

LEONARDO HOFFMANN LEÃO COELHO

***Lymnaea columella*: DINÂMICA DE POPULAÇÕES EM  
ITAJUBÁ, MG, E SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO POR  
*Fasciola hepatica* EM ASSOCIAÇÕES SIMPÁTRICAS E  
ALOPÁTRICAS ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO**

2007

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

LEONARDO HOFFMANN LEÃO COELHO

***Lymnaea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae): DINÂMICA DE POPULAÇÕES EM ITAJUBÁ, MINAS GERAIS, E SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO POR *Fasciola hepatica* (Digenea: Fasciolidae) EM ASSOCIAÇÕES SIMPÁTRICAS E ALOPÁTRICAS ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de doutor em ciências

Área de concentração:  
helminologia

ORIENTADOR: Marcos Pezzi  
Guimarães:

CO-ORIENTADOR: Walter dos  
Santos Lima

Belo Horizonte  
UFMG

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

2007

## AGRADECIMENTOS

Um grande número de pessoas colaborou para a elaboração desta tese, portanto, para que esta lista de agradecimentos não seja excessivamente grande, serão citadas apenas as pessoas que colaboraram de forma mais efetiva.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, e um agradecimento especial aos seguintes:

- Aos professores Marcos Pezzi Guimarães e Walter dos Santos Lima, pela orientação e pelo auxílio na conclusão da tese.
- À profa. Mariângela Carneiro, pela ajuda na parte estatística.
- Ao Prof. Alan Lane de Melo, por ajudar na parte dos moluscos.
- Ao Prof. Múcio F. B. Ribeiro, pela valiosa ajuda no exame de qualificação.
- À técnica de laboratório Maria do Socorro.
- À estagiária Viviane Medeiros de Almeida.
- À secretária da pós-graduação, Sumara A. G. Ferreira, por toda a ajuda prestada.

Além dos colegas do Departamento de Parasitologia, eu gostaria de agradecer:

- Aos proprietários de terras de Itajubá, MG, por permitir a realização das coletas em suas propriedades e em seus animais
- Ao Darcy, do depto. De Fisiologia do ICB, UFMG, por fornecer os coelhos
- À dra. Gertrud Müller, da Universidade Federal de Pelotas, por ter fornecido *Lymnaea columella* e ovos de *Fasciola hepatica* provenientes de Pelotas, RS, para os experimentos de associações simpátricas/alopátricas
- À profa. Teofânia, do depto. De Zoologia do ICB-UFMG, por ter fornecido *Lymnaea columella* proveniente de Fortaleza, CE, e de Rio Doce, MG.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## RESUMO

No período de maio de 2003 a abril de 2006, foram pesquisadas a dinâmica de populações de *Lymnaea columella* e sua taxa de infecção natural por *Fasciola hepatica* em uma várzea no município de Itajubá, Minas Gerais. Uma criação do molusco foi estabelecida no laboratório a partir de posturas dos espécimes coletados, visando a manutenção do ciclo do parasito e a realização de infecções experimentais. Testes de suscetibilidade foram realizados para verificar a influência de diversos fatores: o efeito da variação do tamanho da concha, do número de miracídios utilizados para a infecção, a eficiência de associações simpátricas e alopátricas do helminto com o hospedeiro intermediário, a suscetibilidade de moluscos provenientes de cinco localidades diferentes (Itajubá, MG, Jaboticatubas, MG, Rio Doce, MG, Pelotas, Rio Grande do Sul, e Fortaleza, CE) e a suscetibilidade de moluscos expostos a miracídios obtidos a partir de ovos provenientes de hospedeiros bovinos e coelhos. Foi verificado se o molusco *Physa marmorata* proveniente de Itajubá se infecta experimentalmente com *F. hepatica*. Foi observado um padrão na variação de populações de *L. columella*. As populações mostraram um aumento entre os meses de junho e outubro, e uma diminuição nos meses seguintes. A taxa média de infecção natural de *L. columella* com *F. hepatica* foi de 1,7%, sendo que o mês de maior prevalência foi dezembro de 2004 (18,8%). Moluscos com menor tamanho de concha apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *F. hepatica*. Não foi observada uma relação entre o número de miracídios e o sucesso da infecção, utilizando-se de 1 a 4 miracídios. Foram encontradas diferenças entre as suscetibilidades de moluscos provenientes de diversas localidades, sendo que os moluscos de Jaboticatubas, MG, apresentaram a maior suscetibilidade entre os moluscos testados, e os moluscos de Pelotas, RS, a menor. Associações alopátricas foram mais eficientes em moluscos de Pelotas, mas menos eficientes nos de Itajubá. Não foram encontradas formas larvárias de *F. hepatica* nos espécimes de *P. marmorata* expostos a miracídios do trematódeo. O ciclo da *Fasciola hepatica* foi fechado em laboratório em coelhos. Os moluscos infectados com miracídios provenientes de hospedeiros bovinos apresentaram maior número de positivos que os infectados com miracídios provenientes de coelhos, mas a média do número de cercarias e rédias obtida foi menor.

## ABSTRACT

Population dynamics of *Lymnaea columella* and its rate of natural infection with *Fasciola hepatica* were researched in a lowland area near the city of Itajubá, MG, between May, 2003, and April, 2006. Snails from the study site were reared in the laboratory, in order to maintain its lifecycle and to perform experimental infections. Infectivity tests were carried out to verify the influence of several factors: shell size variation, number of miracidia used in the infection, the efficiency of sympatric and allopatric associations between the helminth and its intermediate host, the infectivity of snails from five different places (Itajubá, MG, Jaboticatubas, MG, Rio Doce, MG, Pelotas, RS, and Fortaleza, CE) and the infectivity of snails exposed to miracidia obtained from rabbits and cattle. An attempt to infect the snail *Physa marmorata* with *F. hepatica* was also carried out. A pattern in the variation of populations of *L. columella* was observed. Snail populations increased between June and October, and decreased in the following months. Mean monthly rate of natural infection was 1,7%, with the highest rate observed in December, 2004 (18,8%). Snails with smaller shell size appeared to be more susceptible to infection with *F. hepatica*. No relation was found between the number of miracidia and their infectivity, by using 1-4 miracidia. Differences were found among the infectivity of snails from different places. Snails from Jaboticatubas, MG, showed the highest infection rates, whereas snails from Pelotas, RS, showed the lowest ones. Allopatric associations were more effective in the snails from Pelotas, but less effective in the snails from Itajubá. No larval stages of *F. hepatica* were found in *P. marmorata*. *Fasciola hepatica* lifecycle was maintained in rabbits. Snails infected with miracidia obtained from cattle showed higher infection rate than the ones infected with miracidia obtained from rabbits, but the means of rediae and cercariae per infected snail were lower.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Localização do município de Itajubá, MG-----	42
Figura 2- Localização da área de trabalho no município de Itajubá, MG -----	43
Figura 3- Localização dos cinco pontos de amostragem na área de trabalho 1=P1, 2=P2, 3=P3, 4=P4 e 5=P5-----	44
Figura 4- Aspecto da área de trabalho- Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	44
Figura 5- Canal de drenagem. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	45
Figura 6- Verificação da presença de moluscos. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	47
Figura 7- Canal 3 após limpeza, março de 2004. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	61
Figura 8- Várzea inundada-Dezembro de 2004. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	62

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	
Descrição dos canais onde foram estabelecidos os pontos de amostragem, com as coordenadas geográficas (UTM) obtidas de GPS, número de meses em que foi limpa, durante o trabalho (NML), os meses em que ocorreu a limpeza e os anos em que foram limpos (AL) várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	62
TABELA 2	
Variação das populações de gastrópodes nos pontos de amostragem de maio de 2003 a abril de 2006- várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	64
TABELA 3	
Número de exemplares de <i>Lymnaea columella</i> coletadas nos cinco pontos de amostragem de maio de 2003 a abril de 2006 várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	65
TABELA 4	
Coefficientes de correlação (r) entre as populações de <i>Lymnaea columella</i> nos pontos de amostragem- várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG-----	66
TABELA 5	
Coefficientes de correlação observados na comparação entre as variações de populações das diferentes espécies de gastrópodes presentes no local de estudo-----	68
TABELA 6	
Número de moluscos coletados, número de indivíduos naturalmente infectados e taxa de infecção natural de <i>L. columella</i> na área de estudo-----	72
TABELA 7	
Comparação entre os resultados das infecções de <i>Lymnaea columella</i> com <i>Fasciola hepatica</i> nas sete categorias de tamanho testadas-----	73
TABELA 8	
Resultados da regressão logística binária: Médias x categoria de tamanho---	74
TABELA 9	
Resultados da regressão logística binária: cercárias x categoria de tamanho	75
TABELA 10	
Frequência de infecção de <i>Lymnaea columella</i> com diferentes números de miracídeos de <i>Fasciola. hepatica</i> . -----	75
TABELA 11	
Comparação da suscetibilidade de <i>Lymnaea columella</i> proveniente de diferentes localidades-----	77
TABELA 12	
Comparação de Fortaleza (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes: -----	78
TABELA 13	
Comparação de Rio Doce (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes: -----	79
TABELA 14-Comparação de Pelotas (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes: -----	79

TABELA 15-Comparação de Jaboticatubas (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes-----	80
TABELA 16	
Comparação de Itajubá (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes: -----	80
TABELA 17	
Comparação de Fortaleza (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes: -----	81
TABELA 18	
Comparação de Rio Doce (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes-----	81
TABELA 19	
Comparação de Pelotas (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes: -----	81
TABELA 20	
Comparação de Jaboticatubas (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes-----	82
TABELA 21	
Comparação de Itajubá (localidade de referência) com as demais localidades através do teste de Poisson. Coeficientes: -----	82
TABELA 22	
Comparação dos resultados das infecções em associações simpátricas de <i>Lymnaea columella</i> com <i>Fasciola hepatica</i> (Parasito de Itajubá x hospedeiro de Itajubá) e alopátricas (Parasito de Itajubá x hospedeiro de Pelotas; parasito de Pelotas x hospedeiro de Itajubá). -----	83
TABELA 23	
Comparação através do modelo de regressão logística da associação simpátrica de <i>Lymnaea columella</i> com <i>Fasciola hepatica</i> de Itajubá (CMG/FMG, associação de referência) com as demais associações: <i>L. columella</i> de Pelotas com <i>F. hepatica</i> de Pelotas (CRS/FRS), <i>L. columella</i> de Pelotas com <i>F. hepatica</i> de Itajubá (CRS/FMG), , <i>L. columella</i> de Itajubá com <i>F. hepatica</i> de Pelotas (CMG/FRS) -----	83
TABELA 24	
Comparação através do modelo de regressão logística da associação simpátrica de <i>Lymnaea columella</i> com <i>Fasciola hepatica</i> de Pelotas (CRS/FRS, associação de referência) com as demais associações: <i>L. columella</i> de Itajubá com <i>F. hepatica</i> de Itajubá (CMG/FMG), <i>L. columella</i> de Pelotas com <i>F. hepatica</i> de Itajubá (CRS/FMG), , <i>L. columella</i> de Itajubá com <i>F. hepatica</i> de Pelotas (CMG/FRS) -----	83
TABELA 25	
Comparação através do modelo de regressão logística da associação alopátrica de <i>Lymnaea columella</i> de Pelotas com <i>Fasciola hepatica</i> de Itajubá (CRS/FMG, associação de referência) com as demais associações: <i>L. columella</i> de Itajubá com <i>F. hepatica</i> de Itajubá (CMG/FMG), <i>L. columella</i> de Pelotas com <i>F. hepatica</i> de Pelotas (CRS/FRS), , <i>L. columella</i> de Itajubá com <i>F. hepatica</i> de Pelotas (CMG/FRS) -----	84

