também relatada por Dracz & Lima (2014) em infecções experimentais de *L. columella* por *F. hepatica* com miracídios obtidos a partir de ovos recuperados em fezes de bubalinos e bovinos da mesma região do presente estudo.

As variações da população de *L. columella* mostraram que à medida que ocorreu o decréscimo da precipitação pluvial mensal em cada ano, houve aumento do número desses gastrópodes coletados, o que coincide com os relatos de Amato *et al.* (1986) e Coelho & Lima (2003) no Sudeste do Brasil; quando observaram que *L. columella* apresentou densidade populacional cíclica, diminuindo no período chuvoso e aumentando no período seco. A influência das chuvas pode explicar o menor número de espécimes de *L. columella* coletados em 2013, pois a precipitação pluvial total foi aproximadamente duas vezes maior (1,7 X) que em 2014.

Não foi possível determinar um padrão de renovação da população de *L. columella*, pois nos dois anos de estudo ocorreram grandes amplitudes mensais de tamanho da concha entre moluscos coletados, além de baixa frequência mensal de indivíduos coletados na maioria dos meses do estudo. Todavia, em maio de 2013 e entre agosto e outubro de 2014, ocorreram os maiores números de indivíduos capturados, quando também foram registrados os menores tamanhos da concha de *L. columella*, o que sugeriu provável renovação da população nesses períodos. O baixo número de *L. columella* coletados nos bebedouros, pode ser associado a diferentes fatores como a movimentação da vegetação aquática pelo vento contendo desovas do molusco, devido à predação de *L. columella* por peixes e aves de hábitos alimentares onívoros, como tilápias, garças (Alves *et al.*, 2005, Sick 1997) existentes na área do estudo. Ao contrário do presente trabalho, Amato *et al.* (1986) relataram no vale do rio Paraíba haverem duas gerações de *L. columella* por ano, quando foram capturados moluscos com maior comprimento de concha entre março e julho e novembro e dezembro, enquanto que os moluscos menores, ocorreram entre janeiro e fevereiro.

## **7.2 Histologia de *L. columella* durante o desenvolvimento de *F. hepatica***

Os espécimes de *L. columella* do grupo não infectado mostraram aspectos morfológicos em conformidade com Pan (1958) em *Australorbis glabratus* e Plesh *et al.* (1975) em *Lymnaea stagnalis* que conduziram estudos histológicos em moluscos livre de infecções. As diferenças observadas do

grupo não infectado em relação aos moluscos infectados ocorreram devido às lesões tissulares do parasitismo por *F. hepatica*.

Nos 30 minutos após infecção miracídios de *F. hepatica* foram evidenciados em lacunas do tecido conjuntivo, próximos às fibras musculares rompidas da região cefalopodal e do manto de *L. columella*. Esse resultado foi semelhante aos relatos de Dawes (1960) em *L. truncatula* infectados experimentalmente por *F. hepatica*, que observou lacunas formadas pela ação mecânica e enzimática dessas larvas sobre as fibras colágenas, musculares e os espaços onde fluía a hemolinfa do hospedeiro intermediário. Entretanto, nesse estudo, os miracídios de *F. hepatica* no interior do tecido conjuntivo de *L. columella*, apresentavam placas ciliares, não relatadas pelo referido autor. De acordo com as observações de Saint-Guillain (1968) em *L. truncatula* as placas ciliares dos miracídios de *F. hepatica* eram liberadas sob a forma de vacúolos para o meio externo. Já aos 30 minutos decorridos da infecção, hemócitos dispersos no tecido conjuntivo, em espaços onde fluía a hemolinfa de *L. columella* e aderidos aos miracídios de *F. hepatica*, sugeriam que reações hemocitárias poderiam ocorrer.

No 1º dpi verificou-se na região cefalopodal miracídios. Alguns deles encontravam-se aderidos ao epitélio do molusco pela papila anterior, causando o estiramento dos tecidos epitelial e conjuntivo do molusco, confirmando os dados de Kendall (1965) e Saint-Guillain (1968) que demonstraram em *L. truncatula* a adesão dos miracídios de *F. hepatica* pelas papilas no tegumento dos moluscos. Os miracídios que penetraram no tecido epitelial e conjuntivo de *L. columella* formaram lacunas com a forma de túnel, semelhantes aos notificados por Préveraud-Sindou & Rondelaud (1990), e Diawara (2003) em *L.*

*truncatula* infectados por *F. hepatica*. Nesse trabalho, poucos hemócitos estavam presentes ao 1° dpi nas áreas com presença do parasito, fato semelhante ao verificado por Gutierrez *et al.* (2003) em *L. columella* suscetível e infectada por *F. hepatica*.

Nos 2° e 3° dpi os esporocistos de *F. hepatica*, contendo células translúcidas arredondadas em seus interiores, estavam presentes na região do colar do manto e cefalopodal, próximos ao tecido epitelial e em lacunas rompidas do tecido conjuntivo. As células translúcidas dos esporocistos observadas no presente estudo foram relatadas por Thomas (1883) e Kendall (1965) em *L. truncatula* infectados por *F. hepatica* e de acordo com esses autores, tais células teriam natureza germinativa que originariam as rédias, ou constituiriam a camada interna de revestimento do esporocisto. O desenvolvimento dos esporocistos ao 2° dpi na região do colar do manto de *L. columella* foi provavelmente favorecido, pela menor quantidade de fibras musculares e colágenas presentes nessa região, que ofereceu menor resistência mecânica à larva do parasito, se comparada aos tecidos da região cefalopodal dos moluscos. Todavia, ocorreram esporocistos de *F. hepatica* ao 3° dpi na região cefalopodal de *L. columella*. As lacunas analisadas no tecido conjuntivo rompido de *L. columella* no entorno dos esporocistos de *F. hepatica*, foram também constatadas por Préveraud-Sindou *et al.* (1994) em *L. truncatula* e *Lymnaea glabra* do 1° dpi ao 5° dpi, que evidenciaram a formação de lacunas pelos esporocistos de *F. hepatica* no tecido conjuntivo dos moluscos. No presente estudo reação hemocitária ocorreu de forma discreta, como no processo de interação entre *L. columella* com *F. hepatica* no intervalo de 2° ao 3° dpi.

