

FERNANDO SÉRGIO BARBOSA

ASPECTOS DA BIOLOGIA DE *Zygocotyle lunata* (TREMATODA:  
ZYGOCOTYLIDAE) ISOLADO DE *Biomphalaria straminea*  
(MOLLUSCA: PLANORBIDAE) ORIUNDAS DE IGUATAMA,  
MINAS GERAIS, BRASIL

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte

2011

FERNANDO SÉRGIO BARBOSA

ASPECTOS DA BIOLOGIA DE *Zygocotyle lunata* (TREMATODA:  
ZYGOCOTYLIDAE) ISOLADO DE *Biomphalaria straminea*  
(MOLLUSCA: PLANORBIDAE) ORIUNDAS DE IGUATAMA,  
MINAS GERAIS, BRASIL

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

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Prof. Dr. Alan Lane de Melo

Belo Horizonte

2011

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

*Aos meus pais*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Alan Lane de Melo pela oportunidade, formação científica e disponibilidade para a realização deste estudo.

Aos grandes amigos Daniel Terra Santos e Everton Almeida Santos (*in memoriam*) agradeço a incomparável oportunidade de ter conhecido vocês. Dos inúmeros aprendizados que levo estou certo que os mais valiosos foram com vocês, que me mostraram a simplicidade da vida.

Ao Sr. Airton Lobo pela amizade, companheirismo, disposição e ajuda no preparo das lâminas utilizadas neste estudo.

Ao amigo Hudson Alves Pinto, pela disponibilidade, auxílio em alguns experimentos e discussões científicas compartilhada durante minha permanência no laboratório.

Ao amigo Sandro Eugênio Pereira Gazzinelli, pelas opiniões sinceras e pelos momentos de descontração.

Ao amigo Gustavo José Caldas Vianna, pelas conversas agradáveis em momentos difíceis.

A Dra. Wanderlany Amâncio Martins, pela dedicação, companheirismo, ajuda no laboratório e momentos de alegria.

Ao amigo Higor Daniel Duarte Rodrigues, pelos momentos agradáveis e disponibilidade.

Ao amigo Vítor Luís Tenório Mati, pelas opiniões e alegres conversas em momentos de descontrações.

Ao amigo Marco Antônio Andrade de Souza pela amizade, dedicação e incentivo.

Aos amigos do curso de Pós Graduação pelos inigualáveis momentos de descontração, que nossa cooperação e amizade se prolonguem por muitos anos.

Aos amigos de Laboratório de Esquistossomose, José Carlos dos Reis, Cyntia Aparecida de Jesus, Florence Mara Rosa, Zenir de Souza, Emília Araujo, Selma Fernandes de Souza, Alberto Geraldo dos Santos pela atenção e carinho durante o período que permaneci no laboratório.

A grande amiga Sumara Aparecida Guilherme Ferreira, pelo carinho, amizade e disponibilidade em resolver problemas a qualquer momento.

Aos professores do curso de Pós Graduação que contribuíram pelo meu aprendizado e formação.

Aos amigos de Iguatama que de alguma forma incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia e as memoráveis tardes de quarta-feira no futebol.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa de seu atual coordenador Professor Dr. Marcos Horácio Pereira pela oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Carlos Humberto pelo companheirismo e amizade.

Ao amigo Ivaner Oliveira pela amizade sincera desde a infância.

As pessoas que mais me apoiaram durante toda esta caminhada, minha mãe, Lina Maria Nogueira Barbosa; pai, José Barbosa; irmãos, José Barbosa Júnior, Jeferson Alcântara Barbosa, Denise Cristina Nogueira Barbosa e Daniele Alcântara Barbosa; minhas sobrinhas, Bruna Alcântara e Júlia Alcântara; minha afilhada, Isabela Barbosa; meus cunhados Rodrigo Lopes e Marcelo Ribeiro; minha cunhada Daniela Faria. A toda minha família, que mesmo eu estando ausente em vários momentos, sempre me deram força e estímulo.

A Mariana Teixeira de Faria pelo amor, carinho, paciência e que em muitas vezes me auxiliou em algumas coletas malacológicas, ficando sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e aconselhando.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na execução e conclusão desta etapa, muito obrigado.

## RESUMO

Coletas malacológicas foram realizadas em lagoas localizadas próximas ao rio São Francisco ou de seus afluentes em Iguatama, Minas Gerais, no quarto trimestre de 2009, segundo e terceiro trimestres de 2010. De 4.993 exemplares de moluscos coletados, 4.307 estavam vivos e foram analisados. Destes 71 exemplares (1,65%) apresentavam-se infectados por larvas de trematódeos que, após caracterização morfológica preliminar, foram identificadas como cercárias do tipo Equinostoma, Anfistoma e Estrigeocercária. Estágios evolutivos (cercárias, metacercárias, parasitos adultos, ovos e miracídios) foram estudados a fresco e após processo de fixação, coloração e montagem em lâminas permanentes seguida de análise morfológica e morfométrica em microscópio de luz. Cercárias do tipo Anfistoma foram encontradas em 14 exemplares (0,33%) de *Biomphalaria straminea*, que após formação de metacercária em substrato sólido foram utilizadas para verificação de viabilidade em infecções experimentais de *Mus musculus* da linhagem AKR/J, *Gallus gallus domesticus* e *Meriones unguiculatus*.

A viabilidade de metacercárias encistadas a 1, 30, 120 foi verificada, entretanto, as de 150 dias não lograram infecção. Os animais experimentalmente infectados que apresentaram ovos do parasito nas fezes a partir de 30 dias após a infecção, foram utilizados para obtenção de miracídios para infecções de moluscos. A eclosão de miracídios ocorreu em 21 dias de incubação. Parasitos adultos recuperados na região do ceco nos animais experimentalmente infectados foram analisados, medidos e identificados como *Zygotocyle lunata* (Diesing, 1836). Avaliou-se ainda o efeito da dexametasona no curso da infecção experimental em *Mus musculus*, verificando-se em animais tratados uma diminuição do período pré-patente e maior quantidade de parasitos recuperados, porém de menor tamanho. Descendentes dos moluscos coletados em Iguatama (*B. straminea*, *Physa marmorata*, *Pomacea caniculata*, *Drepanotrema anatinum*), Belo Horizonte, MG (*B. glabrata*), Felixlândia, MG e Recife, PE (*B. straminea*) foram expostos à miracídios de *Z. lunata*, tendo sido verificadas positivamente somente em *B. straminea*. Este é o primeiro registro de *B. straminea* naturalmente infectado por *Z. lunata* no Brasil.

Palavras chave: *Biomphalaria straminea*, trematódeos, *Zygotocyle lunata*, infecções experimentais, Iguatama.

## ABSTRACT

Malacological collections were carried out in lakes near the São Francisco River or its tributaries in Iguatama (Minas Gerais), in the last trimester of 2009, and second and third trimester of 2010. From 4993 mollusks samples collected, 4307 were alive and forwarded to analysis. From the alive ones, 71 samples (1.65%) were infected by trematodes larvae that, after preliminary morphological characterization, were used for experimental biological studies. Life stages (cercariae, metacercariae, adult parasites, eggs and miracidia) were studied before and after undergoing the process of fixation, staining and mounting on permanent slides, followed by morphological and morphometric analysis with light microscopy. Anfishoma-like cercariae were found in 14 specimens (0,33%) of *Biomphalaria straminea* which, after turning into metacercaria on solid substrate, were used to check viability in performing experimental infections in AKR/J mice, *Gallus gallus domesticus* and *Meriones unguiculatus*.

Viability of metacercaria that encisted in 1, 30 and 120 days was checked; however, those of 150 days could not infect. Animals experimentally infected presented parasite eggs in stools from 30 days post-infection that were used to obtain miracidia for infections of mollusks. The hatching of miracidia happened 21 days after infection. Adult parasites retrieved from the cecum region of experimentally infected animals were analyzed, measured and identified as *Zygodontia limicola* (Diesing, 1836). Effects of dexamethasone treatment during the course of experimental infection of *Mus musculus* were also evaluated. It was verified in animals treated with dexamethasone a reduction of the prepatent period and a higher number of parasites, although with smaller size. Descendants of mollusks collected in Iguatama (*B. straminea*, *Physa marmorata*, *Pomacea canaliculata*, *Drepanotrema anatinum*), Belo Horizonte, MG (*B. glabrata*), Felixlândia, MG and Recife, PE (*B. straminea*) were exposed to massive and individual infection with miracidia of *Z. limicola*, and success was obtained only in *B. straminea*. This is the first record of *B. straminea* naturally infected by *Z. limicola* in Brazil.

Keywords: *Biomphalaria straminea*, trematodes, *Zygodontia limicola*, experimental infections, Iguatama.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Be: Bulbo esofagiano  
C: Comprimento  
Ce: Cecos intestinais  
Co: Corpo  
d: Diâmetro  
Di: Divertículos  
EUA: Estados Unidos da América  
Es: Esôfago  
Fa: Faringe  
Gv: Glândulas vitelínicas  
ICE: Índice Cercárico Específico  
ICG: Índice Cercárico Global  
L: Largura  
N: Número  
O: Ovos  
Ov: Ovário  
P: Papilas  
Pg: Poro genital  
Ta: Testículo anterior  
Tp: Testículo posterior  
Ut: Útero  
Vv: Ventosa ventral

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Vista parcial de Iguatama, MG.....	21
FIGURA 2- Pontos de coleta de moluscos em Iguatama, MG: (a) Fazenda Tapada I (Ponto 1) 20° 15' 12,9" S, 45° 46' 53,8" W (b) Fazenda Ribeirão dos Patos (Ponto 2) 20° 14' 36,6" S, 45° 51' 17,7" W (c) Fazenda Tapada II (Ponto 3) 20° 15' 12,9" S, 45° 46' 53,8" W (d) Fazenda Pedrinha (Ponto 4) 20° 17' 77,3" S, 45° 42' 59,2" W.....	23
FIGURA 3- Cercárias oriundas de Iguatama (a) Anfistoma emergida de <i>B. straminea</i> . Larva a fresco (b) Equinostoma emergida de <i>B. schrammi</i> coradas pelo carmim aceto-alúmem (c) Estrigeocercária emergida de <i>Physa marmorata</i> corada pelo carmim aceto-alúmem.....	38
FIGURA 4- Metacercárias obtidas a partir de larvas do tipo Anfistoma emergidas de <i>Biomphalaria straminea</i> , naturalmente infectados, coletados em Iguatama, Minas Gerais. (a) metacercária (b) conjunto de metacercárias.....	39
FIGURA 5- Parasito adulto recuperado em infecções experimentais em <i>Mus musculus</i> 35 dias após a infecção por metacercária obtidos por cercárias do tipo Anfistoma emergidas de <i>Biomphalaria straminea</i> . Desenho em câmara clara.....	41
FIGURA 6- Parasito adulto recuperado em infecções experimentais em <i>Mus musculus</i> 35 dias após a infecção por metacercárias obtidas por cercárias do tipo Anfistoma emergidas de <i>Biomphalaria straminea</i> . Parasito corado pelo carmim aceto-alúmem.....	42
FIGURA 7- Ovos obtidos a partir de infecções experimentais em <i>Mus musculus</i> infectados a partir de larva do tipo Anfistoma emergidas de exemplares de <i>Biomphalaria straminea</i> (a) ovos após postura (b) ovo 10 dias após postura (c) ovo 20 dias após postura (d) ovo após eclosão do miracídio.....	43

FIGURA 8- Miracídio obtido a partir de ovo maduro produzidos por *Zygocotyle lunata* através de infecções experimentais a partir de larvas do tipo Anfistoma emergidas em exemplares de *Biomphalaria straminea*.....44