## TABELA 26

Comparação através do modelo de regressão logística da associação alopátrica de *Lymnaea. columella* de Itajubá com *Fasciola hepatica* de Pelotas (CMG/FRS, associação de referência) com as demais associações: *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Itajubá (CMG/IMG), *L. columella* de Pelotas com *F. hepatica* de Pelotas (CRS/FRS), , *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Pelotas (CMG/FRS) ----- 84

## TABELA 27

Comparação dos resultados das infecções experimentais de *Lymnaea columella* com miracídios de *Fasciola hepatica* obtidos de ovos provenientes de bovinos e coelhos----- 87

## TABELA 28

Coefficientes do modelo de regressão logística, obtidos a partir da comparação do número de rédias----- 88

## TABELA 29

Coefficientes do modelo de regressão logística, obtidos a partir da comparação do número de cercárias----- 88

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Variação mensal de precipitação e temperatura de maio de 2003 a abril de 2004-----	59
Gráfico 2- Variação mensal de precipitação e temperatura de maio de 2004 a abril de 2005-----	60
Gráfico 3- Variação mensal de precipitação e temperatura de maio de 2005 a abril de 2006-----	60
Gráfico 4- Variação da população de <i>Lymnaea columella</i> nos cinco pontos de amostragem de maio de 2003 a abril de 2004-----	67
Gráfico 5- Variação da população de <i>Lymnaea columella</i> nos cinco pontos de amostragem de maio de 2004 a abril de 2005-----	67
Gráfico 6- Variação da população de <i>Lymnaea columella</i> nos cinco pontos de amostragem de maio de 2005 a abril de 2006-----	67
Gráfico 7- Comparação da variação das populações de gastrópodes de maio de 2003 a abril de 2004-----	68
Gráfico 8- Comparação da variação das populações de gastrópodes de maio de 2004 a abril de 2005-----	69
Gráfico 9- Comparação da variação das populações de gastrópodes de maio de 2005 a abril de 2006-----	69
Gráfico 10- Variação das médias das medidas de conchas de <i>Lymnaea columella</i> no período de maio de 2003 a abril de 2004-----	71
Gráfico 11- Variação das médias das medidas de conchas de <i>Lymnaea columella</i> no período de maio de 2004 a abril de 2005-----	71
Gráfico 12- Variação das médias das medidas de conchas de <i>Lymnaea columella</i> no período de maio de 2005 a abril de 2006-----	71
Gráfico 13- Taxa de crescimento de <i>Lymnaea columella</i> livre de infecção e infectada por <i>Fasciola hepatica</i> -----	86
Gráfico 14- Sobrevivência de <i>Lymnaea columella</i> livre de infecção e infectada por <i>Fasciola hepatica</i> -----	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

UTM- Universal Transverse Mercator

NML- Número de Meses em que foram limpos

AL- Anos em que foram limpos

CRS/FMG- associação alopátrica entre *Lymnaea columella* de Pelotas e *Fasciola hepatica* de Itajubá

CMG/FMG- associação simpátrica entre *Lymnaea columella* de Itajubá e *Fasciola hepatica* de Itajubá,

CRS/FRS- associação simpátrica entre *Lymnaea columella* de Pelotas com *Fasciola hepatica* de Pelotas,

CMG/FRS- associação alopátrica entre *Lymnaea columella* de Itajubá e *Fasciola hepatica* de Pelotas

**pdfMachine** - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1- E-mail de aceitação do trabalho "Influence of shell size of *Lymnaea columella* on infectivity and development of *Fasciola hepatica*" no periódico "Journal of Helminthology"

ANEXO 2- Trabalho "Influence of shell size of *Lymnaea columella* on infectivity and development of *Fasciola hepatica*" aceito para publicação pelo Journal of Helminthology

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO-----	16
2- REVISÃO DE LITERATURA-----	20
2.1-Histórico da <i>F. hepatica</i> e de seus hospedeiros intermediários-----	20
2.1.1- Descoberta do Ciclo de vida, na Europa-----	20
2.1.2- Na América do Sul-----	21
2.1.3-No Brasil-----	23
1.4- No estado de Minas Gerais-----	25
2.2- <i>Lymnaea</i> spp. como hospedeiro intermediário de <i>F. hepatica</i> -----	26
2.3- Infecção natural de <i>F. hepatica</i> em populações de <i>Lymnaea</i> -----	33
3- JUSTIFICATIVA-----	39
4- OBJETIVOS-----	40
4.1- Objetivo geral-----	40
4.2- Objetivos específicos-----	40
5- METODOLOGIA-----	42
5.1-Local de estudo-----	42
5.2- Dados meteorológicos-----	45
5.3-Coleta dos moluscos-----	46
5.4- Identificação das espécies de moluscos-----	48
5.5- Infecções experimentais-----	48
5.5.1-Criação de <i>Lymnaea</i> livre de infecção-----	48
5.5.2- Obtenção dos ovos de <i>F. hepatica</i> -----	49
5.5.3-Obtenção de miracídios-----	50
5.5.4- Infecção dos moluscos -----	51
5.5.5- Exame dos moluscos-----	51
5.5.6- Testes de suscetibilidade-----	51
5.5.6.1- Influência da variação do tamanho da concha na suscetibilidade-----	51
5.5.6.2- Efeito do número de miracídios-----	52
5.5.6.3- Comparação entre moluscos provenientes de diferentes localidades-----	52
5.5.6.4- Associações simpátricas e alopátricas de <i>F. hepatica</i> com <i>L. columella</i> -----	53
5.5.6.5- Infecção de <i>Physa marmorata</i> -----	54
5.6- Manutenção do ciclo de <i>F. hepatica</i> em coelhos-----	54
5.6.1- Infecção dos moluscos-----	54
5.6.2-Obtenção de metacercárias-----	55
5.6.3- Infecção de coelhos com metacercárias de <i>F. hepatica</i> -----	55
5.6.4- Comparação da viabilidade de miracídios obtidos de ovos provenientes de bovinos e coelhos-----	56
5.7- Análise Estatística-----	56
6- RESULTADOS-----	59
6.1- Variações climáticas e alterações no habitat dos moluscos-----	59
6.1.1- variação nas médias mensais de temperatura e precipitação-----	59
6.1.2- Alterações observadas nos canais de drenagem-----	60

6.2- Identificação das espécies de moluscos-----	63
6.3- Coleta dos moluscos-----	63
6.3.1- Variações das populações de moluscos-----	63
6.3.2- Variação das populações de <i>L. columella</i> -----	65
6.3.2.1- Comparação entre os pontos de amostragem-----	65
6.3.2.2- Comparação com populações de outros gastrópodes-----	68
6.3.2.3- Correlações entre populações de <i>L. columella</i> e dados climáticos----	69
6.3.3- Taxa de infecção natural de <i>L. columella</i> com <i>F. hepatica</i> -----	72
6.4- Resultado das infecções experimentais-----	73
6.4.1- Influência do tamanho da concha de <i>L. columella</i> na infecção experimental-----	73
6.4.2- Efeito do número de miracídios-----	76
6.4.3- Comparação da suscetibilidade de moluscos provenientes de diferentes localidades-----	77
6.4.3.1- Comparação da suscetibilidade à infecção por <i>F. hepatica</i> -----	77
6.4.3.2- Comparação do número de rédias e cercarias obtidos de moluscos de diferentes localidades-----	78
6.4.4- Associações simpátricas/alopátricas de <i>F. hepatica</i> com <i>L. columella</i> --	82
6.4.5- Infecção experimental de <i>Physa marmorata</i> -----	85
6.5- Manutenção do ciclo de <i>F. hepatica</i> em animais de laboratório-----	85
6.5.1- Comparação entre crescimento e mortalidade dos moluscos infectados e isentos de infecção-----	87
6.5.2-Comparação da suscetibilidade de <i>L. columella</i> exposta a miracídios de <i>F. hepática</i> obtidos de ovos provenientes de bovinos e coelhos-----	87
7-DISCUSSÃO-----	90
7.1- Dinâmica da população dos moluscos-----	90
7.2Taxa de infecção natural de <i>F. hepatica</i> em <i>L. columella</i> -----	94
7.3- Criação de <i>L. columella</i> -----	95
7.4- Influência da variação do tamanho na suscetibilidade-----	96
7.5- Efeito do número de miracídios-----	97
7.6-Comparação da suscetibilidade de <i>L. columella</i> proveniente de diferentes locais-----	97
7.7-Eficiência de associações simpátricas/alopátricas -----	98
7.8-Comparação entre o sucesso da infecção de <i>L. columella</i> utilizando-se ovos provenientes de hospedeiros bovinos e coelhos-----	99
7.9- Infecção de <i>Physa marmorata</i> -----	100
8- CONCLUSÕES -----	101
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	103

## 1- INTRODUÇÃO

*Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 é um trematódeo digenético da família Fasciolidae que parasita os ductos biliares de ovinos, bovinos, coelhos, suínos, roedores e do homem (Gordon, 1955; Ueno *et al.*, 1975; Oakley *et al.*, 1979; Alcaino *et al.*, 1983). Este helminto provoca a doença conhecida como fasciolose, que representa um sério problema para a criação de bovinos e ovinos, causando prejuízos na produtividade, devido ao retardo no crescimento de animais jovens, rejeições de fígados em matadouros, abortos, queda de produtividade de leite e carne e mortalidade, além dos gastos no controle da parasitose (Oakley *et al.*, 1979, Daemon & Serra-Freire, 1992).