No 7° dpi foram observados esporocistos de *F. hepatica* contendo células germinativas basófilas em seus interiores, próximos às fibras musculares rompidas na região da rádula de *L. columella*. O rompimento das fibras musculares de *L. columella* ocorreu, provavelmente, pela ação mecânica e citolítica dos esporocistos em desenvolvimento. Esse resultado obtido foi similar ao de Préveraud-Sindou & Rondelaud (1995) que observaram haver migração de esporocistos de *F. hepatica* para a região cefalopodal de *L. truncatula* próximo à rádula dos moluscos.

A partir de 10° dpi foi comprovada a presença de rédias na região cefalopodal de *L. columella* desenvolvendo-se em lacunas de tecido conjuntivo rompido. Rédias também estavam presentes aos 14° e 21° dpi na hemocele, ao 28° dpi no tecido conjuntivo do manto e do colar do manto, ao 35° dpi foram encontradas no tecido conjuntivo próximo ao esôfago e ao 42° dpi no tecido conjuntivo do colar do manto do molusco, o que foi semelhante aos relatos de Saint-Guillain (1968) ao observar rédias de *F. hepatica* na região cefalopodal, no manto, e em migração pela hemocele em direção à glândula digestiva de *L. truncatula*. Nesse estudo as lesões provocadas pelas rédias aos tecidos de *L. columella* no 10°, 14°, 28° e 42° dpi, foram semelhantes àquelas encontradas por Diawara *et al.* (2003) em *Galba truncatula* naturalmente infectados por *F. hepatica* que relataram a secreção de substâncias histolíticas pelas rédias, que favoreciam a destruição de tecidos do hospedeiro intermediário e a formação de lacunas.

No presente trabalho reações hemocitárias de *L. columella* foram evidenciadas no entorno das rédias *F. hepatica* presentes na região cefalopodal entre o 10° e 14° dpi. Período no qual, provavelmente, as rédias

estariam migrando na hemocele em direção à glândula digestiva dos moluscos, o que foi semelhante aos resultados de Rondelaud & Barthe (1980) em *L. truncatula* que observaram o aumento da reação hemocitária dos moluscos ao 14° dpi, nas regiões renopericardial e pós-esofágica dos moluscos infectados por *F. hepatica*. Entretanto, no presente estudo, não foram observadas reações de hemócitos de *L. columella* nas proximidades das rédias de *F. hepatica* ao 35° dpi, próximas à região do esôfago.

No 28° dpi no tecido conjuntivo do manto havia lacunas contendo rédias de *F. hepatica*, embora o tecido estivesse rompido, e não foi evidenciada a formação de camadas de hemócitos, como demonstrado ao 14° dpi. Tal achado ao 28° dpi contrapõe ao observado por Rondelaud & Barthe (1980) em *L. truncatula* infectados por *F. hepatica*, período em que houve maior intensidade das reações hemocitárias ao 28° dpi, na região cefalopodal dos moluscos.

A glândula digestiva de *L. columella* aos 55° dpi albergava rédias contendo cercárias, causando desorganização dos tecidos epitelial e conjuntivo dessa glândula. Humiczewka (2004) em infecções experimentais de *L. truncatula* por *F. hepatica*, observou que ao 20° dpi iniciava competição entre parasito e molusco, por reservas energéticas da glândula digestiva, que se intensificavam até 60° dpi promovendo a morte das células dessa glândula. No presente estudo ao 55° dpi as rédias de *F. hepatica* em desenvolvimento, causaram a desorganização dos tecidos da glândula digestiva de *L. columella* em intervalos de infecção semelhantes aos observados por Hodasi (1972b) da 3ª a 12ª spi de *L. truncatula* por *F. hepatica*; e pelos autores Sindou *et al.* (1991) em *L. glabra*, *Lymnaea palustris*, *Lymnaea peregra* e *L. stagnalis*

infectados por *F. hepatica*, do 30° ao 45° dpi. No presente estudo *L. columella* demonstrou-se susceptível à *F. hepatica*, uma vez que, foram observadas cercárias formadas na hemocele dos moluscos a partir 55° dpi, bem como, metacercárias aderidas aos recipientes onde os moluscos foram mantidos.

### **7.3 Hemócitos circulantes de *L. columella***

O presente estudo demonstrou que a população de *L. columella* proveniente de Confins-MG é susceptível à *F. hepatica*, tal fato induziu alterações no número médio de hemócitos totais circulante de *L. columella* em relação aos moluscos não infectados.

Aos 30 minutos após infecção houve redução de duas vezes (2,3x) no número médio total de hemócitos circulantes de *L. columella* em relação aos moluscos não infectados ( $p < 0.05$ ). No entanto, não foi verificado infiltrado celular marcante nas proximidades dos miracídios recém-penetrados nos moluscos. Entretanto, Van der Knaap *et al.* (1987) sugeriram que a diminuição do número de hemócitos circulantes de *L. stagnalis* teria associação direta com a mobilização de células aos locais de penetração dos miracídios, induzida por *Trichobilharzia ocellata*. Adema *et al.* (1994a) observaram que 30 minutos após interação “*in vitro*”, hemócitos de diferentes moluscos apresentavam padrões variados de reconhecimento de formas larvais de *Echinostoma paraensei*. Tal padrão pode ser associado com especificidades presentes nas interações entre moluscos-helminthos (Pereira *et al.*, 2008). Também se deve ressaltar que o sistema imune inato dos moluscos reconhece o parasito e os produtos excreto-secretados (ES), bem como o processo inflamatório induzido (Coustau *et al.* 2015).