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Espécies de vertebrados encontrados naturalmente infectadas por *Zygocotyle lunata* relatados por diferentes autores.....16
- TABELA 2 - Moluscos coletados em coleções hídricas no município de Iguatama, MG em diferentes períodos de 2009 à 2010 e positividade para larvas de trematódeos.....31
- TABELA 3 - Dados morfométricos em infecções com 20 metacercárias de 60 dias após o encistamento de *Zygocotyle lunata* comparados com diferente hospedeiros. As medidas são apresentadas em micrômetros, exceto para comprimento e largura do corpo que são em milímetros.....33
- TABELA 4 - Dados morfométricos de *Zygocotyle lunata* obtidos após inóculo de 10 e 30 metacercárias de 60 dias de idade em cinco exemplares de *Mus musculus* da linhagem AKR/J. As medidas são apresentadas em micrômetros, exceto para comprimento e largura do corpo que são em milímetros.....34
- TABELA 5 - Dados morfométricos de *Zygocotyle lunata* obtidos após inóculo de 20 metacercárias de diferentes dias de idade após o encistamento em 5 exemplares de *M. musculus* da linhagem AKR/J Medidas apresentadas em micrômetros, exceto para comprimento e largura do corpo que são em milímetros.....35
- TABELA 6 - Dados morfométricos comparativos de *Z. lunata* obtidos por diferentes autores em diferentes hospedeiros. As medidas são apresentadas em micrômetros exceto para comprimento e largura do corpo que são em milímetros.....36

TABELA 7 – Moluscos oriundos de diferentes localidades, submetidas a infecções em massa e individual por miracídios de <i>Zygocotyle lunata</i> , período de observação e número de moluscos positivos.....	46
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	20
2.2 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Área de estudo.....	21
3.2 Estudos malacológicos.....	22
3.2.1 Coleta de moluscos.....	22
3.2.2 Avaliação da presença de larvas de trematódeos.....	24
3.2.3 Identificação dos moluscos.....	24
3.3 Estudos experimentais.....	25
3.3.1 Obtenção de metacercárias.....	25
3.3.2 Infecção experimental em hospedeiro definitivo.....	25
3.3.3 Exames parasitológicos de fezes e pesquisa de parasitos adultos.....	26
3.3.4 Verificação do efeito de dexametasona durante o período pré-patente.....	26
3.4 Avaliação da suscetibilidade de hospedeiro intermediário.....	27
3.4.1 Criação de moluscos em laboratório.....	27
3.4.2 Obtenção de miracídios.....	27
3.4.3 Teste de suscetibilidade dos moluscos a miracídios de trematódeo.....	28
3.4.3.1 Infecção individual.....	28
3.4.3.2 Infecção em massa.....	28
3.4.4 Exames dos moluscos experimentalmente infectados.....	28
3.5 Estudos taxonômicos.....	29
3.6 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Espécies de moluscos coletados e percentual de infecção por larvas de trematódeo.....	30
4.2 Recuperação de parasitos adultos em vertebrados experimentalmente infectados .....	31
4.2.1 Determinação do período pré patente .....	32

4.2.2 Recuperação de parasitos adultos em vertebrados experimentalmente infectados e tratados com dexametasona.....	32
4.3 Estudos experimentais e taxonômicos.....	37
4.3.1 Caracterização morfológica e morfométrica.....	37
4.3.2 Identificação.....	44
4.4 Testes de Suscetibilidade de hospedeiros intermediários.....	44
4.4.1 Infecções em massa e individual com miracídios emergidos a partir de ovos de <i>Zygocotyle lunata</i> .....	45
5 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

# 1 INTRODUÇÃO

*Zygocotyle lunata*, é um trematódeo do grupo Paramphistomoidea descrito por DIESING (1836) como *Amphistoma lunatum* de material coletado em *Anas melanotos*, *A. epecutiri* e *Blastocerus (=Cervus) dichotomus* no Brasil. STUNKARD (1917) criou o gênero *Zygocotyle* e descreveu uma nova espécie, *Z. ceratosa*, baseando na forma e tamanho de certos órgãos internos. PRICE (1928) em revisão do gênero concluiu que *A. lunatum* e *Z. ceratosa* eram a mesma espécie e também a relatou em *Bos taurus*, no Panamá, comprovando que esta espécie ocorria tanto em mamíferos quanto aves. De fato, entre os Paramphistomoidea, *Z. lunata* é a única espécie capaz de infectar aves e mamíferos (WILLEY, 1941; HUFFMAN *et al.*, 1991; ETGES, 1992; OSTROWSKI DE NUÑEZ *et al.*, 2003; FRIED *et al.*, 2009).

Como hospedeiros definitivos de *Z. lunata*, várias espécies de aves e mamíferos já foram encontradas naturalmente infectadas relatadas por diversos autores (Tabela 1), entretanto ainda não há relatos de infecções em seres humanos.

A variação estacional na prevalência do parasito pode estar associada a mudanças nos hábitos alimentares de alguns hospedeiros definitivos migratórios como *A. platyrhynchos*, *A. acuta* e *A. americana*, que dependem de vegetação aquática nativa durante o verão, e grãos de lavouras cultivadas durante o período de migração, no inverno (BELLROSE, 1976). A mudança na dieta pode resultar tanto na perda natural do ciclo em algumas regiões quanto na possibilidade de infectar novos hospedeiros (SHAW & KOCAN, 1980).

Dois gêneros de moluscos (*Helisoma* e *Biomphalaria*) já foram encontrados naturalmente infectados. Na América do Norte, WILLEY (1936) coletou na Pensilvânia, EUA 457 exemplares de *H. antrosa* e verificou que 16 deles estavam infectados. ETGES (1992) em Ohio encontrou *H. anceps* naturalmente infectados. SCHMIDT & FRIED (1997), NEGOVETICH & ESCH (2007) relataram a infecção de *H. trivolvis* em uma lagoa também na Pensilvânia, porém sem mencionar o número de moluscos coletados infectados. Moluscos do gênero *Biomphalaria* também são hospedeiros intermediários. De fato, OSTROWSKI DE NUÑEZ *et al.* (2003) apresentaram o primeiro relato da infecção deste parasito na Argentina, encontrando *B. peregrina* naturalmente infectados.

Tabela 1 Espécies de vertebrados encontrados naturalmente infectadas por *Zygodotyle lunata* relatados por diferentes autores.

Espécie encontrada	Autor
<i>Aix sponsa</i>	DROBNEY <i>et al.</i> , 1983
<i>Anas acuta</i>	BUSCHER, 1965
<i>Anas americana</i>	SHAW & KOCAN, 1980
<i>Anas bahamensis</i>	McDONALD, 1981
<i>Anas brasiliensis</i>	McDONALD, 1981
<i>Anas clypeata</i>	BRODERSON <i>et al.</i> , 1977
<i>Anas crecca</i>	SHAW & KOCAN, 1980; FARIAS & CANARIS, 1986
<i>Anas falcata</i>	SUTTON & LUNASCHI, 1987
<i>Anas epecuri</i>	DIESING, 1836
<i>Anas melanotos</i>	DIESING, 1836
<i>Anas platyrhynchos</i>	FARIAS & CANARIS, 1986; SHAW & KOCAN, 1980
<i>Anas sibilatrix</i>	SUTTON & LUNASCHI, 1987
<i>Anas strepera</i>	BUSCHER, 1965
<i>Anser anser</i>	PRICE, 1928; McDONALD, 1981
<i>Aythya affinis</i>	McDONALD, 1981
<i>Blastocerus dichotomus</i>	DIESING, 1836; NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2006
<i>Bos taurus</i>	PRICE, 1928; TRAVASSOS <i>et al.</i> , 1969
<i>Branta canadensis</i>	McDONALD, 1981
<i>Cairina moschata</i>	McDONALD, 1981
<i>Chen caerulescens</i>	PURVIS <i>et al.</i> , 1997
<i>Cygnus buccinator</i>	COWAN, 1946
<i>Cygnus melancoryphus</i>	DIGIANI, 1997
<i>Dendrocygna autumnalis</i>	DROBNEY <i>et al.</i> , 1983
<i>Dendrocygna bicolor</i>	DROBNEY <i>et al.</i> , 1983; MOHR, 2001
<i>Gallinago delicata</i>	PRICE, 1928
<i>Gallus gallus</i>	PRICE, 1928; TRAVASSOS <i>et al.</i> , 1969
<i>Marilia americana</i>	PRICE, 1928
<i>Netta peposaca</i>	MÜLLER <i>et al.</i> , 1983; MOHR, 2001
<i>Nettion carolinensis</i>	PRICE, 1928

Embora *Z. lunata* seja um trematódeo de ampla distribuição mundial e presente nas zonas tropicais e temperadas, os estudos sobre este parasito ocorrem principalmente nas Américas do Norte e do Sul (FRIED *et al.*, 1998). A distribuição geográfica do parasito pode ser influenciada pelo tipo de ambiente (lêntico, lótico), profundidade, por condições ambientais que prejudicam a ocorrência do molusco, hospedeiro intermediário, como a cobertura vegetal, salinidade da água, temperatura, luminosidade e abióticas relacionadas ao habitat (BELLROSE, 1976).

Muitos aspectos das interações entre *Z. lunata* e seus hospedeiros intermediários ainda continuam a ser explorados (WILLEY, 1941; ETGES, 1992; OSTROWSKI DE NUÑEZ *et al.*, 2003).

A elucidação do seu ciclo biológico foi realizada por WILLEY (1941) na América do Norte, utilizando patos e ratos como hospedeiros definitivos experimentais. Ovos não embrionados são liberados juntamente com as fezes. O desenvolvimento ocorre entre 19 e 40 dias, e a continuação do ciclo depende de ambiente aquático que favoreça a eclosão de miracídios que nadam ativamente em busca de hospedeiro, um molusco. A penetração normalmente se dá pelas partes moles do molusco em torno de duas horas. Quando não encontra hospedeiro, o miracídio pode sobreviver até 7 horas quando então diminui drasticamente sua atividade ciliar sobrevivendo em consequência a morte (WILLEY, 1941).

Dentro do hospedeiro intermediário os miracídios se desenvolvem em esporocistos entre 22-28 dias após a penetração. As rédias se desenvolvem dentro dos esporocistos e em algumas delas, contém rédias de segunda geração e cercárias (BERGER, 1957). Entre 32- 49 dias após a penetração dos miracídios, nos moluscos, ocorre emergência cercariana. As cercárias nadam ativamente por até 2 horas, encistam em vários tipos de substratos incluindo conchas de moluscos, crustáceos, vegetação e objetos que estejam na água (WILLEY, 1941; BERGER, 1957; PEOPLES & FRIED, 2008). As cercárias de *Z. lunata* possuem fototropismo positivo e a maioria dos cistos se forma próxima a uma fonte de luz (WILLEY, 1941; PEOPLES & FRIED, 2008).

Durante o encistamento as cercárias fixam suas ventosas e giram a cauda em torno do corpo, o material das glândulas cistogênicas é liberado e as paredes do cisto se formam rapidamente. A larva se contrai e a sua posição varia no interior do cisto periodicamente. Após a formação do cisto, a cauda se destaca e continua se movimentando por vários minutos, sendo esta atividade provavelmente associada a reservas de glicogênio presentes na cauda da cercária (WILLEY,

1941; PEOPLES & FRIED, 2008). Os cistos são esféricos, com duas paredes distintas (ROBBINS *et al.*, 1979).

Metacercárias são incapazes de resistir a dessecação prolongada. Com 24 horas de desidratação poucas metacercárias são viáveis, a partir de 48 horas de desidratação elas se tornam inviáveis (BERGER, 1957).

A capacidade de formação de cistos em diferentes tipos de substratos elimina a necessidade de um segundo hospedeiro. WILLEY (1941) relatou primeiramente o desencistamento artificial de metacercárias de *Z. lunata* com soluções de pepsina e pancreatina a 37 °C e sugeriu um animal de sangue quente como hospedeiro final deste parasito. Com este experimento as paredes do cisto ficaram maleáveis e o movimento da larva dentro do cisto foi observado após 4 horas e continuou por até 20 horas, embora nenhuma larva tenha desencistado. O desencistamento em hospedeiros definitivos ocorre dentro de 15 horas, como comprovado por WILLEY (1941) que, ao infectar experimentalmente ratos com metacercárias, verificou o desencistamento neste período, após necropsia dos animais. O estabelecimento da parasitose, sobrevivência e fecundidade do parasito estão relacionados com a idade e suscetibilidade genética do hospedeiro (FRIED *et al.*, 2008).