O ciclo de vida da *F. hepatica* foi descrito pela primeira vez por Thomas, em 1882, e é realizado em cinco fases: 1-Passagem dos ovos do hospedeiro definitivo para o ambiente; 2- Eclosão dos miracídios, busca e infecção do hospedeiro intermediário; 3- Desenvolvimento e multiplicação dos parasitos no molusco infectado; 4- Emergência das cercárias, produção do cisto e transformação em metacercárias; 5- Ingestão de metacercárias viáveis pelo hospedeiro definitivo e desenvolvimento dos helmintos adultos.

Os ovos são eliminados pelos helmintos adultos nos ductos biliares, chegam ao intestino junto com a bile e alcançam o meio exterior através das fezes. Ao alcançar o meio externo, ainda não se encontram embrionados, e sob condições ideais de temperatura e oxigenação levam de duas a três semanas

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

para desenvolver a larva ciliada denominada miracídio. Após eclodir do ovo, o miracídio nada ativamente à procura de moluscos do gênero *Lymnaea*, que são os hospedeiros intermediários. Ao penetrar no molusco pelas partes moles, auxiliado por substâncias citolíticas, o miracídio perde a cutícula ciliada e se transforma em uma forma larvária com células germinativas, chamada esporocisto.

Uma vez estabelecido no interior do molusco, o esporocisto migra para a glândula digestiva, onde começa a se desenvolver. As células germinativas começam a se multiplicar em seu interior para formar o próximo estágio larval, as rédias. Quando estas se encontram bem desenvolvidas, o esporocisto se rompe, liberando-as dentro do molusco. As rédias contêm várias células germinativas, que se multiplicam para formar outra geração de rédias ou a última forma larvária no molusco, que é a cercária.

As cercárias não amadurecem ao mesmo tempo, e deixam o hospedeiro em épocas diferentes, geralmente de 4 a 7 semanas após a infecção. Elas nadam ativamente até um substrato, ao qual se aderem através da ventosa ventral e formam o cisto, tornando-se metacercárias. O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir metacercárias viáveis. Cerca de uma hora após infecção ocorre a ruptura do cisto no intestino, onde os trematódeos atravessam o epitélio e alcançam a cavidade peritoneal. Em seguida, se dirigem ao fígado, onde podem ser encontrados de 4 a 6 dias após a infecção. Uma vez no fígado, eles vão se alimentar de hepatócitos por 5 a 6 semanas, causando hemorragia e fibrose. Cerca de 7 semanas após a infecção, os helmintos alcançam os ductos biliares, onde se estabelecem permanentemente. A partir da 8ª. semana após infecção, ovos são encontrados na bile do hospedeiro definitivo.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

A patogenia produzida pelo parasito depende de fatores como carga parasitária, estado nutricional e imunológico do hospedeiro e espécie do hospedeiro definitivo. A fase aguda da fasciolose caracteriza-se por uma hepatite traumática causada pela migração de trematódeos imaturos, com destruição do tecido hepático. Na fase crônica da doença poderão ser observadas: fibrose hepática, hipoalbuminemia, e em alguns casos, à medida que a infecção progride, hipoglobulinemia (Acha & Szifres, 1977).

A epidemiologia da *F. hepatica* depende de fatores como: precipitação pluvial, temperatura e da biologia do hospedeiro intermediário. O papel dos moluscos limneídeos é de importância crucial na epidemiologia da fasciolose, e tem sido estudado em diversos países (Ueno *et al.* 1975, Gaasenbeek *et al.* 1992).

A fasciolose também acomete seres humanos, e por isto a sua importância tem aumentado. Diversas áreas geográficas têm sido apontadas como endêmicas para a doença em humanos, com prevalência e intensidade variáveis (Mendonça *et al.*, 1996, Rondelaud *et al.*, 2000). As regiões com o maior número de casos são encontradas nos países andinos da América do Sul, norte da África, Irã e Europa ocidental (Mas Coma *et al.*, 2005). No Brasil, os primeiros casos foram descritos por Rey (1958) no Mato Grosso do Sul, e por Santos e Vieira (1967) Apud Nuernberg (1983) e Baranski *et al.* (1978) Apud Nuernberg (1983) no Vale do Paraíba, em São Paulo.

No Brasil, a região Sul tem sido apontada como a maior área enzoótica da *F. hepatica*, embora também ocorra nas regiões Sudeste e Centro-oeste (Honer, 1979; Coelho, 2000; Faria, Cury & Lima, 2005), e a ocorrência de três espécies: de moluscos do Gênero *Lymnaea*:foi relatada no país: *L. columella*, *L. viatrix* e *L.*

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

*cupensis* (Müller *et al.*, 1998), sendo que *L. columella* e *L. viatrix* têm sido indicadas como hospedeiros intermediários da *F. hepatica* (Magalhães *et al.*, 2004). Em Minas Gerais somente são conhecidos casos isolados de parasitismo em algumas regiões do estado, e o município de Itajubá, onde foi encontrado pela primeira vez um espécime de *L. columella* infectado naturalmente por *F. hepatica* (Silva *et al.*, 1995) é indicado como o de maior prevalência (Caldas *et al.*, 1995; Faria, 2000). Dessa forma, torna-se necessária a realização de estudos sobre a dinâmica de infecção ao nível dos hospedeiros definitivos e intermediários da *F. hepatica*, que são essenciais para o controle da parasitose.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1-Histórico da *Fasciola hepatica* e de seus hospedeiros intermediários

#### 2.1.1- Descoberta do Ciclo de vida, na Europa

Não se sabe ao certo quando a *F. hepatica* foi observada pela primeira vez. Ovos do parasito foram encontrados em múmias e coprólitos humanos e de animais domésticos em sítios arqueológicos que datam em até 2500 a.c. (Dittmar & Teegen, 2003). A história da descoberta do ciclo de vida do helminto é descrita por Grove (1990). Segundo este autor, a primeira referência a estes helmintos na literatura foi feita por um francês, John de Brie, que foi comissionado pelo rei Charles V da França a escrever um tratado sobre manejo de ovinos para produção de lã, em 1379. Ele cita a presença dos helmintos nos fígados de ovelhas acometidas pela “doença do apodrecimento do fígado”, apesar de não descrever sua morfologia.

O primeiro pesquisador a investigar e ilustrar o parasito foi um médico italiano, Francisco Redi, que o encontrou no fígado de um novilho em 1668, e na bile de uma lebre em 1684. Nos séculos seguintes, diversas referências ao verme do fígado de carneiro foram feitas em textos de criação animal, até que Linnaeus deu seu nome em latim (*Fasciola hepatica*), em 1758. No século XIX, formas

larvárias de diversas espécies de trematódeos já eram conhecidas, mas detalhes do seu ciclo de vida, entre eles o da *Fasciola*, ainda não tinham sido esclarecidos.

Em 1875 foram observados pela primeira vez espécimes de *Lymnaea truncatula* infectados com rédias e cercárias maduras nos alpes, que se encistaram ao ser retiradas do molusco. Sugeriu-se pela primeira vez que a infecção com o trematódeo deveria ocorrer através da ingestão dos cistos, e *L. truncatula* foi citada como possível hospedeiro do parasito. O ciclo da *F. hepatica* foi pesquisado e descrito corretamente por Thomas (1882) Apud Taylor (1965) na Inglaterra, e Leuckhart (1882) na Alemanha, em trabalhos independentes, mas os autores ainda não estavam seguros a respeito da maneira como ovinos se infectavam. O caminho percorrido pelo parasito no organismo do hospedeiro definitivo também era incerto até 1914, quando foi descoberto o caminho da migração até o fígado, e foi demonstrado que a infecção se dava através da ingestão de metacercárias (Grove, 1990).

Taylor (1965) cita diversas epizootias de fasciolose que ocorreram em diferentes locais nos últimos séculos, desde 1552, na Holanda, onde um grande surto epidêmico causou sérios prejuízos econômicos na criação de ovinos.

### 2.1.2- Na América do Sul

Bacigualupo (1932) Apud Nuernberg (1983) encontrou pela primeira vez exemplares de *Lymnaea viatrix* D'Orbigny, 1835 infectados com *F. hepatica* nas proximidades da cidade de Buenos Aires, na Argentina.

Tagle (1943) encontrou o primeiro exemplar de *L. viatrix* naturalmente infectado pela *F. hepatica* no Chile.

Ueno *et al.* (1975) estudaram a epidemiologia de *F. hepatica* em ovinos e alpacas no Altiplano da Bolívia, onde altas taxas de infecção do trematódeo impossibilitavam a criação de ovinos em alguns locais próximos do lago Titicaca. Nesta localidade, duas espécies de caramujo, *L. viatrix* e *L. cubensis*, atuavam como hospedeiros intermediários da *F. hepatica*. A fasciolose aguda ocorria de maio a julho, na época seca, e em algumas áreas, a taxa anual de mortalidade de ovinos foi estimada em cerca de 15 a 25%. A contaminação com metacercárias de *F. hepatica* em pastos e plantas aquáticas foi pesquisada, através da coleta de amostras de plantas do local e alimentação de cobaios (*Cavia* sp.) com estas amostras, em laboratório. Foi confirmado que plantas da família Compositae e do gênero *Eleocharis* eram as mais contaminadas, seguidas por *Senecio* sp. e *Vallisneria* sp, enquanto plantas de *Scirpus* sp. e da família Ranunculaceae possuíam poucas metacercárias.

Claxton *et al* (1997) estudaram o padrão anual de infecção de rebanhos bovinos com *F. hepatica* em Cajamarca, no Peru, e observaram um aumento da taxa de infecção dos bovinos entre maio e dezembro. Não foi observado nenhum padrão na dinâmica da população do hospedeiro intermediário (*L. viatrix*) no local, e o maior número de moluscos infectados foi observado de janeiro a março.

### 2.1.3 -No Brasil

No Brasil, Lutz (1921) Apud Nuernberg (1983) fez o primeiro relato da presença de *F. hepatica* no estado do Rio de Janeiro, onde encontrou espécimes de *Lymnaea cubensis* infectados no município de Três Rios.

Oliveira (1932) relatou que de 314.853 bovinos procedentes de municípios gaúchos, abatidos entre 1930 e 1932 em um frigorífico no município de Rio Grande, RS. 10,6% dos animais estavam infectados com *F. hepatica*.