No 1<sup>o</sup> dpi a população de hemócitos circulantes de *L. columella* voltou a níveis semelhantes ao observado nos moluscos não infectados, período em que ocorreu a perda das placas ciliares do miracídios de *F. hepatica* e a transformação em esporocistos. Pela histologia notou-se próximo aos esporocistos, infiltrado de células contendo grânulos intracitoplasmáticos. Os autores Van der Knaap *et al.* (1987) demonstraram em *L. stagnalis* infectados por *Trichobilharzia ocellata* o aumento do índice de fagocitose de bactérias e de eritrócitos de ovinos após 24 horas de infecção pelo trematódeo, e atribuíram a possibilidade da ativação dos hemócitos devido à soltura das placas ciliares dos miracídios, que seriam fagocitadas juntamente com restos celulares dos tecidos danificados do molusco, durante a penetração dos miracídios e o desenvolvimento dos esporocistos. Essa hipótese pode ser corroborada por Gourbal *et al.* (2008) que relataram por meio de estudos proteômicos com esporocistos de *F. hepatica* transformados *in vitro*, que após 24 horas, os ES podem interferir no reconhecimento dos hemócitos presentes na hemolinfa de molusco parasitado com o trematódeo.

No 7<sup>o</sup> dpi o número médio total de hemócitos circulantes se restabeleceu na hemolinfa, atingindo valores semelhantes aos dos moluscos não infectados e esporocistos foram observados próximos à rádula. De acordo com Humphreis & Yoshino (2003) a eliminação de parasitos metazoários, como de trematódeos por moluscos, estaria diretamente associada à formação de cápsulas multicelulares de hemócitos, em ação coordenada com fatores solúveis presentes na hemolinfa. Em *Biomphalaria* spp. resistentes a trematódeo, após a migração do hemócitos para as proximidades do esporocisto, ocorre o reconhecimento do tegumento e a liberação de produtos que realizam a

destruição e morte do parasito por citotocixidade (Pereira, 2009) fato não demonstrado nesse trabalho.

A partir do 10° dpi foram observadas rédias de *F. hepatica* em lacunas de tecido conjuntivo rompido da região cefalopodal, e ao 14° dpi na hemocele de *L. columella* de forma semelhante ao observado por Diawara *et al.* (2003) em *Galba truncatula* naturalmente infectadas por *F. hepatica*. Embora a quantidade de hemócitos totais circulantes no 10° dpi fosse semelhante ao observado no 7° e 0 dpi, a partir do 14° dpi o número médio de hemócitos circulantes reduziu 3 vezes na hemolinfa circulante, período em que as rédias migravam pela hemocele em direção à glândula digestiva do molusco.

Segundo Yoshino *et al.* (2001), durante o desenvolvimento intramolusco de trematódeos, a interface de interação entre o parasito e o hospedeiro intermediário seria um meio dinâmico, formado por membranas celulares e componentes não-celulares do molusco, e o tegumento do parasito. Esses autores relataram que em moluscos susceptíveis, o reconhecimento realizado pelos hemócitos ao tegumento dos esporocistos pode ser comprometido devido à liberação de ES pelo parasito, camuflando o reconhecimento do mesmo.

No 14° dpi, período em que as larvas de *F. hepatica* estavam diretamente expostas aos fatores solúveis da hemolinfa e aos hemócitos circulantes de *L. columella*, nenhum reconhecimento foi evidenciado, confirmando a susceptibilidade ao trematódeo. Loker *et al.* (1987) relataram a aproximação de hemócitos ao 15° dpi quando rédias de *E. paraensei* estavam presentes na região pericárdica de *B. glabrata* e o número de hemócitos na circulação foi maior que o do grupo de moluscos não infectados, contrapondo os resultados do presente trabalho, quando houve redução dos hemócitos

circulantes de *L. columella* durante a liberação das rédias de *F. hepatica*, o que pode estar relacionado a susceptibilidade da espécie de gastrópode, bem como, ao padrão diferente de desenvolvimento dos trematódeos.

No 45° dpi as rédias foram localizadas na região da glândula digestiva de *L. columella*, período em que ocorreu destruição dos tecidos da cavidade visceral, o que pode ter associação direta com o baixo número de hemócitos circulantes. Esse resultado pode ser explicado pelo trabalho de Gomes (1985) que demonstrou em *L. columella* infectado por *F. hepatica* a partir do 56° dpi lesões na glândula digestiva, como a obstrução de lóbulos e a formação de vacúolos nas células epiteliais, enquanto que no ovotestis, o autor observou a formação de núcleos picnóticos nos ovócitos, estando essas lesões associadas à presença de rédias e cercárias de *F. hepatica*.

Padrão diferenciado no reconhecimento de trematódeos tem sido apresentado por alguns autores. Loker & Adema (1995) observaram *in vitro* que os hemócitos de *B. glabrata* de diferentes linhagens aderiam rapidamente a esporocistos de *S. mansoni* e que, raramente havia a adesão dessas células sobre esporocistos e rédias de *E. paraensei*. Entretanto, após a fixação dos estágios larvais com glutaraldeído, os hemócitos passaram a aderir rapidamente às formas larvais do equinostomatídeo, sugerindo a liberação de ES ou a presença de inibidores de superfície por esporocistos e rédias vivas desse parasito, nocivas aos hemócitos.

Entretanto, no presente trabalho, a partir do 10° dpi foram observadas rédias de *F. hepatica* nos cortes histológicos e o número total de hemócitos circulantes na hemolinfa reduziu até o 45° dpi, voltando a aumentar no 50° dpi.