Os parasitos adultos se estabelecem na região intestinal, preferencialmente no ceco e cólon, de onde obtém alimento e se desenvolvem até a maturação e produção de ovos. A partir de 31 dias após a ingestão das metacercárias os ovos estão presentes nas fezes dos hospedeiros definitivos (WILLEY, 1941).

Em infecções experimentais em ratos, HUFFMAN *et al.* (1991) observaram que os pêlos, apetite e composição das fezes haviam permanecido normais e os animais não apresentavam sinais evidentes de alterações comportamentais. A mortalidade de patos domésticos infectados pelo parasito foi relatada por METTRICK (1959).

Os parasitos aderidos à mucosa na região cecal podem produzir danos ao órgão, sem evidências de hemorragias nas biópsias de animais infectados (FRIED & NELSON, 1978). As alterações patológicas associadas a *Z. lunata* estão relacionadas ao desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo. Em ratos, patos e camundongos experimentalmente infectados, os danos verificados estavam nos locais de fixação do parasito (JOYNER & McDANIEL, 1970).

Embora este parasito tenha sido descrito há vários anos, estudos relacionados a aspectos biológicos e taxonômicos de *Z. lunata* são necessários uma vez outras espécies de moluscos e

animais podem estar envolvidos na introdução e manutenção do ciclo biológico deste parasito, em áreas indenes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar experimentalmente aspectos biológicos, em hospedeiros intermediários e definitivos, de um isolado de *Zygocotyle lunata* obtido a partir de larvas emergidas de *Biomphalaria straminea* oriundas de coleções aquáticas do município de Iguatama, Minas Gerais, Brasil.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a infecção natural de moluscos dulceaquícolas por *Zygocotyle lunata* em coleções aquáticas localizadas em Iguatama MG;
- b) Realizar estudos experimentais, em hospedeiros intermediários e definitivos, iniciados a partir das cercárias emergidas dos moluscos naturalmente infectados;
- c) Caracterizar morfológicamente os estágios evolutivos (cercárias, metacercárias, ovos, miracídeos e parasitos adultos) de *Zygocotyle lunata* obtidos experimentalmente.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Área de estudo

O município de Iguatama (Figura 1) está localizado na região central do estado de Minas Gerais, (20° 10' 27" S, 45° 42' 41" W) às margens do rio São Francisco. Sua área territorial é de 628 km<sup>2</sup>. Limita-se com os municípios de Arcos, Doloresópolis, Luz e Bambuí (IBGE, 2010).

Segundo o IBGE (2010) a população estimada de Iguatama é de 8.031 habitantes, sendo que 1.315 habitantes estão na zona rural e 6.716 estão na zona urbana.

No município existe um grande número de lagoas marginais que contribuem para a preservação de diversas espécies de animais presentes no rio São Francisco, sendo as principais atrações turísticas.



Figura 1: Vista parcial de Iguatama, MG.

Geomorfologicamente, o município tem seu relevo ondulado, com poucas montanhas, sua altitude máxima é de 800 metros no local conhecido como Alto do sumidouro. O ponto central da cidade está a 660 metros de altitude. A temperatura média anual está em torno de 20,7 °C. Os meses de dezembro, janeiro e fevereiro são mais quentes, com a temperatura em torno de 29 °C.

Nos meses de junho e julho a temperatura fica em torno de 14,6 °C. O índice pluviométrico anual está na faixa de 1.426 mm, sendo os meses de novembro, dezembro e janeiro que registram maiores precipitações.

## **3.2 Estudos malacológicos**

### **3.2.1 Coleta de moluscos**

Para análise da distribuição de moluscos foram selecionados 4 locais de coleta distribuídos pelo perímetro de lagoas localizadas próximas ao rio São Francisco ou de seus afluentes considerando os aspectos: vegetação marginal ou flutuante, facilidade ao acesso, presença de moluscos em coletas anteriormente realizadas (Figura 2). As coordenadas geográficas de cada ponto de coleta foram obtidas com auxílio de GPS, a saber: Ponto 1-Fazenda Tapada 1 (20° 15' 12,9" S, 45° 46' 53,8" W, fig. 2 a). Ponto 2-Fazenda Ribeirão dos Patos (20° 14' 36,6" S, 45° 51' 17,7" W fig. 2 b). Ponto 3-Fazenda Tapada II (20° 15' 12,9" S, 45° 46' 53,8" W fig. 2 c). Ponto 4-Fazenda Pedrinha 20° 17' 77,3" S, 45° 42' 59,2" W fig. 2 d).

Foram realizadas coletas quinzenais no quarto trimestre de 2009, no segundo e terceiro trimestre de 2010.

Para a coleta, utilizou-se puçá confeccionado com nylon, de 40 cm de largura, 40 cm de altura e 20 cm de abertura e 1 mm<sup>2</sup> de malha, adaptado a um cabo de metal de 1,5 m e/ou coletados manualmente com auxílio de pinças metálicas de 25 cm e pontas redondas. Realizou-se um esforço amostral de 60 minutos em cada ponto de coleta sendo obtida uma amostra representativa dos moluscos do local (SILVA, 1992; SOUZA, 2006; PINTO, 2009).

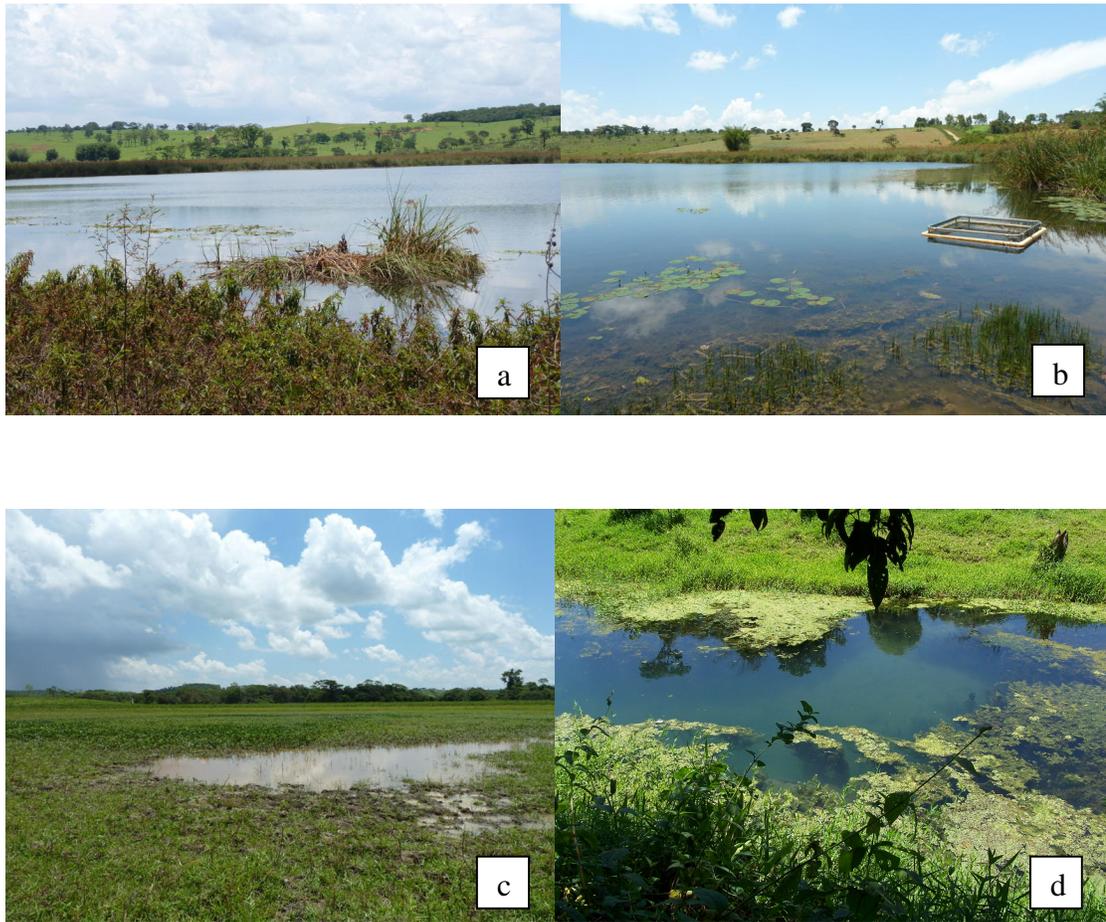


Figura 2: Pontos de coleta de moluscos em Iguatama, MG: (a) Fazenda Tapada I (Ponto 1)  $20^{\circ} 15' 12,9''$  S,  $45^{\circ} 46' 53,8''$  W (b) Fazenda Ribeirão dos Patos (Ponto 2)  $20^{\circ} 14' 36,6''$  S,  $45^{\circ} 51' 17,7''$  W (c) Fazenda Tapada II (Ponto 3)  $20^{\circ} 15' 12,9''$  S,  $45^{\circ} 46' 53,8''$  W (d) Fazenda Pedrinha (Ponto 4)  $20^{\circ} 17' 77,3''$  S,  $45^{\circ} 42' 59,2''$  W.

Parte do material coletado foi acondicionado em sacos plásticos, etiquetados, e transportados em caixa de isopor ao Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, onde foram examinados, outra parte do material foi examinada no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Meio Ambiente Alto São Francisco de Iguatama, MG.

### **3.2.2 Avaliação da presença por larvas de trematódeos**

No laboratório, os moluscos foram triados, contados, observados macroscopicamente e colocados individualmente em recipientes plásticos de 24 poços (com 16 mm de diâmetro por 20 mm de altura). Em seguida, cerca de 5 ml de água isenta de cloro foram adicionados em cada poço com auxílio de pipeta, deixados durante a noite para exame na manhã seguinte. Após o primeiro exame em estereomicroscópio, os moluscos foram submetidos a fotoestimulação artificial (lâmpada de 60 W a 30 cm de distância) por 2 horas e re-examinados. Os exemplares positivos para larvas de trematódeos foram separados por tipo cercariano, transferidos para recipientes de plástico contendo 1.000 ml de água isenta de cloro e alimentados com alface. Os mesmos foram examinados quando necessário para a obtenção de larvas para a realização de estudos experimentais. Os moluscos negativos foram separados e mantidos em laboratório nas mesmas condições acima e re-examinados semanalmente até 90 dias, quando os sobreviventes foram esmagados entre placas de vidro para pesquisa de formas evolutivas (SILVA, 1992; SOUZA, 2006; MELO, 2008). A partir dos resultados das infecções naturais por larvas de trematódeo, foram calculados o Índice Cercário Global (ICG) e Índice Cercário Específico (ICE) de acordo com RUIZ (1952).

### **3.2.3 Identificação dos moluscos**

Para a identificação dos moluscos coletados, de cada amostra, quando necessário, foram separados cerca de 10% dos exemplares, que foram mortos em água a 70° C. As partes moles foram fixadas em líquido de Railliet-Henry e dissecadas com auxílio de estereomicroscópio (PARAENSE & DESLANDES, 1955).

Para identificação das espécies foram considerados parâmetros conquiológicos e morfológicos, segundo (MALEK, 1962; PAHO, 1968; PARAENSE, 1975).

### 3.3 Estudos experimentais

#### 3.3.1 Obtenção de metacercárias

Para a obtenção de metacercárias, larvas do tipo anfistoma emergidas de moluscos naturalmente infectados foram colocadas em recipientes (copos plásticos) contendo 50 ml de água isenta de cloro para a ocorrência de encistamento, após 15 minutos as larvas encistaram na parede do recipiente.

#### 3.3.2 Infecção experimental em hospedeiros definitivos

As metacercárias obtidas experimentalmente foram removidas do substrato sólido, com auxílio de estilete, contadas e utilizadas para as infecções de hospedeiros vertebrados. Inicialmente grupos de 5 exemplares fêmeas de *Mus musculus* da linhagem AKR/J, pesando  $25 \pm 2$  g, criados e mantidos no biotério do Laboratório de Taxonomia de Biologia de Invertebrados, receberam por via oral, com auxílio de seringa BD Cornwall munida de agulha intragástrica, 0,3 ml de água contendo 10, 20 ou 30 metacercárias (de 60 dias após encistamento).