Rey (1958) Apud Nuernberg (1983) estudando a prevalência de *F. hepatica* em bovinos e ovinos do Rio Grande do Sul encontrou uma prevalência de 2,24% em bovinos e 4,25% em ovinos nos anos de 1954 a 1956. A espécie *L. viatrix* foi considerada como a provável hospedeira intermediária na região. O mesmo autor cita o primeiro caso de fasciolose humana no país no estado do Mato Grosso, em uma criança de três anos de idade, no município de Campo Grande.

Corrêa (1965), no Rio Grande do Sul, avaliou em 7,99% o índice de infecção de bovinos abatidos em matadouro.

França (1969), examinando fígados de 941 bovinos abatidos no matadouro municipal de Taubaté, no Vale do Paraíba, no estado de São Paulo observou 10,1% de animais parasitados por *F. hepatica*.

Ueno *et al.* (1982) estudaram a importância econômica da fasciolose no estado do Rio Grande do Sul através de dados obtidos pelo serviço de inspeção sanitária nos principais matadouros. As taxas anuais de fígados condenados por infecção variaram de 12-13% em bovinos e 7% em ovinos. Muitas fazendas na

fronteira do Brasil com o Uruguai estavam contaminadas por *F. hepatica* e a mortalidade era alta nos rebanhos durante o inverno. Os moluscos limneídeos, *L. viatrix* e *L. columella* foram considerados hospedeiros intermediários no estado.

Müller (1981) e Müller & Ueno (1982) apontaram, pela primeira vez, no Rio Grande do Sul, *L. viatrix* como hospedeiro natural da *F. hepatica*, ao encontrar espécimes infectados no município de Santa vitória do Palmar.

Nuernberg *et al.* (1983) criaram em laboratório gerações de *L. cubensis* obtidas a partir de espécimes coletados em Três Rios (RJ), e estudaram sua biologia e a sua suscetibilidade à infecção experimental com *F. hepatica*. Foi observado neste trabalho que *L. cubensis* não resistia à emergência de cercárias quando era infectada com um número de miracídios superior a cinco. A emergência de cercárias tinha início 35 dias após a infecção experimental, e o número médio de metacercárias obtido foi de 78,4 para o grupo infectado com 1-3 miracídios e 108,3 para o grupo infectado com 3-5 miracídios.

Valero & Santiago (2000) estudaram a infectividade de metacercárias obtidas de moluscos infectados com miracídios provenientes de amostras de diferentes espécies de mamíferos no altiplano boliviano, e observaram uma redução da sua infectividade à medida que ficavam mais velhas. Foi constatado que metacercárias obtidas de amostras provenientes de suínos e asininos possuíam a mesma infectividade de metacercárias obtidas a partir de amostras provenientes de ovinos e bovinos.

#### 2.1.4- No estado de Minas Gerais

Carvalho (1940) Apud Faria (2000) relatou o primeiro achado de *F. hepatica* em um bovino da raça holandesa, de procedência ignorada, enviado ao município de Viçosa pela Secretaria da Agricultura do Estado de Minas Gerais.

Freitas (1957) Apud Faria (2000), e posteriormente Costa & Freitas (1959) Apud Faria (2000) relataram achados ocasionais de *F. hepatica* em bovinos abatidos em Minas Gerais.

Dacal (1979) comparou a infectividade de exemplares de *L. columella* coletados nos municípios de Viçosa, Sete Lagoas e São Gonçalo do Sapucaí, em Minas Gerais, com moluscos provenientes dos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na suscetibilidade entre as linhagens de moluscos comparados.

Serra Freire *et al.* (1995) amostraram 2.395 animais em Minas Gerais, observando um percentual de 2% de positivos para todo o Estado, com ênfase para a região de Itajubá, onde 4% dos animais pesquisados estavam infectados.

Caldas *et al.* (1995) verificaram através de exames coproparasitológicos 3.086 bovinos provenientes de 51 municípios, e encontraram 1,49% de amostras positivas, sendo que os índices por microrregiões foram: Belo Horizonte (1,8%), Itabira (0,6%), Divinópolis (1,3%), Itajubá (9,05%), Poços de Caldas (0,26%) e Varginha (0,51%).

Coelho & Lima (2003) pesquisaram a variação populacional de *L. columella* e sua taxa de infecção natural por *F. hepatica* no município de Itajubá,

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

MG, assim como a variação na eliminação de ovos do helminto em bovinos infectados. Foi observado que a população de moluscos aumentava de junho a novembro, e decrescia de dezembro a fevereiro. A variação mensal da média das contagens de ovos de *F. hepatica* por grama de fezes dos bovinos infectados aumentava nos meses mais secos (junho a setembro), e decrescia a partir de outubro. A inundação da área nos meses mais chuvosos e a limpeza dos canais de drenagem, realizada pelos fazendeiros duas vezes por ano, eram as principais causas na redução das populações de moluscos. Espécimes de *L. columella* naturalmente infectados por *F. hepatica* foram encontrados em 7 dos 16 meses de amostragem, e a maior taxa de infecção natural encontrada nos caramujos foi de 5,2%.

Faria, Cury & Lima (2005) pesquisaram a prevalência da fasciolose em rebanhos de bovinos no município de Itajubá, e observou a variação da presença de ovos do trematódeo nas fezes dos hospedeiros em todos os meses do ano. A prevalência observada foi de 10,59%, e a maior eliminação ocorreu de março a abril, durante a estação seca.

## **2.2- *Lymnaea* spp. como hospedeiro intermediário de *F. hepatica***

Ramires-Villamediana & Vergani (1949) estudaram a infectividade de *F. hepatica* à *L. cubensis* e Briceño Rossi (1950) cita *L. cubensis* como hospedeiro intermediário da *F. hepatica* na Venezuela. No Japão, Ueno & Watanabe (1980) citam *L. ollula* como hospedeiro intermediário da *F. hepatica*.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Boray (1964) citou *L. tomentosa* como único hospedeiro intermediário da *F. hepatica* na Austrália.

Berghen (1964) realizou experimentos de infecção de moluscos com miracídios em laboratório, para comparar *L. truncatula*, *L. stagnalis* e *L. palustris* quanto à suscetibilidade à infecção por *F. hepatica* e afirma ser *L. truncatula* a mais suscetível.

Gonzales *et al.* (1974) referiram pela primeira vez a *Lymnaea columella* Say, 1817 como hospedeiro intermediário da *F. hepatica* no Rio Grande do Sul, tendo encontrado espécimes naturalmente infectados na área de trabalho. Em experimentos em laboratório, cercárias foram obtidas dos moluscos infectados após o 44º dia.

Hodasi (1972) estudou os efeitos de *F. hepatica* sobre crescimento, reprodução e mortalidade de *L. truncatula*. Através de seu trabalho, foi demonstrado que o trematódeo afeta a glândula digestiva e as gônadas do hospedeiro intermediário, podendo inclusive levar à destruição destes órgãos, em estágios mais avançados da infecção.

Resende *et al.* (1973) assinalaram pela primeira vez no Brasil a *L. cubensis* e *L. columella*, em alguns municípios do estado do Rio de Janeiro, onde casos de fasciolose em bovinos haviam sido relatados. Alguns exemplares naturalmente infectados foram relatados, e os autores conseguiram a infecção experimental em laboratório, obtendo cercárias entre o 44º e o 58º dia de infecção.

Gomes *et al.* (1974) estudaram o ciclo biológico de *F. hepatica* em espécimes de *L. columella* infectados experimentalmente. Foi observado que em caramujos infectados com 2 a 5 e 5 a 8 miracídios, o índice de mortalidade foi de

15 e 31% respectivamente, e a positividade foi de 84 e 86%, com o número médio de metacercárias produzidas de 303 a 335. Nos grupos infectados com mais de 8 miracídios foi verificada a morte de todos os moluscos antes da emergência das cercárias.

Rondelaud (1977) estudou a influência da drenagem e da predação pelo gastrópode *Zonitoides nitidus* em populações de *L. truncatula* em quatro tipos diferentes de habitats. Variações bruscas na quantidade de água ocorridas no final do outono reduziram o número das duas espécies de caramujos.

Rondelaud & Barthe (1978) estudaram a influência de diversos fatores, como: temperatura, umidade do solo, volume do corpo do hospedeiro intermediário, no desenvolvimento de gerações de rédias de *F. hepatica* em *L. truncatula*. Três gerações de rédias estavam geralmente presentes, independentes dos fatores ambientais. O número de rédias de 2ª e 3ª geração era correlacionado com o volume do corpo do hospedeiro intermediário. A temperatura afetava a sincronia de maturação das rédias das gerações 1 e 2. Os outros fatores estudados não influenciava no desenvolvimento das formas larvárias.

Sindou *et al.* (1991) compararam a sobrevivência e as lesões características de formas larvais de *F. hepatica* em quatro espécies de *Lymnaea*: *L. glabra*, *L. palustris*, *L. peregra* e *L. truncatula*. Necrose epitelial da glândula digestiva foi relatada em *L. glabra*, *L. palustris* e *L. palustris*, enquanto depósitos intralamelares foram encontrados no mesmo órgão em *L. truncatula*.

Dreyfuss *et al.* (1994) introduziram experimentalmente miracídios de *F. hepatica* em cinco tanques colonizados por *L. palustris* por um período de 4 a 6 anos, e estudou a prevalência de *F. hepatica* e a variação no tamanho das

conchas nas diferentes estações. Nos quatro primeiros tanques, houve um aumento progressivo na prevalência dos filhotes das gerações de primavera (de 0.4 a 18.1%), com um aumento correspondente do tamanho das conchas (de 3.6 a 7.8 mm). O quinto tanque apresentou resultados semelhantes no princípio, mas secou em 1990, o que provocou uma queda na prevalência comparada com os valores iniciais. A partir de 1991 até 1992, a prevalência de *F. hepatica* nos moluscos voltou a aumentar.

Silva *et al.* (1994) relataram a primeira ocorrência de *L. columella* naturalmente infectada por *F. hepatica* em uma várzea no município de Itajubá. Dentre os moluscos coletados, 2,29% estavam infectados.

Preveraud-Sindou *et al.* (1994) compararam a migração e o estabelecimento de esporocistos de *F. hepatica* no corpo de quatro espécies de moluscos: *Aplexa hypnorum*, *Lymnaea glabra*, *L. truncatula*, e *Physa acuta*, cada uma exposta a um único miracídio e sacrificada após períodos de até 5 dias de exposição. Constatou-se que os esporocistos preferem a região da glândula digestiva e do coração no 4º dia em *Lymnaea* spp. e desapareceram em *Aplexa* e *Physa* no 3º dia.