De acordo com Rondelaud *et al.* (2009) podem haver 3 ou 4 gerações de rédias de *F. hepatica* que ocorrem a partir do 7° dpi, em um mesmo espécime de *Galba truncatula*. A primeira geração de rédias produziria rédias filhas, que por sua vez originaria cercárias, o que caracteriza o desenvolvimento normal do parasito normal intramolusco, sem haver morte das rédias-mãe na primeira ou na segunda semana de infecção. Esses mesmos autores observaram que as rédias filhas poderiam ser liberadas pelas rédias mães no mesmo período em que as rédias mães, estariam emergindo tardiamente dos esporocistos. Tal fato pode explicar as diferenças morfológicas entre as rédias nos cortes histológicos e nas contagens de hemócitos circulantes de *L. columella* ao longo do curso da infecção por *F. hepatica* no presente trabalho, observadas entre o 10° dpi e o 50° dpi.

Ao contrário do observado nessa pesquisa, Van de Knaap *et al.* (1987) relataram, em *Lymnaea stagnalis* X *Trichobilharzia ocellata*, o aumento do número de hemócitos circulantes do 7° dpi ao 91° dpi. Os autores interpretaram que a proliferação dos hemócitos decorreu do recrutamento dessas células do tecido conjuntivo para a hemolinfa dos moluscos infectados. O mesmo não foi constatado *in vitro*, e esses autores sugeriram que a cinética hemocitária de moluscos infectados por trematódeos pode ser modulada dependendo das combinações entre parasito-hospedeiro e condições experimentais utilizadas.

Por outro lado, Amen *et al.* (1991) acompanharam o desenvolvimento de *Trichobilharzia ocellata* em *Lymnaea stagnalis* por meio da histologia dos moluscos nos intervalos 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> spi e pela contagem de hemócitos nos intervalos 0, 14°, 28°, 42° e 56° dpi. Houve aumento do número de hemócitos durante o desenvolvimento do parasito sob a forma de esporocistos mães no

14° dpi, em migração da região cefalopodal à região da glândula digestiva no 28° dpi, quando o número de hemócitos na circulação reduziu. O aumento no número de hemócitos também ocorreu entre o 42° e 56° dpi, intervalo em que foram observados esporocistos filhos e a liberação de cercárias. No 56° dpi, o número de hemócitos circulantes mostrou-se mais alto. Nesse trabalho aos 10°, 14°, 21° e 28° dpi foi observado rédias nos tecidos e em migração pela hemocele do molusco, embora os níveis médios de hemócitos circulantes apresentassem a mesma tendência ao observado no 10° dpi, com cerca da metade dos níveis quantificados para moluscos não infectados. Tal resultado sugere oscilações de hemócitos circulantes no período de ocorrência das rédias de *F. hepatica* em *L. columella*.

O procedimento de coleta de hemolinfa de *L. columella* padronizado nesse trabalho foi satisfatório, uma vez que, ao longo do experimento os hemócitos recuperados apresentaram viabilidade próxima de 90%. No entanto, em alguns períodos avaliados o número médio de células mortas de *L. columella* apresentou-se elevado como nos intervalos de 30 minutos após infecção, 1° e 7° dpi, oscilando entre 16 e 19%. Embora não tenha sido avaliado o processo de alteração da viabilidade dos hemócitos de *L. columella* durante o desenvolvimento de *F. hepatica* por ES, estudos precisam ser realizados para melhor compreensão de tais variações, já que os resultados após a realização de cinco repetições independentes o padrão de mortalidade se manteve, indicando essa possibilidade.

#### **7.4 Curva de sobrevivência de *L. columella* infectada por *F. hepatica***

No grupo infectado o padrão de mortalidade foi crescente a partir da 2ª spi quando comparado ao grupo não infectado, o que pode ser explicado pelo surgimento das rédias a partir da 2ª spi, que apresentavam faringe formada e ceco desenvolvido, e segundo Hodasi (1972b) tais formas parasitárias destroem os tecidos do molusco tanto no processo de migração ativa, quanto no de digestão dos tecidos das regiões do manto, cefalopodal e da glândula digestiva, levando à morte do molusco.

## 8. CONCLUSÕES

- A população de *L. columella* de Confins - MG varia, e é influenciada pelo fatore climático de precipitação pluvial;
- *L. columella* de Confins - MG criado em laboratório é susceptível à infecção por *F. hepatica* e o período pré-patente intramolusco é de aproximadamente 50 dias;
- A histologia é um bom método para estudar o o desenvolvimento intramolusco de miracídios, esporocistos e rédias de *F. hepatica* em *L. columella* da penetração dos miracídios à formação de cercárias;
- A contagem total e a viabilidade dos hemócitos oscilam durante o desenvolvimento de *F. hepatica*;
- O número de *L. columella* mortos infectados por *F. hepatica* aumenta a partir da 2<sup>a</sup> semana após infecção.

## REFERÊNCIAS

Abílio FJP, Watanabe T 1998. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, para o Estado da Paraíba, Brasil. *Rev Saude Publ* 32:184-185.

Abílio FJP, Fonseca-Gessner AA, Leite RL, Ruffo TLDM 2006. Gastrópodes e outros invertebrados do sedimento e associados à macrófita *Eichhornia crassipes* de um açude hipertrófico do semi-árido paraibano. *BioTerra* 1:165-178.

Acha PN, Szyfres B 1977. *Zoonoses y Enfermedades Transmisibles comunes al Hombre y los Animales*. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud. 3th ed. 69 pp.

Adema CM, Arguello DF, Stricker SA, Loker, ES 1994a. A time lapse, Study of interactions between *Echinostoma paraensei* intramolluscan larval stages and adherent hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Helix aspersa*. *J Parasitol* 80: 719-727.

Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 8691-8696.

Adema CM, Loker ES 2015. Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. *Dev Comp Immunol* 48: 275-283.

Alves CBM, Pompeu PS 2005. Historical changes in the Rio das Velhas fish fauna-Brazil. *Americ Fish Soc Symp* 45: 587-602.

Amato SB, De Rezende HE, Gomes DC, Da Serra Freire NM 1986. Epidemiology of *Fasciola hepatica* infection in the Paraíba river valley, São Paulo, Brasil. *Vet Parasitol* 22: 275-284.

Alcaíno H, & Apt W 1989. Algunos antecedentes sobre la fascioliasis animal y humana. *Monografías de Medicina Veterinaria*: 11(1).

Amen RI, Tijnagel JM, van der Knaap WP, Meuleman EA, de Lange-de Klerk ES, Sminia T 1991. Effects of *Trichobilharzia ocellata* on hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Dev Comp Immunol* 15: 105-115.

Amen RI, Aten JA, Baggen JM, Meuleman EA, de Lange-de Klerk ES, Sminia T 1992. *Trichobilharzia ocellata* in *Lymnaea stagnalis*: a flow cytometric approach to study its effects on hemocytes. *J Invertebr Pathol* 59: 95-98.

Andrews SJ 2005. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Dalton, JP 1999. Fasciolosis. Ontario: *CABI Publishing* 1: 1-29.

Angel-VillaVicencio A, Vasconcellos MC 2005. First report of *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 735-737.

Araújo JLDB, Garcia CA, Linhares, GFC 1995. Ocorrência de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda, Fasciolidae), no Estado de Goiás. *Rev Pat Trop* 24: 283 - 289.

Araújo JLDB, Linhares GFC, Oliveira APM, Amoril JG, Freitas MR, Costa IC, Pinheiro VJL, Esselin IRR, Reis AS 2007. Bovine autochthonous infection by *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Fasciolidae) in the State of Goiás, Brazil. *Rev Patol Trop* 36: 96-100.

Ashrafi K, Bargues MD, O'Neill S, Mas-Coma S 2014. Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel Med Infect Dis* 12: 636-649.

Bargues MD, Artigas P, Mera Y Sierra RL, Pointier JP, Mas-Coma S 2007. Characterization of *Lymnaea cubensis*, *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea*

*neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Ann Trop Med Parasit* 01: 621-641.

Bellato, V, de Souza AP, Sartor AA., Veiga L PHN, Centenaro F 2009. Ocorrência de *Fasciola hepatica* na população de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e em bovinos (*Bos taurus*) no município de Timbó, SC. *Rev Ciênc Agrov* 8: 66-70.

Bennema SC, Scholte RGC, Molento MB, MedeirosC, Carvalho, ODS 2014. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 56: 35-41.

Bernardo CDC, Carneiro MB, Avelar, BRD, Donatele DM, Martins IVF, Pereira MJS 2011. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. *Rev Bras Parasitol Vet* 20: 49-53.

Boray JC 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv Parasitol* 7: 95-210.

Boray JC, & Murray G 1999. *Liver fluke disease in sheep and cattle*. NSW Agriculture.

Boray JC 2007. Liver fluke disease in sheep and cattle. *Primefact* 446:1-10.

Caldas WS, Lima WS, Cury MC, Malacco MAF, Silva RS 1995. Prevalência de *Fasciola hepatica* em bovinos de algumas mesorregiões do Estado de Minas Gerais. In: *Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária* 9: 140.

Carvalho JCM 1940. Contribuição para o conhecimento da fauna helmintológica de Minas Gerais. *Ceres* 1: 411-23.

Cheng W, Juang FM, Chen JC 2004. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor* supertexta and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish Shellfish Immunol* 16: 295-306.

Coelho LHL, Lima WS 2003. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the state of Minas Gerais, Brazil. *J. Helminthol* 77: 7-10.

Coelho LHL 2007. *Lymnaea columella*: dinâmica de populações em Itajubá, MG e suscetibilidade à infecção por *Fasciola hepatica* em associações simpátricas e alopátricas entre parasito e hospedeiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 112pp.

Coelho L, Lima W, Guimarães M 2009. Sympatric and allopatric combinations of *Lymnaea columella* and *Fasciola hepatica* from southern and south-eastern Brazil. *J Helminthol* 83: 285-288.

Cordova M, Nopo H, Bellatin J, Naquira C, Guerra H, Espinosa JR 1997. *Fasciola hepatica* cysteine proteases: immunodominant antigens in human fasciolosis. *Am J Trop Med Hyg* 57: 660-666.

Cruz-Mendoza I, Quiroz-Romero H, Correa D, Gómez-Espinoza G 2010. Transmission dynamics of *Fasciola hepatica* in the Plateau Region of Mexico. Effect of weather and treatment of mammals under current farm management. *Vet Parasitol* 10: 73-79.

Cunha FOVD, Marques SMT, Mattos MJTD 2007. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. *Parasitol latino Am* 64: 188-191.

Coustau C, Gourbal, B, Duval D, Yoshino TP, Adema CM, Mitta G. 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish shellfish immun* 46: 5-16.

Dacal ARC, Costa HMDA, Leite ACR 1988. Suceptibilidade de *Lymnaea* (*Pseudosuccinea*) *columella* (Say, 1817) expostos à infecção por miracídios de *Fasciola* (Linneaus, 1758). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 30: 361-369.

Dar Y, Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G 2015. Role of the lymnaeid snail *Pseudosuccinea columella* in the transmission of the liver fluke *Fasciola hepatica* in Egypt. *J Helminthol* 89: 1-8.