Cinco exemplares de *Gallus gallus domesticus* com cerca de 10 dias de vida oriundos da Cooperativa Agropecuária de Iguatama MG e 5 exemplares de *Meriones unguiculatus*, fêmeas, pesando  $25 \pm 2$  g, criados e mantidos no biotério do Laboratório de Taxonomia de Biologia de Invertebrados foram submetidos ao inóculo de 20 metacercárias de 60 dias pós encistamento.

Visando avaliar a viabilidade das metacercárias em diferentes períodos após encistamento, vinte metacercárias de 1, 30, 60, 90, 120 e 150 dias após encistamento foram utilizadas para infecções de grupos de cinco exemplares de *M. musculus* da linhagem AKR/J.

Os roedores foram mantidos em condições laboratoriais com água e ração (ração para animais do laboratório Labina, Purina®, Campinas, São Paulo) e as aves em viveiro e alimentadas com farelo da ração utilizada na alimentação dos roedores.

### **3.3.3 Exames parasitológicos de fezes e pesquisa de parasitos adultos**

Amostras de fezes de cada animal experimentalmente infectado foram coletadas diariamente a partir do quinto até 50 dias após a infecção e submetidas ao método de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919). Quando necessário foram examinadas no mínimo dez lâminas de cada amostra preparada. Verificando-se presença de ovos nas fezes, foi determinado o período pré-patente. A seguir os animais que apresentavam ovos do parasito nas fezes foram mortos por deslocamento cervical, as vísceras foram transferidas para placas de Petri contendo solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%). Estas foram dilaceradas com auxílio de estiletes e analisadas em estereomicroscópio para pesquisa de parasitos adultos. Após, os trematódeos foram coletados cuidadosamente com auxílio de pincéis, analisados a fresco e, distendidos entre lâminas de vidro, fixados em formol a 10%, a temperatura de 60 °C, posteriormente corados em carmim aceto-alúmem desidratados em série crescente de alcoóis, clarificação em creosoto de Faia e montados em lâminas permanentes em bálsamo do Canadá como recomendado por MELO (2009).

Cinquenta dias após o inóculo, os animais que não apresentaram ovos nas fezes foram mortos por deslocamento cervical para a pesquisa de parasitos, como descrito anteriormente, de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

### **3.3.4 Verificação do efeito de dexametasona durante o período pré-patente**

Foram utilizados grupos de cinco camundongos convencionais da linhagem AKR/J infectados por 20 metacercárias com idade indeterminada. Um grupo de animais recebeu por via subcutânea 0,2 ml (25 mg/Kg) de fosfato sódico de dexametasona (Decadron, Aché, Brasil) 1 dia antes e diariamente após a infecção durante todo o período pré-patente (30-34 dias).

As fezes dos camundongos foram colhidas diariamente a partir do quinto dia de infecção para realização do exame parasitológico qualitativo até a verificação da presença de ovos nas fezes, quando os animais foram sacrificados para recuperação dos parasitos.

### **3.4 Avaliação da suscetibilidade de hospedeiros intermediários**

#### **3.4.1 Criação de moluscos em laboratório**

Visando a obtenção de descendentes de diferentes linhagens de moluscos para a realização de testes de suscetibilidade, desovas obtidas de exemplares (infectados ou não por larvas de trematódeos) oriundos de Iguatama (*Physa marmorata*, *Drepanotrema anatinum*, *Pomacea canaliculata*, *Biomphalaria straminea*, *B. schrammi*), bem como de *B. straminea* de Recife PE e Felixlândia MG e *B. glabrata* de Belo Horizonte MG, foram isoladamente submetidas a criação e manutenção em laboratório de acordo com FREITAS (1973) com pequenas modificações.

#### **3.4.2 Obtenção de miracídios**

A obtenção de miracídios foi realizada a partir dos ovos presentes nas fezes dos animais experimentalmente infectados. As fezes foram submetidas ao método de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919) e o sedimento, lavado, foi transferido para placas de Petri, mantidos em temperatura ambiente e acompanhados diariamente com auxílio de estereomicroscópio, para a verificação da formação de miracídios.

Após a formação de miracídios, o sedimento contendo os ovos foi transferido para um balão volumétrico, ao qual foram adicionados 400 ml de água isenta de cloro. A base do balão volumétrico foi envolvida com papel alumínio para impedir a incidência de luz. Um foco de luz artificial (lâmpada de 60 W a 30 cm de distância) foi direcionado na extremidade superior do balão, com a finalidade de atrair e concentrar os miracídios eclodidos dos ovos (CHAIA, 1956).

### **3.4.3 Teste de suscetibilidade dos moluscos a miracídios de trematódeos**

#### **3.4.3.1 Infecção individual**

Para infecção individual, 50 exemplares de moluscos descendentes das espécies e linhagens especificadas no item 3.4.1 foram colocados individualmente em recipientes de plástico contendo cerca de 5 ml de água isenta de cloro e expostos a cinco miracídios obtidos segundo o item 3.4.2. Os moluscos foram mantidos em contato com a solução contendo miracídios sob luz artificial (lâmpada de 60 W) por 8 horas quando então foram transferidos para cubas de plástico contendo 2.000 ml de água trocada semanalmente, e alimentados com alface durante todo o experimento. Como controle, exemplares de moluscos não infectados foram mantidos nas mesmas condições laboratoriais.

#### **3.4.3.2 Infecção em massa**

Para infecção em massa, 50 exemplares de moluscos, obtidos conforme item 3.4.1, foram colocados em recipientes contendo 1.000 ml de água isenta de cloro e a seguir 100 ml de solução contendo aproximadamente 300 miracídios foi adicionado. Exemplares de moluscos não infectados serviram como controle e após a infecção, os moluscos foram mantidos como no item anterior.

### **3.4.4 Exames dos moluscos experimentalmente infectados**

Os moluscos foram analisados semanalmente a partir de 15 dias após a infecção para a verificação de emergência de cercárias conforme item 3.2.2 por até os 90 dias após a infecção.

### 3.5 Estudos taxonômicos

Amostras dos estágios evolutivos de trematódeos obtidos dos moluscos oriundos de Iguatama naturalmente infectados foram coletadas com auxílio de micropipeta. Para caracterização das cercárias, foram utilizados exemplares vivos, corados e fixados. Para exame a fresco foram utilizados solução de Lugol diluído e corantes vitais (solução aquosa de vermelho Neutro, e sulfato azul do Nilo a 0,05%) de acordo com MELO (2009). Outras amostras das larvas foram fixadas em formalina a 10%, a temperatura de 60 °C, e submetidas à coloração pelo, carmin aceto-alúmem desidratação em série crescente de álcoois, clarificação em creosoto e montagem permanente em bálsamo do Canadá segundo MELO (2009). Metacercárias encistadas foram submetidas ao mesmo processo.

Os estágios evolutivos obtidos (cercárias, metacercárias e parasitos adultos) foram estudados em microscópio de luz, munido de câmara clara, desenhados, mensurados com auxílio de ocular milimetrada, fotografados com máquina digital Olympus Stylus 840 e as imagens foram formatadas em editor de imagem (PhotoScape® 3.3). Os resultados foram comparados com as descrições e chaves de identificação propostas por diversos autores (PRICE, 1928; WILLEY, 1941; YAMAGUTI, 1958; TRAVASSOS *et al.*, 1969; HUFFMAN *et al.*, 1991; JONES *et al.*, 2005). As medidas são apresentadas em micrômetros exceto para tamanho e largura dos adultos que são em milímetros.

Os exemplares obtidos foram depositados na coleção do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados (DPIC), Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG.

### 3.6 Análise estatística

Quando necessário, para avaliar o grau de significância estatística dos resultados obtidos, foram empregados o teste T de Student e análise de variância (ANOVA) utilizando o programa BioESTAT 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Espécies de moluscos coletados e percentual de infecção por larvas de trematódeos

No período avaliado foram coletados 4.993 moluscos pertencentes a cinco espécies (Tabela 2). Destes 4.307 estavam vivos. Dos 3.101 exemplares de *B. straminea* coletados 2.609 estavam vivos e destes, 39 (ICG=0,9%) apresentavam-se infectados por larvas de trematódeos. Dois diferentes tipos de cercárias (Anfistoma, Figura 3a e Equinostoma, Figura 3b) emergiram desses moluscos. As larvas caracterizadas preliminarmente como cercária do tipo Anfistoma, foram encontradas em 14 exemplares (ICE=0,53%), e em 25 exemplares foram encontradas larvas do tipo Equinostoma (ICE=0,96%).

As outras espécies de moluscos oriundos de Iguatama: (*B. schrammi*, *Pomacea canaliculata*, *Physa marmorata* e *Drepanotrema anatinum*) também coletadas, foram submetidas à avaliação de infecção por larvas de trematódeos. Verificou-se em 22 exemplares de *B. schrammi* larvas do tipo Equinostoma (Figura 3 b) com (ICG=0,51%) e (ICE=2,57%), em 15 exemplares de *Physa marmorata* larvas do tipo Estrigeocercária (Figura 3 c) com (ICG= 0,23%) e (ICE=3,3%). Estes diferentes tipos de larvas de trematódeos foram fixados para serem futuramente estudados, larvas do tipo anfistoma não foram encontradas nestas espécies.

Tabela 2: Moluscos coletados em coleções hídricas no município de Iguatama, MG em diferentes períodos de 2009 a 2010 e positividade para larvas de trematódeos.

	4 Trim. 2009			2 Trim. 2010			3 Trim. 2010			Total	
	V	M	P	V	M	P	V	M	P	V	M
<i>Biomphalaria straminea</i>	365	64	7	1.365	229	19	879	199	13	2.609	492
<i>Biomphalaria schrammi</i>	201	21	5	373	54	12	280	37	5	854	112
<i>Physa marmorata</i>	41	5	0	144	19	6	118	15	4	303	39
<i>Drepanotrema anatinum</i>	30	1	0	41	12	0	29	2	0	100	15
<i>Pomacea canaliculata</i>	67	3	0	202	16	0	172	9	0	441	28
<b>Total</b>	<b>704</b>	<b>94</b>		<b>2.125</b>	<b>330</b>		<b>1.478</b>	<b>262</b>		<b>4.307</b>	<b>686</b>

M= Mortos, P= Positivos, Trim. =Trimestre, V= Vivos.

#### 4.2 Recuperação de parasitos adultos em vertebrados experimentalmente infectados

Na tabela 3 são apresentados os dados morfométricos dos parasitos adultos obtidos após inóculo de vinte metacercárias de 60 dias após encistamento em grupos de 5 animais de *Gallus gallus domesticus*, *Mus musculus* e *Meriones unguiculatus*. Observou-se que em *G. gallus domesticus* a quantidade de parasitos recuperados foi menor que nos dois últimos hospedeiros (*M. musculus* e *M. unguiculatus*). No total foram recuperados 20 parasitos (média de 4 parasitos por animal) em *M. musculus*, 21 (média de 4,2 parasitos por animal) e 7 (média de 2,3 parasitos por animal) em *M. unguiculatus*, e *G. g. domesticus* respectivamente. Entretanto somente três em cinco exemplares de *Gallus* apresentaram a infecção.

Na tabela 4 estão os dados com a comparação morfométrica dos parasitos obtidos após o inóculo de dez e trinta metacercárias de 60 dias após encistamento em grupos de 5 animais de *M. musculus*. Nota-se que o número total de parasitos recuperados foi menor em infecções com dez metacercárias, enquanto em infecções com trinta metacercárias o número total de parasitos recuperados foi maior. Para a maioria das estruturas internas dos parasitos não houve diferença significativa. No total foram recuperados 6 parasitos (média de 3 parasitos por animal) nas infecções utilizando dez metacercárias e 22 parasitos (média de 4,4 parasitos por animal) nas infecções utilizando 30 metacercárias por animal.