Dreyfuss *et al.* (1997) realizaram infecções experimentais com miracídios de *F. hepatica* em 300 espécimes de *L. peregra*, para determinar a capacidade dessa espécie em suportar o desenvolvimento das formas larvárias. A taxa de infecção foi de 38% em caramujos recém-eclodidos e 9.5% em filhotes com até 1 mm. Nenhum caramujo com mais de 3 mm foi infectado com sucesso. Um número médio de 7 rédias para caramujos do primeiro grupo e 15 para caramujos do

segundo grupo foi obtido após o 30º dia. Os resultados sugerem que *L. peregra* pode atuar apenas como hospedeiro acidental de *F. hepatica*.

Mattos *et al.* (1997) realizaram estudos ecológicos com populações de *L. columella*, por um período de 12 meses em uma lagoa localizada em uma fazenda do Rio Grande do Sul, onde havia baixa prevalência de fasciolose, devido a um programa de controle. A população de caramujos aumentava durante o inverno, decrescia gradualmente durante a primavera e era menor no verão e no outono, estações durante as quais um aumento na proporção de filhotes era observada. Mudanças no tamanho das conchas indicavam que os caramujos levavam de 10 a 12 meses para se tornarem adultos. Caramujos infectados naturalmente com *F. hepatica* foram achados durante o inverno com uma prevalência de 0,42%, e na primavera, com prevalência de 2,45%.

Dreyfuss *et al.* (1997) realizaram infecções experimentais para comparar os efeitos de *Fasciola gigantica* e *F. hepatica* em *L. truncatula*, e observaram que a frequência de eliminação de cercárias, a duração do período pré-patente e a percentagem de cistos flutuantes foram maiores no grupo infectado por *F.gigantica*.

Abrous *et al.* (1998) propuseram um novo método para se obter metacercárias através de infecção experimental de *L. truncatula* com *F. hepatica*. Dois miracídios eram usados para cada caramujo, que era confinado em uma placa de Petri a densidades de 1 a 2 caramujos por placa, e alimentados com alface. A prevalência de infecção variou de 45% a 82%, e o número de metacercárias obtidas por caramujo variou de 56 a 107.

Claxton *et al.*(1999) estudaram o efeito de temperaturas constantes e variáveis no desenvolvimento de *F. hepatica* em *L. viatrix* infectada experimentalmente. Foi observada uma redução da fertilidade dos ovos de *F. hepatica* quando estes eram incubados em temperaturas variáveis (15° C, 20°C, 25°C). No entanto, não foram observadas variações no desenvolvimento dos parasitos no interior dos moluscos, que também não apresentaram taxas de crescimento diferentes quando comparados ao grupo criado sob temperaturas constantes.

Dreyfuss *et al.* (1999) investigaram a ovoposição de *L. truncatula* infectada por *F. hepatica*, e observaram uma redução gradual no número de ovos dos moluscos nas quatro primeiras semanas após a infecção, além de uma parada na ovoposição antes do fim do experimento.

Dreyfuss *et al.* (2000) estudaram a influência do tamanho da concha na infecção de *Lymnaea fuscus* com *F. hepatica*, e observaram uma maior suscetibilidade à infecção nos moluscos com conchas medindo até 1 mm. Moluscos com concha maior demonstraram uma menor suscetibilidade.

Gutierrez *et al.* (2000) infectaram experimentalmente *Fossaria cubensis* com *F. hepatica* e verificaram aumento da mortalidade, menor fecundidade e menor número de ovos por postura nos moluscos infectados, quando comparados com os grupos controle.

Outros fatores podem influenciar na suscetibilidade de *Lymnaea*. Abrous *et al.* (2001) estudaram o efeito do estresse no sucesso da infecção experimental de *L. truncatula* por *F. hepatica*, através de exposição de diversos grupos de moluscos a água filtrada, redução da temperatura e uso de uma solução de

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

detergente. Os moluscos submetidos ao estresse apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *F. hepatica* que os do grupo de controle.

Gutierrez *et al.* (2001) estudaram o efeito do isolamento na suscetibilidade à infecção por *F. hepática*. Observou-se que os moluscos criados em isolamento demonstravam maior tamanho da concha, maior número de massas de ovos depositadas e maior número de ovos por massa, além de apresentar maiores taxas de sobrevivência e de crescimento natural. A infecção provocava um aumento no tamanho da concha e uma redução da taxa de reprodução dos moluscos.

Vignoles *et al.* (2001) estudaram a suscetibilidade de *L. truncatula* à infecção com miracídios de *F. hepatica* provenientes de diferentes espécies de mamíferos: bovinos, ovinos, coelhos e lontras. Os moluscos infectados por miracídios provenientes de coelhos apresentaram menor sobrevivência e menor taxa de infecção do que os outros grupos. A maior taxa de infecção foi observada em caramujos infectados com miracídios de ovos provenientes de lontra.

Alguns autores têm se interessado na variação da suscetibilidade entre diversas raças geográficas de moluscos limneídeos à infecção por *F. hepatica*, e às diferenças de suscetibilidade em associações simpátricas e alopátricas entre o parasito e seu hospedeiro intermediário. Goumghar *et al.* (2001) verificaram a influência de combinações simpátricas e alopátricas de *F. hepatica* com *L. truncatula*, e verificaram uma maior emergência de cercárias em moluscos de associação alopátrica, além da formação de numerosas rédias de segunda geração.

Gasnier *et al.* (2000) compararam o efeito de infecções de *L. truncatula* com *F. hepatica* em associações alopátricas e simpátricas. As combinações alopátricas apresentaram maior taxa de infecção, maior produção de metacercárias e maior viabilidade das mesmas.

Gutierrez *et al.* (2002) estudaram as interações entre formas larvais de *F. hepatica* e *L. columella* e descobriram interações incomuns entre ambos. Alguns exemplares infectados não demonstravam o aumento no tamanho da concha nem a redução da fecundidade observados na maioria das infecções experimentais de *L. columella*, e alguns grupos de moluscos que apresentavam menor fecundidade e menor longevidade não puderam ser infectados com sucesso.

Rondelaud *et al.* (2002) investigaram a influência dos predadores (larvas de dípteros sciomyzidae e gastrópodes zonitidae) no desenvolvimento larval de *F. hepatica* e perceberam que o número de cercárias que emergia dos moluscos era menor nas cubas habitadas pelos predadores. Verificaram, entretanto, que não houve diferenças na duração do período decorrente entre a infecção dos moluscos e a emergência das cercárias

### **2.3- Infecção natural de *Fasciola hepatica* em populações de *Lymnaea***

Morales & Pino (1983) estudaram a infecção de moluscos da espécie *L. cubensis* por *F. hepatica* em uma região com mais de 1000 m de altitude no estado de Trujillo, na Venezuela, onde quase todos os bovinos estavam infectados. Um quarto dos moluscos estava infectado com um número médio de

20 rédias por molusco. A prevalência da infecção aumentava com o tamanho do molusco e era maior nos que mediam de 4 a 5 mm.

Boray *et al.* (1985) realizaram estudos de campo nas áreas de Lismore e Casino (South Wales), nos Estados Unidos, para verificar a presença de moluscos que atuavam como potenciais transmissores de trematódeos em ruminantes. *L. columella* foi encontrada em grandes quantidades a leste de Lismore. Infecção natural por *F. hepatica* foi detectada em alguns caramujos, e estudos em laboratório revelaram uma alta suscetibilidade do molusco ao parasito.

Amato *et al.* (1986) estudaram a epidemiologia da fasciolose no Vale do Paraíba, no estado de São Paulo. Apesar de *L. columella* e *Stenophysa marmorata* estarem presentes juntas no local de estudo, apenas *L. columella* possuía estágios larvais de *F. hepatica*. A população decrescia ciclicamente entre setembro e janeiro, e aumentava entre março e setembro. Os caramujos maiores foram coletados entre março e julho e entre novembro e dezembro, enquanto os menores foram coletados entre janeiro e fevereiro e entre agosto e outubro, sugerindo que pode haver duas gerações de *L. columella* por ano. As taxas mais altas de prevalência em *L. columella* foram: primeiro ano junho, 8.82%, setembro 9.09% e outubro 10.52%; segundo ano março 6.25% e abril 6.89%; terceiro ano julho 7.69%, agosto 10.25%, abril 17.91% e maio 13.91%. Resultados obtidos de animais traçadores sugeriram um maior número de metacercárias no pasto entre junho e outubro e entre março e abril, mas a infecção estava presente durante todo ano.

Mendonça & Barata (1989) estudaram a fasciolose na ilha de São Miguel (Açores), e observaram que o ciclo do parasito se desenvolve ao longo do ano

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

sem interrupções. A média de infecção natural de *L. truncatula* encontrada foi de 6,42%, e incidência da parasitose nos animais abatidos foi de 9,16%.

Manga-Gonzalez *et al.* (1991) fizeram amostragens malacológicas por dois anos, estudando *L. truncatula* em cinco pontos da bacia do rio Porma em León, Espanha. O maior número de caramujos foi coletado em maio, setembro e novembro. Dos 5486 moluscos examinados, 11,41% estavam infectados por *F. hepatica*. Os valores de prevalência e intensidade aumentavam com o tamanho dos caramujos, e alcançaram seus valores máximos em outubro. As taxas mais altas de cercárias foram detectadas entre setembro e dezembro.

Gaasenbeek *et al.* (1992) estudaram a epidemiologia de *F. hepatica* na Holanda através da técnica indireta de hemaglutinação, utilizando animais traçadores e através da determinação da dinâmica de populações de moluscos limneídeos, sua taxa de infecção e padrão de eliminação de cercárias. Concluíram que ovos, caramujos infectados e metacercárias no pasto podiam sobreviver durante o inverno. A disponibilidade de metacercárias nas pastagens estava positivamente correlacionada com a quantidade de chuva do período chuvoso.

Salem *et al.* (1993) estudaram a infecção de caramujos do gênero *Lymnaea* na vila de Abis II no Egito, com relação às espécies presentes, distribuição mensal, densidade e taxas de infecção em diferentes coleções de água. Os trematódeos encontrados em *Lymnaea cailliaudi* foram: *Xiphidiocercaria* em 40% dos caramujos e *Fasciola* sp. em 10%. Cercárias de *Echinostoma* foram detectadas em alguns moluscos fora da vila.