Dawes B 1960. A study of the miracidium of *Fasciola hepatica* and an account of the mode of penetration of the sporocyst into *Lymnaea truncatula*. In: *Libro Homenaje al Dr. Eduardo Caballero y Caballero, Jubileo 1930-1960*. pp 95-111.

Diawara M, Ayadi A, Rondelaud D 2003. *Fasciola hepatica*: the development of tissue lesions and their frequencies in naturally-infected *Galba truncatula*. *Parasitol Res* 90: 257-260.

Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S 2009. Emerging food-borne parasites. *Vet Parasitol* 163: 196-206.

Dracz RM, Lima WDS 2014. Autochthonous infection of buffaloes and cattle by *Fasciola hepatica* in Minas Gerais, Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 23: 413-416.

Dracz RM, Ribeiro VMA, Pereira CAJ, SL Walter. Occurrence of *Fasciola hepatica* in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Minas Gerais, Brazil. No prelo 2016.

Dreyfuss GD, Rondelaud D, Varelle-Morel C 1999. Oviposition of *Lymnaea truncatula* infected by *Fasciola hepatica* under experimental conditions. *Parasitol Res* 85: 589-593.

Esteves FA 1998. *Fundamentos de limnologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: *Interciência*, 602pp.

França I 1969. *Fasciola hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba. *Boletim do Campo* 230: 21-22.

Fairweather I, Threadgold LT, Hanna REB 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton JP 1999. Fasciolosis. *CAB International Publishing, Wallingford*. pp.47-111.

Giraldo E, Álvarez L 2013. Estudio de las plantas hospederas de *Lymnaea columella* Say, 1817, asociadas a humedales de un área endémica en *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de la región central de la cordillera central colombiana. *REDVET* 14: 1-8.

Girão ES, Ueno H 1985a. Diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose de ruminantes no Rio Grande do Sul. *Pesq Agropec Bras* 20: 461-466.

Girão ES, Ueno H 1985b. Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesq Agropec Bras* 20: 905-912.

Gomes DC 1985. Interrelação entre *Fasciola hepatica* L., 1758 e *Lymnaea columella* Say, 1817: susceptibilidade e patogenia. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 73pp.

Gomes FF, Oliveira FCR, Pile EA, Lopes CWG 2002. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 11: 53-56.

Gourbal BE, Guillou F, Mitta G, Sibille P, Thèron A, Pointier JP, Coustau C 2008. Excretory-secretory products of larval *Fasciola hepatica* investigated using a two-dimensional proteomic approach. *Mol Biochem Parasitol* 161: 63-66.

Gordy, M. A., Pila, E. A., & Hanington, P. C. (2015). The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. *Fish Shellfish Immune* 46: 39-49.

Gourdon I, Guerin MC, Torreilles J, Roch P 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide Society* 5: 1-6.

Gutiérrez A, Pointier JP, Yong M, Sánchez J, Théron A. (2003). Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. *Parasitol res* 90: 129-134.

Gutiérrez A, Vázquez AA, Hevia Y, Sánchez J, Correa AC, Hurtrez-Boussès S, Pointier JP, Théron A 2011. First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. *J Helminthol* 85: 109-111.

Hodasi JKM 1972a. The output of cercariae of *Fasciola hepatica* by *Lymnaea truncatula* and the distribution of metacercariae on grass. *Parasitology* 64: 53-60.

Hodasi JKM 1972b. The effects of *Fasciola hepatica* on *Lymnaea truncatula*. *Parasitology* 65: 359-369.

Honer MR 1979. Aspectos da epidemiologia da fasciolose In: *Seminário Nacional Sobre Parasitoses de Bovinos* 1: 386.

Humiczewska M, Rajski K 2005. Lipids in the host-parasite system: Digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected with the developmental stages of *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitol* 50: 235-239.

Humphries JE, Yoshino TP 2003. Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: connections with the innate immune system of vertebrates. *Integr Comp Biol* 43, 305-312.

Kendall SB 1965. Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan Hosts. *Adv Parasitol* 3: 59-98.

Kleiman F, Pietrokovsky S, Prepelitchi L, Carbajo AE, Wisnivesky-Colli C 2007. Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. *Vet Parasitol* 145: 274-286.

Knight M, Arican-Goktas HD, Ittiprasert W, Odoemelam EC, Miller AN, Bridger, JM 2014. Schistosomes and snails: a molecular encounter. *Frontiers in genetics*, 5.

Knubben-Schweizer G, & Torgerson, PR 2015. Bovine fasciolosis: Control strategies based on the location of *Galba truncatula* habitats on farms. *Vet Parasitol* 208: 77-83.

Kruse M, Gamulin V, Cetkovic H, Pancer Z, Muller IM, Muller WEG 1996. Molecular evolution of the metazoan protein kinase C multigene family. *J Mol Evol* 43: 374-383.

Lacchini AH, Davies AJ, Mackintosh D, Walker AJ 2006.  $\beta$ -1, 3-glucan modulates PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* defence cells: a role for PKC in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and downstream ERK activation. *J exp biol* 209: 4829-4840.

Larrea CH, Florez M, Vivar R, Huamán P, Velásquez J 2007. Hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en el Perú. *Rev Horiz Med* 7: 39-46.

Leal CG, Junqueira NT, Pompeu PS 2011. Morphology and habitat use by fishes of the Rio das Velhas basin in southeastern Brazil. *Environ Biol Fishes* 90: 143-157.

Lee CG, Cho SH, Lee CY 1995. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 58: 313-318.

Lima WDS, Soares LRM, Barçante TA, Guimaraes MP, Barçante JMDP 2009. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 27-30.

Loker ES, Bayne CJ 1982. In vitro encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. *Am J Trop Med Hyg* 31: 999-1005.

Lockyer AE, Jones C, Noble LR, Rollinson D 2004. Trematodes and snails: An intimate association. *Can J Zool* 82: 251-269.