Já na tabela 5 estão os dados com a comparação morfométrica em infecções a grupos de 5 animais de *M. musculus* com 20 metacercárias de diferentes idades (1, 30, 90 120 e 150 dias). Pode-se verificar que em infecções com metacercárias de um dia após encistamento, na totalidade recuperou-se 10 parasitos (média de 2 por animal) e com 120 dias após, cinco trematódeos adultos foram recuperados (média de 2,5 parasitos por animal). Em relação a infecções com metacercárias de 30 e 90 dias após o encistamento recuperou-se no total 15 (média de 3 por animal) e 11 parasitos (média de 2,2 parasitos por animal) respectivamente. Quanto às estruturas internas, as maiores foram observadas em parasitos recuperados de infecções com metacercárias de 120 dias após encistamento em relação aos demais. Entretanto as diferenças verificadas são decorrentes da variação intra-específica. Em infecções utilizando metacercárias de 150 dias de idade não foram recuperados parasitos.

Na tabela 6 são apresentados os valores morfométricos dos parasitos obtidos no presente estudo e os de exemplares na literatura obtidos de diferentes hospedeiros por vários autores. Verificou-se que as variações estão dentro do padrão independente do hospedeiro e do número de parasitos por hospedeiro.

#### **4.2.1 Determinação do período pré-patente**

Verificou-se que o período pré-patente foi em média 33 (30-36) dias em todos hospedeiros vertebrados utilizados.

#### **4.2.2 Recuperação de parasitos adultos em *Mus musculus* experimentalmente infectados e tratados com dexametasona**

Verificou-se que todos os animais (tratados e controles) apresentaram-se infectados. O período pré-patente no grupo controle foi de 33 dias (31-35) e no grupo submetido ao imunossupressor foi de 32 dias (30-35). Ainda recuperou-se uma maior quantidade de parasitos por animal tratado em relação ao grupo de animais controle (5,6 e 2 respectivamente,  $p < 0,005$ ). No grupo que recebeu o fármaco, foi verificado que os parasitos apresentaram-se com menor comprimento ( $4 \text{ mm} \pm 1$ ). Um dos animais do grupo tratado que apresentou somente 3 parasitos, verificou-se que estes apresentavam tamanho similar ao do grupo controle.

Tabela 3- Dados morfométricos em infecções com 20 metacercárias de 60 dias após encistamento o de *Zygocotyle lunata* comparados com diferente hospedeiros. As medidas são apresentadas em micrômetros, exceto para comprimento e largura do corpo que são em milímetros

		<i>Mus musculus</i> n=5	<i>Gallus gallus domesticus</i> n=5	<i>Meriones unguiculatus</i> n=5
Infetados		5(100%)	3 (60%)	5 (100%)
Parasitas recuperados		20	7	21
Média/amplitude		4 (3-5)	2,3 (2-3)	4,2 (4-5)
Corpo	C	5 (4-7)	5,1 (3,7-5,9)	4,8 (3,6-7,1)
	L	3 (2,1-3)	2,1 (1,7-2,2)	2,6 (2-3,5)
Faringe	C	509 (410-546)	468 (409-485)	474 (395-566)
	L	544 (471-621)	470 (416-511)	480 (409-546)
Ventosa ventral	C	1.249 (928-1.410)	1.358 (495-1.547)	1.153 (859-1.461)
	L	1.022 (774-1.186)	1.196 (1.100-1.495)	926 (773- 1.375)
Testículo anterior	C	588 (413-756)	424 (257- 515)	425 (257-773)
	L	1.232 (602-1.547)	751 (618- 859)	1.017 (790-1.306)
Testículo posterior	C	555 (344-791)	400 (275-481)	401 (309-773)
	L	1.144 (516-1.479)	746 (601- 876)	1.012 (756- 1.289)
Ovário	C	255 (137-375)	240 (163- 327)	245 (145- 332)
	L	482 (205-642)	354 (293-450)	361 (215- 465)
Ovos	C	140 (134-145)	141 (136-146)	140 (134-149)
	L	82 (78-89)	79 (74-88)	82 (77-90)

Tabela 4- Dados morfométricos de *Zygodontia albicans* obtidos após inóculo de 10 e 30 metacercárias de 60 dias de idade em cinco exemplares de *Mus musculus* da linhagem AKR/J. As medidas são apresentadas em micrômetros, exceto para comprimento e largura do corpo que são em milímetros.

		10 metacercárias n=5	30 metacercárias n=5	Valor p
Infetados		2(40%)	5 (100%)	
Parasitas recuperados		6	22	
Média/amplitude		3 (2-4)	4,4 (3-6)	0,22
Corpo	C	5,6 (3,7- 8,6)	4,2 (2,2-5,5)	0,73
	L	2,2 (1,7-2,8)	2,2 (1,5-2,9)	0,12
Faringe	C	522 (470-648)	451 (375-546)	0,06
	L	548 (484-641)	470 (409-546)	0,0002
Ventosa ventral	C	1.131 (980-1.306)	1.019 (842-1.203)	0,02
	L	891 (670-1.065)	470 (409-546)	0,32
Testículo anterior	C	550 (343-876)	441 (343-808)	0,27
	L	968(653-1.341)	1.087 (704-1.375)	0,23
Testículo posterior	C	504 (343-842)	442 (326-756)	0,51
	L	911 (532-1.203)	1.026 (773-1.392)	0,39
Ovário	C	291 (204-409)	229 (170-293)	0,18
	L	372 (204-546)	345 (266-450)	0,76
Ovos	C	142 (140-144)	137 (133-144)	0,77
	L	91 (90-93)	85 (77-89)	0,79

Tabela 5- Dados morfométricos de *Zygodontia orbiculata* obtidos após inóculo de 20 metacercárias de diferentes dias de idade após o encistamento em 5 exemplares de *M. musculus* da linhagem AKR/J Medidas apresentadas em micrômetros, exceto para comprimento e largura do corpo que são em milímetros.

		1 dia n=5	30 dias n=5	90 dias n=5	120 dias n=5	150 dias n=5	Anova valor p
Infetados		5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	2 (40%)	0	
Parasitas recuperados		10	15	11	5	0	
Media/ Amplitude		2 (1-3)	3 (2-4)	2,2 (1-3)	2,5 (2-3)	0	0,3122
Corpo	C	6,4 (3,9-7,7)	5,5 (4,4-6,7) <sup>a</sup>	5,9 (5-6,9)	6,7 (5,9-7,4) <sup>a</sup>	-	0,0098
	L	2,4 (1,7-2,9) <sup>a</sup>	2,6 (1,9-3,6) <sup>b</sup>	2,7 (2,2-3,4)	3,2 (2,9-3,4) <sup>a,b</sup>	-	0,135
Faringe	C	588 (477-614) <sup>a,b</sup>	607 (505-682) <sup>a</sup>	608 (546-648)	651 (614-682) <sup>b</sup>	-	0,038
	L	568 (532-614) <sup>a,b,c</sup>	644 (593-682) <sup>a</sup>	626 (580-716) <sup>b</sup>	633 (546-668) <sup>c</sup>	-	0,0002
Ventosa ventral	C	1.259 (945-1.375) <sup>a,b,c</sup>	1.439 (1.203-1.650) <sup>a</sup>	1.491 (1.375-1.719) <sup>b</sup>	1.640 (1.547-1.753) <sup>c</sup>	-	0,00006
	L	997 (825- 1.100) <sup>a,b</sup>	1.146 (1.031-1.341) <sup>a</sup>	1.120 (980-1.203)	1.189 (1.117-1.272) <sup>b</sup>	-	0,0026
Testículo anterior	C	623 (429-773) <sup>a</sup>	604 (429-850) <sup>b</sup>	704 (550-859)	735 (587-975) <sup>a,b</sup>	-	0,0009
	L	1.048 (773-1.341) <sup>a</sup>	1.234 (859-1.977) <sup>b</sup>	1.317 (945-1.977)	1.429 (985-1980) <sup>a,b</sup>	-	0,0088
Testículo posterior	C	616 (395-687) <sup>a</sup>	607 (464-850) <sup>b</sup>	650 (550-773) <sup>c</sup>	655 (563-850) <sup>a,b,c</sup>	-	0,00071
	L	954 (601-1.289)	1.238 (842-1.977)	1.305 (876-1.942)	1.425 (884- 1.978)	-	0,168
Ovário	C	237 (136-313)	234 (170-341)	222 (170- 273)	294 (204-375)	-	0,057
	L	354 (204-450) <sup>a</sup>	351 (204-477) <sup>b</sup>	327 (218-443) <sup>c</sup>	362 (306-453) <sup>a,b,c</sup>	-	0,00094
Ovos	C	139 (133-143)	140 (138-143)	137 (135-144)	139 (137-142)	-	0,170
	L	80 (77-88)	79 (75-89)	81 (77-90)	82 (78-89)	-	0,053

Letras iguais indicam  $p < 0,05$

Tabela 6: Dados morfométricos comparativos de *Z. lunata* obtidos por diferentes autores em diferentes hospedeiros. As medidas são apresentadas em micrômetros exceto para comprimento e largura do corpo que são em milímetros.

		Presente estudo				Price 1928		
		<i>Mus musculus</i> n=20	<i>Gallus gallus domesticus</i> n=7	<i>Meriones unguiculatus</i> n=21	<i>Bos taurus</i> n=30	<i>Anser anser domesticus</i> n=6	<i>Marilia americana</i> n=1	<i>Nettion carolinense</i> n=6
Co	C	5 (4,0-7,0)	5,1 (3,7-5,9)	4,8 (3,6-7,1)	4,0-6,0	4,0-6,0	8	3,0-7,0
	L	3 (2,1-3)	2,1 (1,7-2,2)	2,6 (2-3,5)	2,0-3,0	2,0-3,0	3	1,5-4,0
F	C	509 (410-546)	468 (409-485)	474 (395-566)	390-650 d	390-520	455	286-390
	L	544 (471-621)	470 (416-511)	480 (409-546)	*	*	650	*
Vv	C	1.249 (928-1.410)	1.358 (495-1.547)	1.153 (859-1.461)	780-1100	580-650	780	720-1100
	L	1.022 (774-1.186)	1.196 (1.100-1.495)	926 (773-1.375)	910-1.200	910-1.200	910	600-1100
Ta	C	588 (413-756)	424 (257-515)	425 (257-773)	325-650	680-900	780	364-780
	L	1.232 (602-1.547)	751 (618-859)	1.017 (790-1.306)	260-390	325-520	*	221-390
Tp	C	555 (344-791)	400 (275-481)	401 (309-773)	520-650	455-910	*	390-910
	L	1.144 (516-1.479)	746 (601-876)	1.012 (756-1.289)	325-520	286-520	*	234-520
Ov	C	255 (137-375)	240 (163-327)	245 (145-332)	156-260 d	175-325	390	143-325
	L	482 (205-642)	354 (293-450)	361 (215-465)		175-365	225	71-175
O	C	134-145	136-146	134-149	130-143	128-153	140	124-143
	L	78-89	74-88	77-90	77-79	76-96	96	75-90

\*Dados não fornecidos.

### 4.3 Estudos experimentais e taxonômicos

#### 4.3.1 Caracterização morfológica e morfométrica

Os estudos experimentais iniciados a partir de larvas de trematódeos do tipo Anfistoma emergidas de exemplares de *B. straminea* oriundas de Iguatama permitiram com sucesso a obtenção de estágios evolutivos de trematódeo assim caracterizado:

**Cercárias** (n=20) (Figura 3a): Larvas emergidas de *B. straminea* após fotoestimulação artificial provenientes do ponto 3 e ponto 4, foram caracterizadas como pertencentes ao grupo Anfistoma (Figura 3 a). Apresentam corpo ovalado com 239-285  $\mu\text{m}$  de comprimento por 188-149  $\mu\text{m}$  de largura. Ventosa oral esférica subterminal 39-57  $\mu\text{m}$  de comprimento por 40-57  $\mu\text{m}$  de largura. Ventosa ventral localizada na parte terminal do corpo com 75-91  $\mu\text{m}$  de comprimento por 85-94  $\mu\text{m}$  de largura. Esôfago curto bifurcando-se para formar cecos intestinais que terminam em fundo cego indo até próximo do acetábulo. Células cistogênicas em pequenos grupamentos distribuídas lateralmente ao corpo. Vesícula excretora situada na extremidade posterior do corpo. Cauda simples 537-580  $\mu\text{m}$  de comprimento por 28-39  $\mu\text{m}$  de largura. Possui um par de ocelos fortemente pigmentados situados na parte anterior do corpo, destacando-se em material a fresco, corado ou não com vermelho Neutro, sulfato azul do Nilo ou solução de Lugol, ou em lâminas permanentes coradas pelo carmim aceto-alúmem. Na maioria das vezes após fotoestimulação, emergem em torno de 30 cercárias/hora por molusco.