Rai *et al.* (1996) realizaram um estudo epidemiológico de fasciolose em bovinos nas ilhas de Andaman e Nicobar, Índia. A incidência de *F. hepatica*

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

variava de 12,1 a 70%, e era maior nos meses de setembro a abril. Os caramujos *Lymnaea* sp., em pastos e áreas inundadas, eram mais numerosos entre junho e dezembro. Os autores reportaram o uso de patos como predadores de caramujos e tratamento estratégico do gado com albendazole, duas vezes por ano, como eficazes no controle de *F. hepatica*.

Goumghar *et al.* (1997) pesquisaram, em Marrocos, moluscos provenientes dos vales Wadis Tizguitte e Zerrouka para identificar os habitats característicos onde *L. truncatula* ocorria, e a prevalência da infecção por *F. hepatica*. Os resultados foram comparados com os de duas outras espécies: *L. peregra* e *Physa acuta*. Foi observado que a distribuição dos habitats de *L. truncatula* era mais espalhada, e a de *L. peregra* e *Physa acuta* era maior. A prevalência da infecção natural por *F. hepatica* em *L. truncatula* foi de cerca de 1%.

Abrous *et al.* (1999) estudaram a infecção natural de *L. glabra* e *L. truncatula* por *F. hepatica* e/ou *Paramphistomum daubneyi* durante dois períodos de risco no ano de 1996: de junho a julho e de setembro a outubro, em 11 fazendas no centro da França, conhecidas por sua alta incidência de fasciolose em ruminantes. Foram coletados 1778 espécimes de *L. truncatula* e 2396 de *L. glabra* medindo 6 mm ou mais. A estação do ano, presença de infecções mistas, hospedeiro ruminante e a existência de comunidades mistas ou simples de hospedeiros intermediários foram investigados. Não foram observadas diferenças de prevalência entre os períodos de risco. A maior taxa de prevalência de *F. hepatica* encontrada foi de 33%, em uma fazenda onde *L. truncatula* estava presente. As prevalências de *F. hepatica* ou *P. daubneyi* em *L. glabra* eram

maiores em fazendas com criações de ovinos do que em fazendas com criações de bovinos. A prevalência de ambos os trematódeos em *L. glabra* era maior em fazendas onde as duas espécies estavam presentes.

Hammami & Ayadi (1999) verificaram a densidade populacional de *L. truncatula* no oásis Tozeur, na Tunísia, e observaram um aumento durante o outono. Fatores como temperatura, pH da água e do solo, luminosidade e umidade também influenciavam na população.

Abrous *et al.* (2000) estudaram a produção de rédias e cercárias provenientes de exemplares de *L. truncatula* infectados experimentalmente com *F. hepatica* e *Paramphistomum daubneyi*. Nos moluscos infectados por *P. daubneyi*, as cercárias foram produzidas pela primeira e pela segunda geração de rédias (8.7 e 8.9 cercárias por rédia, respectivamente). Nos moluscos infectados por *F. hepatica* a maioria das cercárias foi produzida pelas rédias de segunda geração (18,2 cercárias por rédia). A produção de cercárias por *P. daubneyi* até o 63º dia após a exposição (145 cercárias por molusco) foi menor que a de *F. hepatica* (427 cercárias por molusco).

Hammami *et al.* (2000) investigaram a infecção natural de *L. truncatula* por *F. hepatica* em um oásis em Tozeur, na Tunísia, e constataram a presença de infecção em 5 dos 8 locais testados, com uma prevalência média de 26,1%. Fatores climáticos e a intervenção humana eram os principais determinantes da epidemiologia de fasciolose no local, observando-se os maiores períodos de infecção quando os animais eram soltos para pastar. Os canais de irrigação secundários apresentavam, em geral, maior taxa de infecção do que os primários.

Dreyfuss *et al.* (2002) investigaram espécies incomuns envolvidas na transmissão de *F. hepatica* no centro da França, em locais onde o hospedeiro intermediário habitual, *L. truncatula* estava ausente, e descobriram, através de infecções experimentais, que *Lymnaea ovata* e *L. stagnalis* encontradas no local eram suscetíveis à infecção com *F. hepatica*. Uma terceira espécie de molusco, *Planorbis leucostoma*, apresentava formas larvais de *F. hepatica* quando infectada simultaneamente com *Paramphistomum daubneyi*. *Physa acuta*, outra espécie presente na área, não apresentou suscetibilidade à infecção por *F. hepatica*.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

### 3- JUSTIFICATIVA

A *Fasciola hepatica* é, dentre os parasitos que acometem os bovinos, um dos de maior importância econômica, possuindo um grande potencial para prejudicar o rebanho, pois pode levar à redução do peso, da produção de carne e leite, condenação de fígados em matadouros, além de constituir um problema de saúde pública, por ser uma zoonose.

Segundo Dacal (1979), a população humana e os rebanhos bovinos, ovinos e suínos do sul de Minas Gerais, onde está situado o município de Itajubá, podem ser sujeitos à infecção por *F. hepatica*. Faria (2000) estimou o rebanho de Itajubá em 1999 em aproximadamente 12.950 animais distribuídos em 515 propriedades, e observou que o intercâmbio comercial de animais, existente entre os produtores rurais do município de Itajubá e os municípios vizinhos, é um fator que contribui para a disseminação da infecção de *F. hepatica* de bovinos em outras regiões. Portanto, a compreensão dos aspectos epidemiológicos da parasitose é essencial para o seu controle.

Os moluscos limneídeos são os hospedeiros intermediários da *F. hepatica*, e poucos trabalhos com o objetivo de se investigar sua ecologia têm sido realizados nos ambientes em que estes moluscos são encontrados, no estado de Minas Gerais. Além disso, a suscetibilidade de moluscos provenientes de diversas regiões do estado à infecção pelo trematódeo ainda é pouco conhecida, tornando essencial a realização de estudos sobre estes aspectos.

## 4- OBJETIVOS

### 4.1- Objetivo geral

Investigar a variação das populações de *L. columella* e de sua taxa de infecção natural por *F. hepatica* no município de Itajubá, MG, e determinar a suscetibilidade de moluscos provenientes de diferentes regiões à infecção pelo helminto.

### 4.2- Objetivos específicos

- 4.2.1- Observar aspectos da distribuição espacial e temporal de *L. columella* em Itajubá, MG.
- 4.2.2- Verificar a taxa de infecção natural por estágios evolutivos de *F. hepatica* nos moluscos coletados em Itajubá, MG, e monitorar sua variação ao longo do ano.
- 4.2.3- Manter o ciclo da *F. hepatica* em coelhos e comparar a suscetibilidade de moluscos a miracídeos obtidos de ovos provenientes de outros hospedeiros
- 4.2.4- Verificar se a variação das populações de *L. columella* de Itajubá, MG, e a de populações de moluscos de outras espécies, que coexistem na mesma área, seguem um padrão semelhante.
- 4.2.5- Comparar a suscetibilidade à infecção experimental com *F. hepatica* de *L. columella* proveniente do município de Itajubá com espécimes de *L. columella* provenientes de outras regiões.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

4.2.6- Verificar a influência de associações simpátricas e alopátricas sobre a infecção e o desenvolvimento larvar de *F. hepatica* em *Lymnaea* sp.

4.2.7- Verificar se moluscos do gênero *Physa* atuam como hospedeiros intermediários de *F. hepatica*.

**pdfMachine** - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## 5- METODOLOGIA

### 5.1-Local de estudo

O trabalho de campo foi realizado no município de Itajubá, MG, localizado na microrregião Alta Mantiqueira, no sul de Minas Gerais, próximo à divisa com o estado de São Paulo ( $22^{\circ}27'01''$  de latitude sul,  $45^{\circ}27'34''$  de longitude oeste, altitude de 844m acima do nível do mar) (FIG. 1).

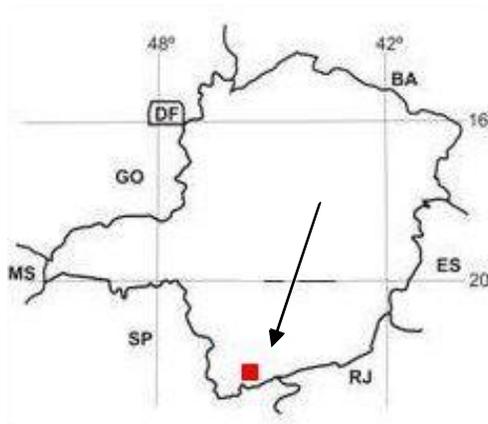


Figura 1-Localização do município de Itajubá, MG. Fonte: [www.faculdadedesabara.edu.br](http://www.faculdadedesabara.edu.br) (modificado)

Quanto ao relevo, Itajubá pertence ao domínio morfoestrutural da Serra da Mantiqueira, caracterizada pela predominância de terrenos cristalinos, variando a topografia de plana (10%), ondulada (12%) e montanhosa (78%), com altitudes variando entre 800 e 1500m. A rede hidrográfica é constituída pelo Rio Sapucaí e seus afluentes (Faria, 2000).

O clima da região, segundo a classificação de Koppen pode ser considerado do tipo tropical mesotérmico-brando úmido, de temperaturas amenas

durante todo ano com a temperatura média anual variando entre 18°C e 19°C. A pluviosidade media é de cerca de 1400mm por ano (Faria, 2000).

A área onde o estudo foi conduzido é uma várzea localizada às margens do Córrego Piranguçú, que é um dos afluentes do rio Sapucaí, entre os bairros Piedade e Capituba (FIG. 2 e 3).

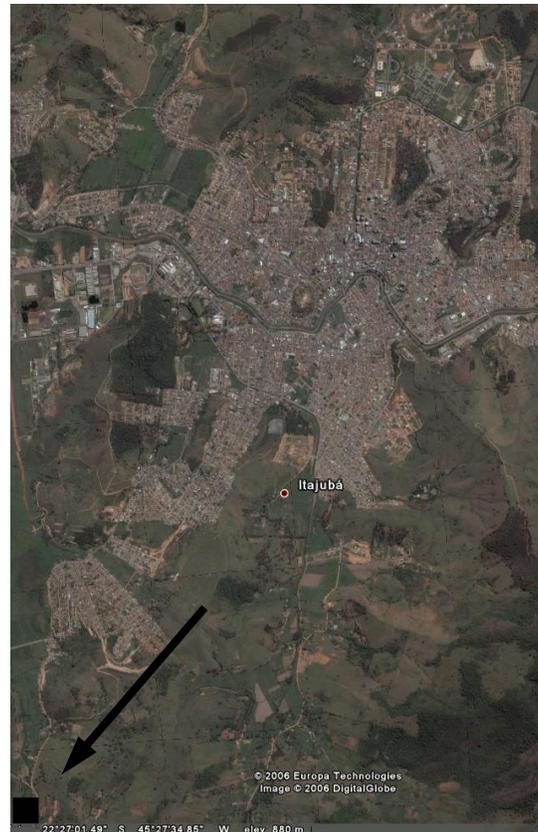


Figura 2- A seta indica a localização da área de trabalho, no município de Itajubá, MG. Fonte: Google Earth 2007

**pdfMachine** - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA



Figura 3- Localização dos cinco pontos de amostragem na área de trabalho. Os canais encontram-se destacados em linhas azuis. 1=P1 (canal 1), 2=P2 (canal 2), 3=P3 (canal 3), 4=P4 (canal 4) e 5=P5 (canal 5). Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG. Fonte: Google Earth 2007

Esta área foi escolhida para a realização deste trabalho baseada nos dados de Faria (2000), que pesquisou a epidemiologia da fasciolose em rebanhos bovinos de diversas fazendas do município, e em seu trabalho, indicou as fazendas desta área como as de maior prevalência da fasciolose. No local a maior parte da vegetação nativa foi substituída por pastagens de capim braquiara (*Brachiara decumbens*), e diversos canais foram cavados para drenar a várzea (FIG. 4 e 5).