López LP, Romero J, Velásquez LE 2008. Aislamiento de Paramphistomidae en vacas de leche y en el hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula* y *Lymnaea columella*) en una granja del trópico alto en el occidente de Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 21: 9-18.

Lutz A 1921. Sobre a ocorrência de *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 9-13.

Malek EA 1985. Snail Hosts of Schistosomiasis and Other Snail-Transmitted Diseases in Tropical America: A Manual. *Pan American Health Organization, Washington, DC*. 325 pp.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa D 2003. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitol Res* 91:500-507.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Coelho PMZ, Martins-Filho OA, Negrão-Corrêa D 2009. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from

*Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology*, 136: 67-76.

Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD 2009. Fasciola, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Adv Parasitol* 69: 41-146.

Mattos MJT, Ueno H, Gonçalves PC, Almeida JEM 1997. Seasonal occurrence and bioecology of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Lymnaeidae) in its natural habitat in Rio Grande do Sul. *Rev Brasil Med Vet* 19: 248 - 52.

Maure EAP, Bustamante M, Serra-Freire NM, Gomes DC 1998. Dinâmica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Braz. J Vet Res Anim Sci* 35: 151-155.

Medeiros C, Scholte RGC, D'ávila S, Caldeira RL, Carvalho ODS 2014. Spatial distribution of Lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) in Brazil. *Rev Inst Med trop São Paulo* 56: 235-252.

Mello CD, Silva AD 2009. Modelagem estatística da precipitação mensal e anual e no período seco para o estado de Minas Gerais. *R Bras Eng Agric Ambiental* 13: 68-74.

Mendes EA, Lima WS, de Melo AL 2008. Desenvolvimento de *Fasciola hepatica* em *Lymnaea columella* infectado com miracidios derivado de bovinos e infecções sagui. *J Helminthol* 82: 81-84.

Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S, Durand P, Bargues MD, Mas-Coma S 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Mol Ecol* 10:1333-40.

Meyer KEB, Büchl A, Karfunkel J 2010. Palinofácies e evolução quaternária do ribeirão da Mata, município de Vespasiano, MG, Brasil. *Rev Bras Paleontol* 13: 41-48.

Molina-Hernández V, Mulcahy G, Pérez J, Martínez-Moreno Á, Donnelly S, O'Neill, S. M., JP Dalton, Cwiklinski K 2015. *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet.Parasitol* 208: 101-111.

Monick MM, Carter AB, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW 2000. Protein kinase C f plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J Immunol* 165: 4632-4639.

Mounkassa JB, Jourdane J 1990. Dynamics of the leukocytic response of *Biomphalaria glabrata* during the larval development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma liei*. *J Invertebr Pathol* 55: 306-311.

Oliveira S, Fujii T, Filha E, Martins AMCRPF 2002. Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol São Paulo* 69: 29-37.

Oliveira AA, Nascimento ADS, Santos TAM 2007. Prevalence survey and factors associated with fascioliasis in the Municipality of Canutama, State of Amazon, Brazil. *Epidemiol Serv Saude* 16: 251-259.

Pan CT 1958. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. *Bull Mus Comp Zool* 119: 237-299.

Paraense WL 1982. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the Neotropical region: a distributional outline. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 77: 181-188.

Paraense, WL 1982. *Lymnaea rupestris* sp. n. from southern Brazil (Pulmonata: Lymnaeidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 77: 437-443.

Paraense WL. *Lymnaea columella* in northern Brazil 1983. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 477-482.

Pêcego O 1925. Fiscalização sanitária de carnes e derivados. Estatística de verificação e apreensões e a sua importância. *Rev Soc Bras Med Vet* 2: 375 - 389.

Pereira CAJ 2009. Caracterização da atividade de moléculas solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila* Taim envolvidos na morte dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* cultivados *in vitro*. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Minas Gerais. 198 pp.

Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Corrêa JA., Coelho PMZ., Negrão-Corrêa D 2008. Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Parasite Immunol* 30: 610-619.

Pile EDS, Gazeta G, Santos JAA, Coelho B, Serra-Freire NM 2000. Ocorrência de fascioliasis humana no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. *Rev Saude Publ* 34: 413-414.

Pile EDS, JAA, Pastorello, T, Vasconcellos M 2001. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá. *Braz J Vet Res Anim Sci* 38: 42-43.

Pinheiro MMG, Baptista MB 1998. Análise regional de freqüência e distribuição temporal das tempestades na Região Metropolitana de Belo Horizonte - RMBH. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* 3: 73-88.

Plesh Â, Janse Ñ, Boer H 1975. Gross Morphology and Hystology of the Freshwater Pulmonate *Lymnaea stagnalis*. *Neth J Zool* 25: 332-352.

Plows LD, Cook, RT, Davies, AJ, Walker AJ. (2005). Carbohydrates that mimic schistosome surface coat components affect ERK and PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Int j parasitol* 35: 293-302.

Pointier JP, Noya O, Amarista M, Théron A 2004. *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae): first record for Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 567-569.

Pointier JP, Noya O, Alarcon de Noya B, Theron A 2009. Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 790-796.

Prepelitchi L, Kleiman F, Pietrokovsky SM, Moriena RA, Racioppi O, Alvarez J, Wisnivesky-Colli C 2003. First report of *Lymnaea columella* say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 889-891.

Prévéraud-Sindou M, Rondelaud D 1990. *Fasciola hepatica* L.: données expérimentales sur l'attraction des miracidiums par *Lymnaea truncatula* et des Mollusques de familles voisines. *Bull Soc Franc Parasitol* 8: 277-282.

Prévéraud-Sindou M, Dreyfuss G, Rondelaud D 1994. Comparison of the migrations of *Fasciola hepatica* sporocysts in *Lymnaea truncatula* and other related snail families. *Parasitol Res* 80: 342-345.