Figura 3: Cercárias oriundas de Iguatama (a) Anfishostoma emergida de *B. straminea*. Larva a fresco (b) Equinostoma emergida de *B. schrammi* coradas pelo carmim aceto-alúmem (c) Estrigeocercária emergida de *Physa marmorata* corada pelo carmim aceto-alúmem. Escala =100  $\mu$ m.

**Metacercárias** (n=20) (Figura 4): Cisto com formato oval a esférico com 187-203  $\mu\text{m}$  de comprimento por 182-198  $\mu\text{m}$  de largura. Após a emergência cercariana ocorre a formação das metacercárias, iniciada pela adesão em um substrato sólido, secreção do conteúdo das glândulas cistogênicas e formação da parede cística. Em seguida ocorre o desprendimento da cauda e sua contração dentro do cisto. A cauda destacada fica movimentando aproximadamente 30 minutos então repousa no fundo do substrato.



Figura 4: Metacercárias obtidas a partir de larvas do tipo Anfistoma emergidas de *Biomphalaria straminea*, naturalmente infectados, coletados em Iguatama, Minas Gerais. (a) metacercária (b) conjunto de metacercárias. Escala =100  $\mu\text{m}$ .

**Parasitas adultos** (n=20) (Figuras 5-6): Foram caracterizados os exemplares recuperados no ceco intestinal em camundongos experimentalmente infectados por 20 metacercárias de 60 dias de idade. Corpo alongado 4,0-7,0 mm de comprimento por 2,1-3 mm de largura. Faringe subterminal 410-546  $\mu\text{m}$  de comprimento por 471-621  $\mu\text{m}$  de largura com um par de divertículos na parte posterior. Esôfago curto com bulbo esofágico na parte posterior que se bifurca, originando cecos intestinais. Ventosa ventral (acetábulo) situada na extremidade final, bem desenvolvida, com 928-1.410  $\mu\text{m}$  de comprimento por 774-1.118  $\mu\text{m}$  de largura, com um par de papilas na parte posterior. Poro genital mediano abrindo-se próximo a bifurcação esofágica. Dois testículos lobados, em *tandem*, na região equatorial do corpo. Testículo anterior com 413-756  $\mu\text{m}$  de comprimento por 602-1.547  $\mu\text{m}$  de largura. Testículo posterior com 344-791  $\mu\text{m}$  de comprimento por 516-1.479  $\mu\text{m}$  de largura. Ovário esférico pós-testicular 137-375  $\mu\text{m}$  de comprimento por 205-642  $\mu\text{m}$  de largura. Vitelária folicular bilateral ocupando a região entre a

faringe e a margem anterior do acetábulo. Útero pré-acetabular, inter-cecal e trans-testicular, contendo ovos operculados não embrionados.

Todos os outros parasitos recuperados em diferentes hospedeiros também foram analisados.

**Ovos** (n=20) (figura 7): Operculados, com formato oval apresentando casca delicada e fina além de coloração amarronzada. Medem 133-149  $\mu\text{m}$  de comprimento por 74-93  $\mu\text{m}$  de largura. O desenvolvimento do miracídio ocorre em torno de 20 dias.

**Miracídios** (n=10) (figura 8): Larvas ciliadas estudadas a fresco, apresentando formato ovalado com 91-183  $\mu\text{m}$  de comprimento por 32-68  $\mu\text{m}$  de largura, quando em movimento apresentam os lados do corpo paralelos. Apresenta papila apical na região anterior do corpo, ceco primitivo, sistema excretor composto por duas células flama, uma em cada lado do corpo. Parte posterior do corpo apresentando células germinativas, placas ciliares cobrindo todo o corpo. Nadam ativamente nas duas primeiras horas, após este período diminuem sua atividade ciliar.

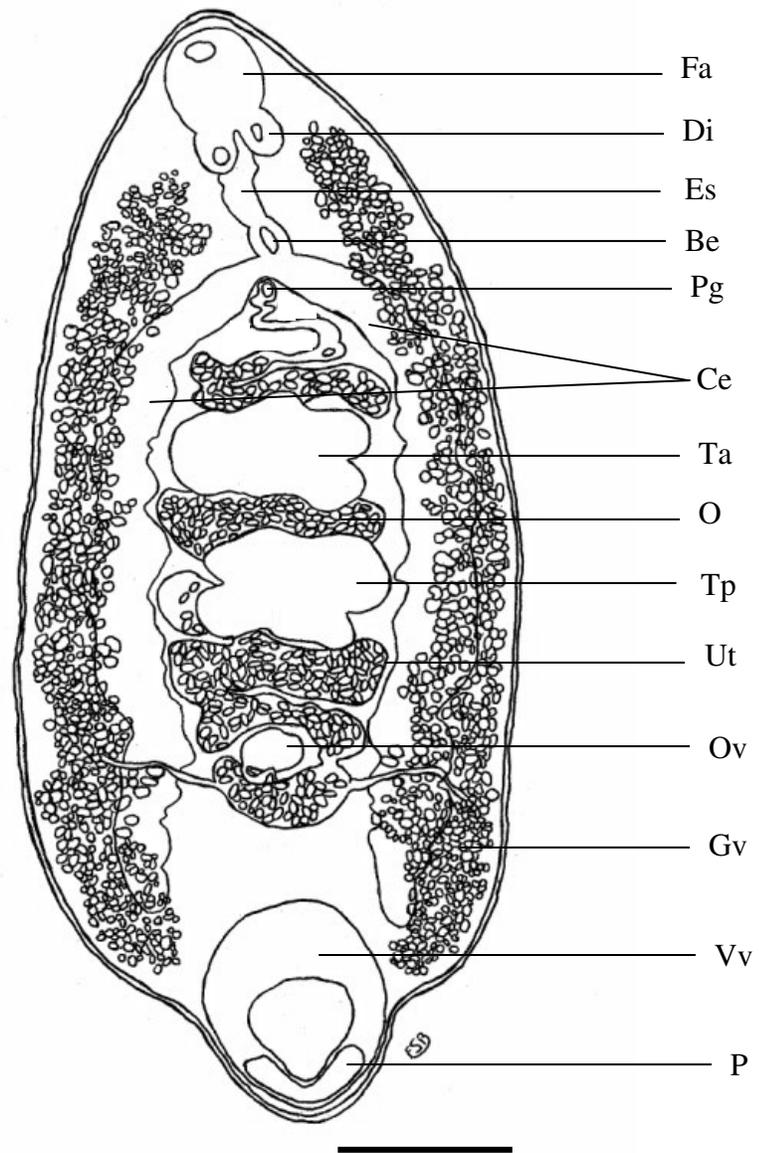


Figura 5: Parasito adulto recuperado em infecções experimentais em *Mus musculus* 35 dias após a infecção por metacercária obtidos por cercárias do tipo Anfistoma emergidas de *Biomphalaria straminea*. Desenho em câmara clara. Escala =1 mm.



Figura 6: Parasito adulto recuperado em infecções experimentais em *Mus musculus* 35 dias após a infecção por metacercárias obtidas por cercárias do tipo Anfishoma emergidas de *Biomphalaria straminea*. Parasito corado pelo carmim aceto-alúmem. Escala =1 mm.

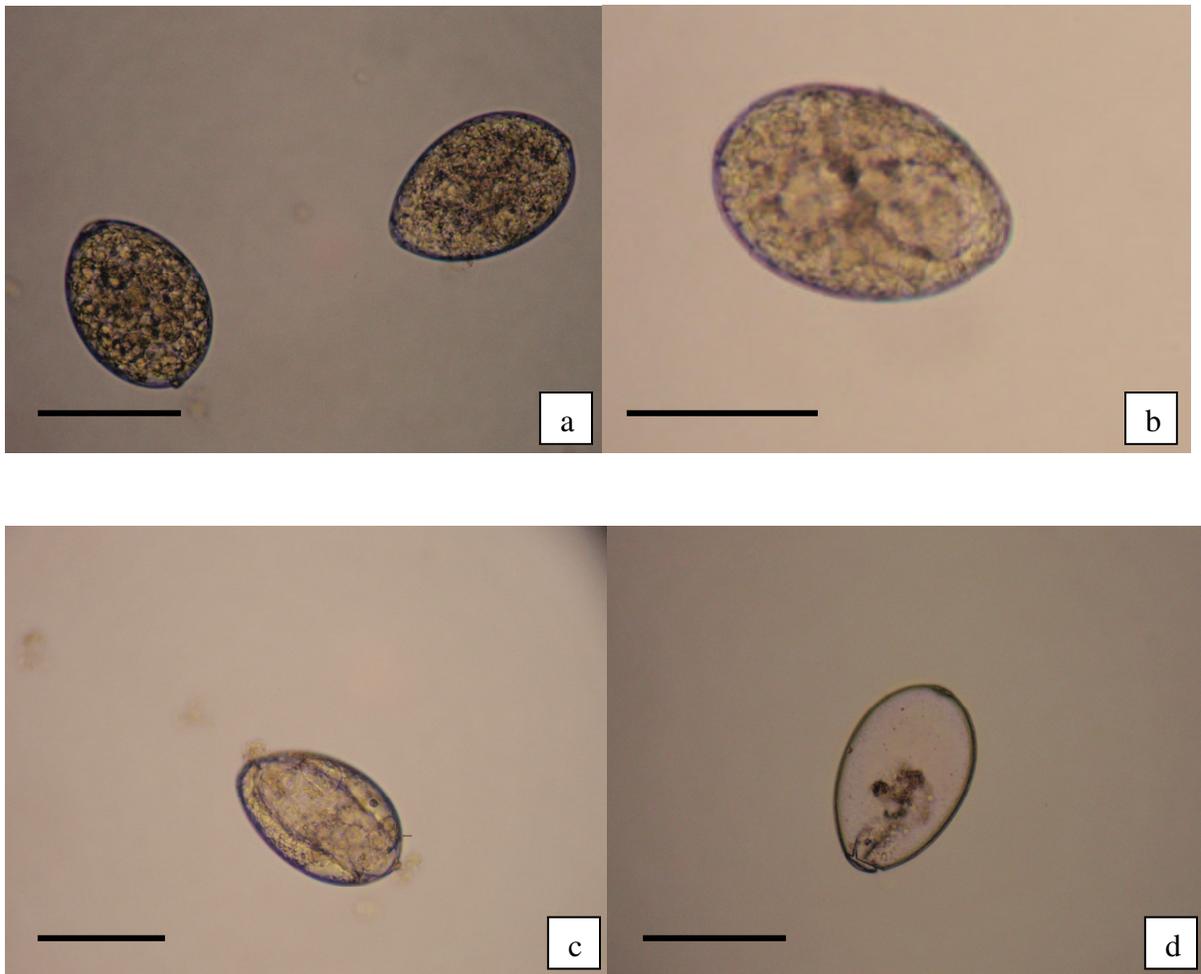


Figura 7: Ovos de obtidos a partir de infecções experimentais em *Mus musculus* infectados a partir de larva do tipo Anfistoma emergidas de exemplares de *Biomphalaria straminea* (a) ovos após postura (b) ovo 10 dias após postura (c) ovo 20 dias após postura (d) ovo após eclosão do miracídio. Escala =100  $\mu$ m.



Figura 8: Miracídio obtido a partir de ovo maduro produzidos por *Zygodontylenus limicola* através de infecções experimentais a partir de larvas do tipo Anfishoma emergidas em exemplares de *Biomphalaria straminea*. Escala =50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2 Identificação

A caracterização morfológica e morfométrica dos estágios evolutivos permitiram a identificação do parasito como *Zygodontylenus limicola*.

#### 4.4 Testes de suscetibilidade de hospedeiros intermediários

A partir de inóculo de metacercárias de *Z. limicola* em vertebrados foram obtidos ovos para experimentos em diferentes espécies de moluscos, visando sua suscetibilidade.