Figura 4- Aspecto da área de trabalho. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG, abril de 2004

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA



Figura 5- Canal de drenagem. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG, abril de 2004

Estes canais geralmente são colonizados por macrófitas aquáticas das espécies *Heteranthera reniformis* e *Eichornia azurea*. Nestes habitats vivem os moluscos, geralmente associados às macrófitas aquáticas que ali encontram condições ideais para seu desenvolvimento.

A ocupação humana ao redor da área consiste em pequenas propriedades rurais, onde a criação de gado é a atividade econômica predominante (Coelho, 2000).

## 5.2- Dados meteorológicos

Os dados sobre médias mensais das temperaturas e precipitação pluvial no período de maio de 2003 a abril de 2006 foram obtidos no 5º distrito do Instituto

Nacional de Meteorologia, em uma estação localizada no município de Maria da Fé, Minas Gerais, situado a aproximadamente 21km a nordeste de Itajubá.

### 5.3- Coleta dos moluscos

Cinco pontos de amostragem foram estabelecidos em cinco canais de drenagem distintos, sendo um ponto de amostragem em cada canal. As coordenadas de utm foram obtidas através de um GPS (utm: 7516182, 7516181, 7516445, 7516324 e 7516456). A amostragem foi feita mensalmente, utilizando-se o método dos quadrats, como em Amato *et al.*(1986), Gaasenbeek *et al.* (1992), e Ueno *et al.* (1975) (FIG. 6). No primeiro mês em que moluscos limneídeos foram observados na área de trabalho (julho de 2003), 30 espécimes de *Lymnaea* sp. e dez de *Physa* sp. foram coletados no canal 1, em um ponto cerca de 15m distante do ponto de amostragem 1, para a identificação das espécies. Uma amostra adicional de dez espécimes de cada um destes gêneros foi coletada com a finalidade de se iniciar uma criação em laboratório.

Nos pontos de amostragem, foram estabelecidos “quadrats” de 1m<sup>2</sup>, perpendiculares à sua fonte, demarcados com um metro de madeira, de onde os caramujos foram coletados através de conchadas ou removidos manualmente das macrófitas aquáticas, por um período de até 30 minutos (Souza & Lima, 1997).



Figura 6- Coleta de moluscos. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG

Os caramujos coletados foram acondicionados em tiras de gaze úmida e transportados para o laboratório de helmintologia do ICB, UFMG, em Belo Horizonte.

No laboratório, os espécimes de *Lymnaea* sp. e *Physa* sp. coletados nos pontos de amostragem foram contados e medidos com paquímetro. Em seguida, foram dissecados, para se verificar a presença de estágios larvais de *F. hepatica*. Este procedimento foi realizado primeiro com a concha sendo esmagada sobre uma placa de Petri, com auxílio de um vidro de relógio. Em seguida, os órgãos foram separados com auxílio de dois estiletes, e examinados ao microscópio estereoscópio. As formas larvais encontradas (esporocistos, rédias e cercárias) foram identificadas baseado em sua morfologia, de acordo com Andrews (1999) e contadas.

Os moluscos coletados com a finalidade de manter uma criação foram colocados em cubas de plástico de 25x30x20cm com 1,5 litros de água, e mantidos através de uma alimentação com alface. Em cada cuba foram colocadas duas placas de isopor de 10x10x2cm para que realizassem a postura de ovos.

#### **5.4- Identificação das espécies de moluscos**

Para identificação das espécies, os trinta espécimes de *Lymnaea* sp. e dez de *Physa* sp. Coletados no canal 1 foram enviados ao Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, RJ, onde foram identificados pelo Dr. Lobato Paraense. Os demais gastrópodes foram identificados ao nível genérico no laboratório de malacologia do departamento de Zoologia da UFMG.

#### **5.5- Infecções experimentais**

##### **5.5.1-Criação de *Lymnaea* livre de infecção**

As placas de isopor com as posturas obtidas dos moluscos coletados no campo foram colocadas em uma cuba de plástico de 25x30x20cm com 1,5 litros de água. Após a eclosão dos ovos, estes caramujos foram alimentados com alface, e a água das cubas foi trocada uma vez por semana.

Um grupo de 30 espécimes com tamanho de concha de 2mm foi separado para verificação da taxa de crescimento, a duração do ciclo de vida, a taxa de mortalidade e a idade na qual tem início a postura de ovos. Estes moluscos foram criados através da mesma técnica descrita no parágrafo anterior, em cinco cubas com seis moluscos em cada. Estas cubas foram examinadas diariamente, para verificar a presença de indivíduos mortos e de posturas nas placas de isopor, e os

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

moluscos foram medidos com paquímetro uma vez por semana. Os dados obtidos foram comparados com os de espécimes infectados experimentalmente, para se investigar se há diferenças entre as taxas de crescimento e de mortalidade dos dois grupos.

### **5.5.2- Obtenção dos ovos de *F. hepatica***

Ovos de *F. hepatica* foram obtidos a partir amostras de fezes de bovinos naturalmente infectados de Itajubá. Um grupo de dez bovinos foi selecionado aleatoriamente na área de trabalho, dos quais foram coletadas diretamente da ampola retal de cada animal cerca de 200g de fezes. Este material foi colocado em sacos plásticos e levado até o laboratório de Helminologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do ICB, UFMG. No laboratório, foram realizados exames coprológicos, através da técnica dos quatro tamises, utilizando-se quatro gramas de fezes de cada animal (Faria, 2000). As amostras positivas foram estocadas em geladeira por até 6 meses, como fonte de ovos para os experimentos de infecção em laboratório. Após este período, as amostras foram descartadas. O bovino que apresentou a maior contagem de ovos por grama de fezes, uma fêmea da raça holandesa com idade de 6 anos, foi selecionada para fornecer material adicional para as infecções experimentais, ao longo da realização do trabalho. Fezes deste animal foram coletadas uma vez a cada 3 meses para obtenção de ovos para a realização das infecções experimentais.

As fezes dos bovinos foram diluídas na proporção de 4g de fezes por 30ml de água e homogeneizados em um béquer contendo água isenta de cloro. Em seguida, seu conteúdo foi despejado no aparelho “quatro tamises” feito de quatro

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

“Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's” A.Sarras - USA

peças de PVC com tamises dispostas uma sob a outra obedecendo a seguinte seqüência de malhas/polegadas: 100, 180, 200 e 250 (aberturas de 96 e 65  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Após lavagem sob o jato de água de uma torneira, o material retido no último tamis (250 malhas/polegada) foi transferido para um cálice de sedimentação de 250ml, utilizando-se um jato de água no sentido inverso desse tamis. Este material foi lavado a cada dez minutos, retirando-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta ligada a uma pêra de borracha, até que nenhum resíduo permanecesse suspenso. Após cerca de sete a oito lavagens, o sedimento com os ovos foi recolhido com pipeta Pasteur e colocado em placas de Petri com água isenta de cloro.

### 5.5.3-Obtenção de miracídios

Os ovos de *F. hepatica* foram incubados em estufa a 28°C. As placas de Petri foram examinadas uma vez a cada dois dias, para verificar se ocorreu o embrionamento dos ovos, e remover o excesso de impurezas no material. Este procedimento foi realizado retirando-se cerca de 25ml de água da superfície das placas de Petri com o auxílio de uma pipeta de plástico com capacidade de 3ml. Em seguida, um volume equivalente de água foi adicionado utilizando-se o jato de água de uma pisseta de plástico, aplicado ao fundo da placa, para oxigenar e limpar os ovos.

Após 14 dias de incubação as placas de Petri com ovos foram colocadas sob um foco de luz com lâmpada de 60 watts a uma distância de 50cm por um período de até quatro horas para estimular a eclosão dos miracídios. Estes foram

recolhidos com auxílio de uma pipeta pasteur utilizando microscópio estereoscópio (120x) para ser utilizados nas infecções experimentais.

#### **5.5.4- Infecção dos moluscos**

Os moluscos utilizados nos testes de suscetibilidade foram colocados individualmente em frascos de vidro de 10ml, preenchidos com um volume equivalente de água isenta de cloro, aos quais foram acrescentados quatro miracídios para cada um. Nos testes do efeito do número de miracídios, foram utilizados de 1 a 4 miracídios. Após um período de 24h, os caramujos foram transportados para um recipiente de plástico com 1,5l de água isenta de cloro, onde permaneceram por 31 dias, sendo alimentados uma vez a cada dois dias com alface, e a água de cada recipiente foi trocada uma vez por semana.

#### **5.5.5- Exame dos moluscos**

Aos 31 dias após infecção, os moluscos tiveram sua concha esmagada em uma placa de petri utilizando-se dois estiletes, e seus órgãos examinados ao microscópio estereoscópico nos aumentos de 120x e 250x, buscando-se formas larvais de *F. hepatica*. Estas formas larvais, quando presentes, foram identificadas com base em sua morfologia, de acordo com Andrews (1999), e contadas com o auxílio de um contador manual.

#### **5.5.6- Testes de suscetibilidade**

##### **5.5.6.1- Influência da variação do tamanho da concha na suscetibilidade**

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Para se verificar a influência da variação do tamanho de concha na suscetibilidade de *L. columella* à infecção por *F. hepatica* foram utilizados 700 moluscos obtidos a partir das posturas dos espécimes provenientes de Itajubá, MG. Estes moluscos foram divididos em sete diferentes categorias de tamanhos de conchas (2-4mm, 4-6mm, 6-8mm, 8-10mm; 10-12mm; 12-14mm, 14-16mm) utilizando-se o menor tamanho de cada categoria como limite. Para cada grupo, 100 moluscos foram infectados, utilizando-se 4 miracídios por caramujo.