Prévéraud-Sindou M, Rondelaud D 1995. Localization and outcome of *Fasciola hepatica* sporocysts in *Lymnaea truncatula* subjected to mono-or plurimiracidial exposure. *Parasitol Res* 81: 265-267.

Queiroz VS, Luz E, Leite LC, Círio SM 2002. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). *Acta Biol Par* 31: 99-111.

Rondelaud D, Barthe D 1980. Etude descriptive d'une réaction amibocytaire chez *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. *Z Parasitenkd* 61: 187-196.

Rondelaud D, Belfaiza M, Vignoles P, Moncef M, Dreyfuss G 2009. Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. *J Helminthol* 83: 245-254.

Rondelaud D, Hourdin P, Vignoles P, Dreyfuss G, Cabaret J. 2011. The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. *Vet Parasitol* 181: 166-173.

Saint-Guillain M 1968. Etude histologique des premiers stades évolutifs de *Fasciola hepatica*. L. L. *Acta Zool Pathol Antverp* 46: 77-132.

Salazar L, Estrada VE, Velásquez LE 2006. Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Exp Parasitol* 114: 77-83.

Sapp KK, Loker ES 2000 a. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. *J Parasitol* 86: 1020-1029.

Sapp KK, Loker ES 2000 b. Mechanisms underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. *J Parasitol* 86: 1012-1019.

Serra-Freire NM, Nuernberg S 1992. Dispersão Geopolítica da Ocorrência de *Fasciola hepatica* no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 263-269.

Serra-Freire NM, Bordin EL, Lessa CSS, Scherer PO, Farias MT, Malacco MA, Corrêa TC, Tschumi JA 1995. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. *A Hora Veterinária* 1: 19-21.

Sick H 1997. *Introdução a Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira 3 ed., 912pp.

Silva OMC 1936. *Parasitoses animais*. Rio de Janeiro: Correio da Manhã, pp.13.

Silva RE, Lima WS, Caldas WS, Cury MC, Malacco AF 1995. Primeiro encontro de *Lymnaea columella* (Say, 1817) naturalmente infectada por estádios intermediários de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) na cidade de Itajubá, MG. In.: *XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia* p.205.

Sminia T 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 130: 497-526.

Sminia T, Van Der Knaap WPW 1987. Cells and molecules in molluscan immunity. *Dev Comp Immunol* 11: 17-28.

Sindou MP, Cabaret JRondelaud D 1991. Survival of snails and characteristic lesions of *Fasciola hepatica* infection in four European species of *Lymnaea*. *Vet Parasitol* 40: 47-58.

Tagle I 1943. Observaciones sobre la evolución de la *Fasciola hepatica* (L. 1758). Comprobación del huésped intermediario en Chile. *Rev Chille Hist Nat* 46/47: 232-241.

Tepper JBLF 2000. Resposta tissular em infecções por *Fasciola hepatica* em *Lymnaea viatrix*. Epidemiologia da fasciolose no gado bovino da provincia de valdivia, Chile. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 76pp.

Thomas AP 1883. Memoirs: The Life History of the Liver-Fluke (*Fasciola hepatica*). *Q J Microsc Sci* 2: 99-133.

Tostes RA, Santarém VA, Alberti H, Sanches ODC 2004. Autochthonous cases of *Fasciola hepatica* in Presidente Prudente region, São Paulo State, Brazil. *Ciência Rural* 34: 961-962.

Ueno H, Arandia R, Morales G, Medina G 1975. Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the altiplano region of Bolivia. *Nat Inst Anim Health Q* 15: 61-67.

Ueta MT 1980a. Infecção experimental de *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica*. *Ver Saude Publ* 14: 43-57.

Ueta MT 1980b. Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no Vale do Paraíba, SP, Brasil. *Rev Saude Publ* 14: 230-233.

Van der Knaap WPW 1981. Recognition of foreignness in the internal defense system of the freshwater gastropod, *Lymnaea stagnalis*. *Dev Comp Immunol* 1: 91-97.

Van der Knaap WPW, Meuleman EA, Sminia T 1987. Alterations in the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitol Res* 73: 57-65.

Van der Knaap WPW, Adema CM, Sminia T 1993. Invertebrate blood cells - morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp Hematol Int* 3: 20-26.

Vázquez AA, Sánchez J, Pointier JP, Théron A, Hurtrez-Boussès S 2014. *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *J helminthol* 88: 434-440.

Vidigal THDA, Marques M, Lima HP, Barbosa FA 2005. Gastrópodes e bivalves límnicos do trecho médio da bacia do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 6: 67-76.

Walker AJ, Plows LD 2003. Bacterial lipopolysaccharide modulates protein kinase C signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Biol Cell* 95: 527-533.

Yoshino TP, Vasta, GR. 1996. Parasite-invertebrate host immune interactions. *In: Invertebrate Immune Responses* (pp. 125-167). Springer Berlin Heidelberg.

Yoshino TP, Boyle JP, Humphries JE 2001. Receptor–ligand interactions and cellular signalling at the host–parasite interface. *Parasitology*, 123: 143-157.

Yoshino TP, Wu XJ, Gonzalez LA, Hokke CH 2013. Circulating *Biomphalaria glabrata* hemocyte subpopulations possess shared schistosome glycans and receptors capable of binding larval glycoconjugates. *Exp Parasitol* 133: 28-36.

Zhang SM, Léonard PM, Adema CM, Loker ES. 2001. Parasite - responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics*, 53: 684-694.

Zoneamento Ambiental da APA 1998. Carste de Lagoa Santa - MG. Sousa HA (coordenador). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais. ISBN - 85-7300-056-2. 62 pp.