#### 4.4.1 Infecções em massa e individual com miracídios emergidos a partir de ovos de *Z. lunata*

A tabela 7 apresenta os resultados das infecções de moluscos criados e mantidos em laboratório. Nas infecções em massa observou-se que os descendentes de *Biomphalaria straminea* provenientes de Iguatama (Pontos 1, 2, 3 e 4) foram suscetíveis à infecção de maneira semelhante enquanto os descendentes de Recife-PE e Felixlândia- MG a taxa de infecção foi menor. Nas infecções individuais observou-se a que os descendentes de *Biomphalaria straminea* provenientes de Iguatama, dos quatro pontos de coleta assim como os descendentes de Recife-PE e Felixlândia- MG apresentaram níveis de infecções semelhantes. Já as demais espécies provenientes de Iguatama e *B. glabrata* oriunda de Belo Horizonte mostraram-se negativas durante o período avaliado, tanto para infecções em massa quanto individual. Os exemplares negativos até 90 dias após a infecção não apresentaram estágios evolutivos.

O período pré-patente nos moluscos foi em média 37 (30-45) dias. Já patência tanto em infecções em massa quanto em infecções individuais foi em torno de 180 dias.

Tabela 7: Moluscos oriundos de diferentes localidades, submetidas a infecções em massa e individual por miracídios de *Zygocotyle lunata*, período de observação e número de moluscos positivos.

Espécie	Procedência	N	Mortos antes de 30 dias		Mortos entre 30 e 90 dias		Positivos de 30 a 45 dias		
			Infetado	Controle	Infetado	Controle	Infetado	Controle	
<i>B. stramineal</i>	M	50	50	18	4	7	2	10 (20%)	0
	ponto 1	I	50	50	16	2	2	1	13 (26%)
<i>B. stramineal</i>	M	50	50	15	5	5	2	11 (22%)	0
	ponto 2	I	50	50	18	2	1	0	10 (20%)
<i>B. stramineal</i>	M	50	50	20	4	8	6	12 (24%)	0
	ponto 3	I	50	50	16	3	4	2	12 (24%)
<i>B. stramineal</i>	M	50	50	27	6	9	3	11 (22%)	0
	ponto 4	I	50	50	14	3	3	2	9 (18%)
<i>B. stramineal</i>	M	50	50	15	8	7	2	6 (12%)	0
	Recife-PE	I	50	50	12	4	2	2	9 (18%)
<i>B. straminea</i>	M	50	50	18	4	6	4	5 (10%)	0
	Felixlândia-MG	I	50	50	14	2	3	2	11 (22%)
<i>B. glabrata</i>	M	50	50	4	1	4	3	0	0
	BH	I	50	50	2	1	2	3	0
<i>B. schrammi</i>	M	50	50	5	2	6	3	0	0
	Iguatama	I	50	50	3	3	5	2	0
<i>P. marmorata</i>	M	50	50	9	10	9	7	0	0
	Iguatama	I	50	50	8	9	9	5	0
<i>P. caniculata</i>	M	50	50	2	2	3	3	0	0
	Iguatama	I	50	50	2	0	2	2	0
<i>D. anatinum</i>	M	50	50	8	9	7	5	0	0
	Iguatama	I	50	50	10	7	6	4	0

M= Massa, I= individual.

## 5 DISCUSSÃO

Desde a descrição de *Zygocotyle lunata* poucos autores investigaram a participação de moluscos na transmissão deste trematódeo. Na América do Norte o principal hospedeiro intermediário é *Helisoma trivolvis* (WILLEY, 1941), e na Argentina *Biomphalaria peregrina* foi encontrada naturalmente infectada (OSTROWSKI DE NUÑEZ *et al.*, 2003).

Entretanto até o presente momento não havia relato da ocorrência de *B. straminea* albergando naturalmente larvas de *Z. lunata* no Brasil.

No presente estudo, cercárias de *Z. lunata* foram encontradas em 14 (0,53%) exemplares de *B. straminea* oriundos de Iguatama, MG, sendo este o primeiro relato no Brasil e novo hospedeiro intermediário natural.

A suscetibilidade de moluscos à miracídios de *Z. lunata* foi também estudada por vários autores, WILLEY (1941) infectou individualmente *H. antrosa* com 1 a 15 miracídios mas nenhum moluscos apresentou infecção. Em infecções em massa com a mesma espécie de molusco a taxa de infecção foi de até 55%. A emergência cercariana ocorreu entre 32 a 49 dias após a penetração dos miracídios, com os moluscos sobrevivendo até nove meses e durante este tempo continuaram eliminando cercárias.

ETGES (1992) realizou infecções em massa em *H. anceps* de diferentes idades. Moluscos medindo entre 10-13 mm apresentaram infecções em 13%, de 10-12 mm, o percentual foi de 17%, em exemplares entre 2-3 mm a taxa de infecção foi de 17% e em moluscos medindo entre 3-5 mm, 19% apresentaram-se com infecção. A emergência cercariana foi de 46 dias após a infecção.

OSTROWSKI DE NUÑEZ *et al.* (2003) estudando a suscetibilidade de *B. straminea*, *B. orbigny*, *B. tenagophila*, *B. peregrina*, *B. oligoza*, e *B. glabrata* à infecção por *Z. lunata* verificaram que apesar da taxa de infecção variável, somente *B. glabrata* não apresentou positividade. Cercárias de *Z. lunata* começaram a emergir entre 20 a 26 dias após a infecção e a positividade dos moluscos se manteve por 6 meses. Não foram realizadas infecções em massa nestes experimentos.

No presente estudo, infecções individuais dos descendente de *B. straminea* de Iguatama, MG, de Felixlândia MG, e Recife PE apresentaram níveis de infecções semelhantes que variaram

de 18 a 26%. Os percentuais de infecção em massa foram semelhantes em todas as amostras de Iguatama MG. Em moluscos de Recife PE e Felixlândia MG, os índices de infecções foram menores com 12% e 10 % respectivamente. É possível que a intensidade de miracídios nas infecções em massa induziu uma mortalidade maior, como relatado por WILLEY (1941) que observou moluscos infectados apresentam lesões significativas nos tecidos próximos a gônada o que interfere significativamente na reprodução dos moluscos e também pode levá-lo a morte. Também no presente estudo, a emergência cercariana iniciou-se entre 30 a 45 dias (sendo maior que o observado por OSTROWSKI DE NUÑEZ *et al.* (2003) e cercárias emergiram durante cerca de 6 meses, quando os moluscos morreram.

Descendentes de outras espécies oriundas de Iguatama MG e *B. glabrata* de Belo Horizonte, avaliadas quanto a infecção em massa ou infecções individuais foram refratárias a infecção e apresentaram um baixo percentual de mortalidade. Estes moluscos, bem como *B. straminea*, estão envolvidos na transmissão de outros trematódeos na região (BARBOSA *et al.*, 2005) incluindo *Schistosoma mansoni* (BARBOSA *et al.*, 2008). No presente estudo, em exemplares de *P. marmorata* e *B. schrammi* encontrados naturalmente infectados com larvas do tipo Estrigeocercária e Equinostoma respectivamente. A ausência de infecção por *Z. lunata* nas espécies estudadas provavelmente está relacionada a especificidade na interação, incluindo os fatores biológicos do parasito e do hospedeiro.

FERREL *et al.* (2001) testaram a influência da temperatura em metacercárias mantidas durante 30 dias em temperaturas que variaram de 0 a 37 °C em infecções experimentais a grupos de 5 e 10 camundongos. Aos 17 dias após a infecção, os animais foram mortos. Não foram recuperados parasitos em camundongos infectados com metacercárias mantidas a 0° e 37°C por 30 dias. Em infecções com metacercárias mantidas a temperaturas de 3 °C, 25 °C e 31 °C por trinta dias o percentual de recuperação dos parasitos foi semelhante (22,2%, 19,2% e 20,4% respectivamente). Metacercárias podem permanecer viáveis por até um ano se mantidas a temperatura de 5 °C e posteriormente serem utilizadas em infecções experimentais (PEOPLES & FRIED, 2008).

A viabilidade de metacercárias mantidas em temperatura ambiente foi testada por WILLEY (1941) que utilizou metacercárias encistadas de diferentes dias para infecções experimentais com ratos. Em infecções a grupos de 25 ratos com 10 metacercárias de 86 dias após o encistamento foram recuperados 8 parasitos no total. Em infecções com 50 metacercárias

de 130 dias após o encistamento, foram recuperados 23 parasitos no total. Em infecções com 50 metacercárias de 152 dias após o encistamento, não foram recuperados parasitos e em infecções com 150 metacercárias de 166 dias após o encistamento também não foram recuperados parasitos.

No presente estudo, em infecções com 20 metacercárias de 1, 30, 90 e 120 dias após o encistamento, foi observado que nas infecções com as larvas encistadas por mais tempo o número total de parasitos recuperados foi menor (5), no total. Nos grupos infectados com metacercárias de 1, 30 e 90 dias o número de parasitos recuperados foi semelhante (10, 15 e 11 respectivamente) no total. O tempo maior de encistamento (120) dias influenciou no número de parasitos recuperados e metacercárias de 150 dias após o encistamento, não produziram parasitos. Provavelmente isto ocorreu porque as metacercárias mantidas em temperatura ambiente, nas condições do presente estudo, por mais tempo poderiam estar inviáveis para infecção.

HUFFMAN *et al.* (1991), infectaram camundongos ratos e hamsters com metacercárias de *Z. lunata* e o período pré-patente variou de 21 a 44 dias. Os parasitos adultos foram recuperados na região do ceco. Hamsters apresentaram o maior percentual de infecção (31%), seguido por ratos (16,5%) e camundongos (13%).

No presente estudo, em infecções experimentais com 20 metacercárias a grupo de 5 exemplares de *Mus*, *Gallus* e *Meriones* os resultados foram semelhantes ao obtido por WILLEY (1941). Em infecções experimentais com 10 e 30 metacercárias em grupos de 5 exemplares de *M. musculus*, foi observado que nas infecções com menor número de metacercárias, o percentual de parasitos recuperados foi menor (6%), nas infecções com maior número de metacercárias recuperou-se maior percentual de parasitos (22%). O período pré-patente foi semelhante aos grupos, sendo em média 33 dias (30-36). O tamanho na diferença destes parasitos provavelmente está relacionada a competição, uma vez que maior o número de parasitos na mesma região, (ceco) competindo por alimento poderá ocasionar desenvolvimento menor, em relação a infecções com menor número de parasitos, podendo, assim ocorrer diferenças no comprimento, largura e tamanho das estruturas internas. PRICE (1928) ao estudar parasitos de aves e mamíferos verificou tamanhos diferentes dos mesmos. De fato variações consideráveis no crescimento de *Z. lunata* em hospedeiros da mesma espécie, dependendo do número de parasitos recuperados, foram observados por (WILLEY, 1941).

Em *Gallus* e *Meriones* as medidas dos parasitos foram semelhantes assim como o período pré- patente (30-35dias).

Nas infecções em mamíferos (*Meriones* e *Mus*) verificou-se 100% de infecção com uma média de 4,2 e 4 parasitos, respectivamente, por animal, enquanto em *Gallus* somente três aves apresentaram parasitos, com uma média de 1,4 parasitos recuperados. Na necropsia dos animais experimentalmente infectados os órgãos dos animais aparentemente estavam normais, o ceco não apresentava pontos hemorrágicos, corroborando os dados de (FRIED & NELSON, 1978). Estudos visando um melhor conhecimento da interação entre parasito hospedeiro ainda carecem de estudos.

Quanto ao efeito da dexametasona, nas infecções em *M. musculus*, não foi verificado se a permanência da infecção parasitária seria ou não mais prolongada nos animais imunossuprimidos em relação ao grupo controle, tendo em vista que os roedores permanecem infectados por longo período de tempo. Entretanto a administração de glicocorticóide a camundongos promoveu uma recuperação de maior quantidade de parasitos em relação ao controle. É possível que a diferença verificada entre os animais tratados e controle, possa estar relacionada, ao efeito do fármaco que inclusive possa ter interferido na viabilidade das metacercárias utilizadas. De fato, quando metacercárias mais jovens são utilizadas para inóculo em animais sem tratamento, uma maior quantidade de parasitos é recuperada. Neste sentido, somente novos estudos utilizando metacercárias de diferentes idades poderão aclarar esses resultados preliminares.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir:

*Mus musculus*, *Meriones unguiculatus* e *Gallus gallus domesticus* são suscetíveis a infecção por *Zygodontia albicollis* originados de Iguatama.

*Biomphalaria straminea* oriunda de Iguatama é hospedeiro intermediário natural de *Z. albicollis* na região.

Descendentes de *Biomphalaria straminea* de Iguatama MG, Felixlândia MG e Recife, PE são suscetíveis a infecção por *Z. albicollis*.

Descendentes de *Physa marmorata*, *Drepanotrema anatinum*, *B. schrammi*, oriundos de Iguatama e *B. glabrata* de Belo Horizonte MG, são refratários até então a infecção por *Z. albicollis*.

Metacercárias mantidas em temperatura ambiente durante 150 dias não são infectantes para *Mus musculus*.

O tratamento por dexametasona favorece a infecção por *Z. albicollis* em camundongos da linhagem AKR/J.

Este é o primeiro registro de *B. straminea* como hospedeiro natural de *Z. albicollis*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, F. S.; FARIA, M. T.; SANTOS, E. A. Primeiro relato de *Biomphalaria straminea* infectada naturalmente por larvas de *Schistosoma mansoni* em Iguatama, Minas Gerais, Brasil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS, XI, Salvador. *Resumos do XI International Symposium on Schistosomiasis*, p. 200, 2008.

BARBOSA, F. S.; PINTO, H. A.; SOUZA, M. A. A.; MELO, A. L. Infecção natural de *Biomphalaria schrammi* oriundas da região central de Minas Gerais (Iguatama e Dores do Indaiá) por larvas de trematódeos digenéticos. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, XIX, Rio de Janeiro. *Resumos do XIX Encontro Brasileiro de Malacologia*, p. 376, 2005.

BELLROSE, F. C. Ducks, geese and swans of North America. *Harrisburg, Stackpole Books*, p. 543, 1976.

BERGER, H. The morphology and development of redial and cercarial stages of *Zygocotyle lunata*. *Journal of Parasitology*, v. 55, p. 27-30, 1957.

BRODERSON, D.; CANARIS, A. G.; BRISTOL, J. R. Parasites of waterfowl from southwest Texas: II. The shoveler, *Anas clypeata*. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 13, p. 435-439, 1977.

BUSCHER, H. N. Dynamics of the intestinal fauna in three species of ducks. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 29, p. 772-781, 1965.

CANARIS, G.; MENA, A. C.; BRISTOL, J. R. Parasites of waterfowl from southwest Texas: III. The green-winged teal, *Anas crecca*. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 17, p. 57-64, 1986.

CHAIA, G. Técnica para concentração de miracídios. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 8, p. 355-357, 1956.

- COWAN, I. T. Death of a trumpeter swan from multiple parasitism. *AUK, Journal of Ornithology*, v. 17, p. 248-249, 1946.
- DIESING, K. M. Monographie der gattungen *Amphistoma* und *Diplodiscus*. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, v. 1, p. 235-260, 1836.
- DIGIANI, M. C. El cisne de cuello negro *Cygnus melancoryphus*: Nuevo hospedador de *Zygocotyle lunata* (Diesing) (Trematoda: Paramphistomidae). *Neotropica*, v. 43, p. 84, 1997.
- DROBNEY, R. D.; TRAIN, C. T.; FREDRICKSON, L. H. Dynamics of platyhelminth fauna of wood ducks in relation to food habitats and reproductive state. *Journal of Parasitology*, v. 69, p. 375-380, 1983.
- ETGES, F. J. *Zygocotyle lunata*, laboratory maintenance in snails and mice. *Journal of Helminthology*, v. 59, p. 22-24, 1992.
- FARIAS, J. D.; CANARIS, A. G. Gastrointestinal helminthes of the Mexican ducks (*Anas platyhynchos diazi*) from north central Mexico an southwester United State. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 22, p. 51-54, 1986.
- FERRELL, D. L.; NEGOVETICH, N. L.; WETZZEL, E. J. The effect of temperature on the infectivity of metacercarie of *Zygocotyle lunata* (Digenea: Paramphistomidae). *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 10-13, 2001.
- FREITAS, J. R. *Ritmo de crescimento da Biomphalaria glabrata (Say, 1818) padronização da técnica de criação*. 108 f. (Tese de doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1973.
- FRIED, B.; FRAZER, B. A.; LEE, M. S.; SHERMA, J. Thin-layer chromatography and histochemistry analyses of neutral lipids in *Helisoma trivolvis* infected with species of larval trematodes. *Parasitology Research*, v. 84, p. 369-373, 1998.

FRIED, B.; HUFFMAN, J.; KEELER, S; PEOPLES, R. C. The biology of the caecal trematode *Zygodontia olivacea*. *Advances in Parasitology*, v. 69, p. 1-40, 2009.

FRIED, B.; NELSON, P. D. *In vivo* and *in vitro* excystation of *Zygodontia olivacea* (Trematoda) metacercariae and histochemical observations on the cyst. *Journal of Parasitology*, v. 64, p. 395-397, 1978.

FRIED, B.; PEOPLES, R. C.; SAXTON, T. M.; HUFFMAN, J. E. The association of *Zygodontia olivacea* and *Echinostoma trivolvis* with *Chaetogaster limnaei*, an ectosymbiont of *Helisoma trivolvis*. *Journal of Parasitology*, v. 94, p. 553-554, 2008.

HUFFMAN, J. E.; SABOL, C.; FRIED, B. Infectivity, growth, survival, and pathogenicity of *Zygodontia olivacea* (Trematoda) in experimental rodent host. *Journal of Parasitology*, v. 77, p. 280-284, 1991.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Municípios Brasileiros*. Disponível em <[www.ibge.gov.br/cidadesat/default.pbh](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.pbh)>2009. Acesso em 30 de dezembro de 2010.

JONES, A. Family Zygodontidae. In JONES, A.; BRAY, R. A.; GIBSON, D. I. *Keys to the Trematoda* London U. K. v. 2, p. 353-366, 2005.

JOYNER, S.; McDANIEL, J. S. Histology observation on mice infected with *Zygodontia olivacea*. *Journal of the Elisha Mitchell Society*, v. 86, p. 184, 1970.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 14, p. 95- 103, 1919.

MALEK, E. A. Laboratory guide and notes for medical malacology. *Burgess Publishing Company* Mineapolis. U. S. A. p.154 1962.

MELO, A. L. Formas larvais de trematódeos encontradas em moluscos límnicos. In: AMARAL, R. S.; THIENGO, S. C.; PIERI, O. S. (Ed.) *Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)*, 2 Ed., cap. 5, p. 71-80, 2008.

MELO, A. L. *Tópicos em Parasitologia: Procedimentos rotineiros utilizados para manutenção, colheita, fixação, coloração, montagem, identificação de helmintos e alguns vetores de doenças parasitárias*. Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 130 f. 2009.

METTRICK, D. F. *Zygodontia lunata*. A re-description of *Zygodontia lunata* (Diesing, 1836) Stunkard, from *Anas platyrhynchos domesticus* in southern Rhodesia. *Journal of Agricultural Research*, v. 56, p. 197-198, 1959.

McDONALD, M. E. Key to trematodes reported in waterfowl. Resource publication United States. Department of the Interior. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 1, p. 142, 1981

MOHR, L. V. *Helmintofauna do marrecão, Netta peposaca (Vieillot, 1816) e da marrecacaneleira Dendrocygna bicolor (Vieillot, 1816) no Rio Grande do Sul*. 106 f (Tese de mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

MÜLLER, G.; RIBEIRO, P. B.; COSTA, P. R. P. *Zygodontia lunatum* (Diesing, 1836) Stunkard 1917 (trematoda, Paramphistomidae) em marrecão (*Netta peposaca*) no Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 35, p. 925-928, 1983.

NASCIMENTO, C. G.; NASCIMENTO, A. A.; MAPELI, J. H. T.; DUARTE, J. M. B. HOPPE, E. G. L. Natural infection by Paramphistomoidea Stiles and Goldberger, 1970 trematodes in wild marsh deer (*Blastocerus dichotomus* Illiger, 1815) from Sérgio Mottas's hydroelectric power station flooding area. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, p. 133-137, 2006.

NEGOVETICH, N. J.; ESCH, G. W. Long-term analysis of Charlie's Pond: Fecundity and trematode communities of *Helisoma anceps*. *Journal of Parasitology*, v. 93, p. 1311-1318, 2007.

OSTROWSKI DE NUÑEZ, M.; SPATZ, L.; CAPPA, S. M. G. New intermediate host in the life cycle of *Zygocotyle lunata* in South America. *Journal of Parasitology*, v. 89, p. 193-194, 2003.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, v. 55, p. 105-127, 1975.

PARAENSE, W. L.; DESLANDES, N. Observations on the morphology of *Australorbis nigricans*. *Memórias Instituto do Oswaldo Cruz*, v. 53, p. 121-124, 1955.

PEOPLES, R. C.; FRIED, B. The effects of various chemical and physical factors on encystment and excystment of *Zygocotyle lunata*. *Parasitology Research*, v. 103, p. 669-671, 2008.

PINTO, H. A. *Infecção natural de Melanoides tuberculata (Mollusca: Thiaridae) por Centrocestus formosanus (Trematoda: Heterophyidae) e por Philophthalmus gralli (Trematoda: Philophthalmidae) no Brasil*. 99 f (Dissertação em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

PRICE, E. W. The host relationships of the trematode genus *Zygocotyle lunata*. *Journal of Agricultural Research*, v. 36, p. 911-914, 1928.

PURVES J. R.; GAWLIK, D. E.; DRONEN, N. O.; SILVY, N. J. Helminths of wintering geese in Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 33, p. 660-663, 1997.

ROBBINS, S. H.; HAMMETT, M.; FRIED, B. Light and transmission electron microscopical studies and amino acid of the metacercarial cysts of *Zygocotyle lunata* (Trematoda). *Journal of Parasitology*, v. 9, p. 257-260, 1979.

RUIZ, J. M. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematóides brasileiros. 2. Fauna de Santos, Estado de São Paulo. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 24, p. 17-36, 1952.

SCHMIDT, K. A.; FRIED, B. Prevalence of larval trematodes in *Helisoma trivolvis* (Gastropoda) from a farm pond in Northampton County, Pennsylvania with special emphasis on *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) cercariae. *Journal of Parasitology*, v. 64, p. 157-157, 1997.

SHAW, M. G.; KOCAN, A. A. Helminth fauna of waterfowl in central Oklahoma. *Journal of Parasitology*, v. 16, p. 59-64, 1980.

SILVA, R. E. *Estudo malacológico da bacia hidrográfica do Lago Soledade (Ouro Branco, MG): Testes de suscetibilidade com os transmissores do Schistosoma mansoni e caracterização das larvas de trematódeos emergentes de moluscos*. 149 f. (Tese de mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

SOUZA, M. A. A. *Levantamento malacológico, aspectos ecológicos e mapeamento das áreas de risco para transmissão da esquistossomose mansoni no município de Mariana, Minas Gerais*. 152 f. (Tese de doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

STUNKARD, H. W. Studies on north American Polystomidae, Aspidogastridae and Paramphistomidae. *Illinois Biological Monographs*, v. 3, p. 287-395, 1917.

SUTTON, C. A.; LUNASCHI, L. I. Sobre algunos digeneos hallados en vertebrados silvestres argentinos. *Neotropica*, v. 33, p. 89-95. 1987.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. F. T.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 67, p. 1-886, 1969.

WILLEY, C. H. The morphology of the amphistome cercaria, *Cercaria poconensis* from the snail *Helisoma antrosum*. *Journal of Parasitology*, v. 22, p. 68-75, 1936.

WILLEY, C. H. The life history and bionomics of the trematode, *Zygocotyle lunata* (Paramphistomidae). *Zoologica*, v. 26, p. 65-92 1941.

YAMAGUTI, S. *Systema helminthum*: v. 1 Digenetic Trematodes. New York: Interscience Pub. Inc. p. 979, 1958.