#### **5.5.6.2- Efeito do número de miracídios**

Para verificação do efeito do número de miracídios na infecção, foram utilizados quatro grupos de 50 moluscos, com tamanho de concha de 4 a 6mm, obtidos a partir das posturas dos espécimes provenientes de Itajubá, MG. O primeiro grupo foi infectado com um único miracídio, e os outros três foram infectados com dois, três e quatro miracídios, respectivamente.

#### **5.5.6.3- Comparação entre moluscos provenientes de diferentes localidades**

A suscetibilidade de *L. columella* proveniente de Itajubá, MG, foi comparada com a de moluscos de outras localidades: duas no estado de Minas Gerais (Rio Doce, na Bacia do Rio Doce; e Jaboticatubas, na Bacia do Rio São Francisco) e dois municípios de outros estados (Fortaleza, CE; e Pelotas RS). Foram infectados 50 caramujos de cada localidade, utilizando-se espécimes com tamanho de concha entre 4 e 6mm.

#### **5.5.6.4- Associações simpátricas e alopátricas de *F. hepatica* com *L. columella***

A comparação da eficiência de associações simpátricas/alopátricas foi feita utilizando-se quatro grupos: um grupo de *L. columella* proveniente de Itajubá, MG, com *F. hepatica* proveniente do mesmo local, um grupo de *L. columella* proveniente de Pelotas, RS, com *F. hepatica* proveniente do mesmo local (Associações simpátricas), um grupo de *L. columella* proveniente de Itajubá, MG, infectado com *F. hepatica* proveniente de Pelotas, RS, e um grupo de *L. columella* proveniente Pelotas, RS, com *F. hepatica* proveniente de Itajubá, MG (Associações alopátricas). Os resultados obtidos das infecções destes quatro grupos foram comparados entre si para verificar se associações alopátricas do parasito com seu hospedeiro intermediário são mais eficientes que as associações alopátricas.

#### **5.5.6.5- Infecção de *Physa marmorata***

Para verificar se moluscos do gênero *Physa* eram suscetíveis à infecção por *F. hepatica*, como foi sugerido por Buseti *et al.* (1985), foram utilizados moluscos da primeira geração de *P. marmorata* obtida a partir de espécimes coletados no local de trabalho. As técnicas de criação e infecção dos moluscos foram as mesmas descritas nos itens 5.5.1 a 5.5.5 para *L. columella*. Foram infectados cinquenta caramujos, utilizando-se quatro miracídios para cada um.

## **5.6- Manutenção do ciclo de *F. hepatica* em coelhos**

### **5.6.1- Infecção dos moluscos**

Além dos moluscos utilizados para se verificar a suscetibilidade à infecção por *F. hepatica*, um grupo adicional de 30 moluscos com tamanho de concha de 2mm foi infectado com a finalidade de produzir metacercárias, para estabelecer o ciclo do trematódeo em laboratório. Estes moluscos foram infectados conforme o item 4. Após a exposição aos miracídios os moluscos foram colocados em cubas de plástico de 25x6x10cm com a parte interna coberta com papel celofane, contendo 1,5 litros de água isenta de cloro, e alimentados com alface. Os moluscos foram medidos semanalmente, e as cubas foram investigadas diariamente à procura de indivíduos mortos.

Estes caramujos foram criados simultaneamente com o grupo de 30 moluscos não infectados descrito no item 4.1, para posterior comparação entre os dados das taxas de crescimento e mortalidade dos dois grupos (infectados e não infectados).

### **5.6.2-Obtenção de metacercárias**

O papel celofane que cobria as cubas foi retirado e examinado diariamente, a partir do 31º dia após a infecção, ao microscópio estereoscópio, nos aumentos de 120x e 250x, à procura de metacercárias aderidas. Quando encontradas, estas foram retiradas do papel celofane com o auxílio de estiletes e coletadas com pipetas. Em seguida, foram colocadas em recipientes de vidro com 10 ml água destilada e estocadas em geladeira.

### **5.6.3- Infecção de coelhos com metacercárias de *F. hepatica***

Metacercárias foram utilizadas para realizar infecções experimentais de cinco coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com cerca de 1 ano de idade. Foram utilizadas trinta metacercárias para cada coelho. As metacercárias foram administradas aos coelhos com o auxílio de uma sonda esofágica, que consiste em uma seringa de plástico de 10ml acoplada a uma mangueira de plástico de 40cm de comprimento, e diâmetro de 4mm . Foi adicionada à ampola da seringa um volume de cerca de 60ml de água destilada, com as 30 metacercárias. Em seguida, a mangueira foi introduzida pela boca até alcançar o esôfago do coelho, onde as metacercárias foram inoculadas. Após a inoculação, a sonda foi examinada ao microscópio estereoscópio, nos aumentos de 120x e 250x, para verificar se alguma metacercária permaneceu aderida à seringa ou à mangueira. Quando isto ocorreu, elas foram inoculadas novamente através do mesmo procedimento.

Os animais infectados foram colocados individualmente em gaiolas e a partir do 20º dia após a infecção, amostras com aproximadamente 2g de fezes foram coletadas diariamente, para se avaliar a presença de ovos de *F. hepatica* através do aparelho de quatro tamises.

### **5.6.4- Comparação da viabilidade de miracídios obtidos de ovos de *Fasciola hepatica* provenientes de bovinos e coelhos**

Fezes dos coelhos infectados experimentalmente com *F. hepatica* foram recolhidas duas vezes por semana, a partir do primeiro dia em que foi verificada a presença de ovos do helminto, e examinadas pelo método de quatro tamises para

verificação do número de ovos eliminados por grama de fezes. Os ovos foram incubados em placas de Petri por duas semanas, à temperatura de 28°.

Ovos de *F. hepatica* provenientes de bovinos naturalmente infectados foram obtidos a partir das amostras coletadas na área de estudo, conforme descrito no item 5.5.2.

Os miracídios obtidos foram utilizados para a infecção experimental de dois grupos de 50 moluscos provenientes de Itajubá, MG, com tamanho de concha de 4mm, sendo um grupo infectado com miracídios obtidos a partir de ovos provenientes de coelhos e o outro grupo infectado com miracídios obtidos a partir de ovos provenientes de bovinos. O número de moluscos positivos de cada grupo e o número de formas larvais obtidas foram comparadas, para verificar se houve influência do hospedeiro na eficiência das infecções experimentais.

### **5.7- Análise Estatística**

Foram realizados testes de correlação de Spearman entre as densidades populacionais dos caramujos em cada mês e fatores climáticos (pluviosidade e temperatura média), através do software estatístico TANAGRA. Também foram realizados testes de correlação, entre o tamanho das conchas dos caramujos e os fatores descritos anteriormente. Os coeficientes de correlação obtidos ( $r_s$ ) foram analisados com 14 graus de liberdade ( $p < 0,05$ ).

A relação entre taxa de infecção e variação do tamanho da concha, foi testada através de um modelo de regressão logística, utilizando-se o software estatístico MINITAB 14.

Para testar o efeito do número de miracídios na infecção dos moluscos foi feito um teste de qui-quadrado com um nível de significância de  $p < 0,05$ , através do software EpiInfo 3.4.1.

Para comparar a suscetibilidade de moluscos provenientes de diferentes localidades, foi utilizado o modelo de regressão de Poisson. Os coeficientes da regressão de Poisson foram associados ao risco relativo para caramujos provenientes de diferentes localidades. Para ajuste dos modelos, foi utilizado o Software estatístico R 2.0.1. Os parâmetros estimados para cada localidade foram testados ao nível de 5%, e pelo critério de Bonferroni, todos os valores-p próximos ou menores que 0.0125 foram considerados significativos.

A comparação da eficiência de associações simpátricas e alopátricas foi feita utilizando-se um modelo de regressão logística. Para que o nível global de significância permaneça em 5%, foi usado o critério de Bonferroni, que consiste em rejeitar a hipótese de não significância dos parâmetros do modelo estimado apenas se o valor-p for menor ou igual a 0.016. Para ajuste dos modelos, foi utilizado o Software estatístico MINITAB 14

Para comparar estatisticamente a eficiência das infecções com miracídios provenientes a partir de ovos de bovinos e de coelhos, foi postulado o modelo de regressão logística. O modelo foi estruturado utilizando-se como variável a ser modelada a probabilidade de infecção, e como fator relacionado a esta probabilidade o hospedeiro a partir do qual os ovos foram obtidos (bovino ou coelho). Para ajuste dos modelos, foi utilizado o Software estatístico MINITAB 14.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

A comparação das médias de tamanho de concha entre moluscos infectados e livres de infecção foi realizada através do teste de ANOVA, utilizando-se o software Epi info 3.4.1.

Todas as comparações entre a mortalidade de moluscos de diferentes grupos nos testes de suscetibilidade foram realizadas através de testes de qui-quadrado, utilizando-se um nível de significância de  $p < 0,05$ , através do software Epi Info 3.4.1.

**pdfMachine** - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

**Get yours now!**

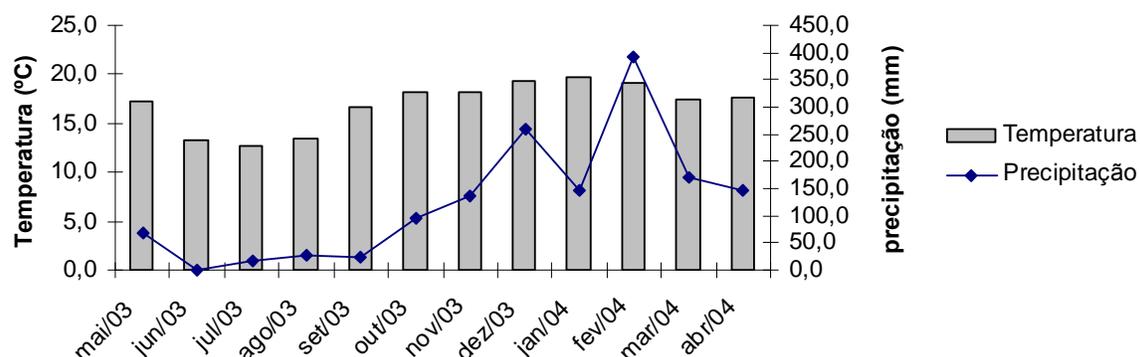
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## 6- RESULTADOS

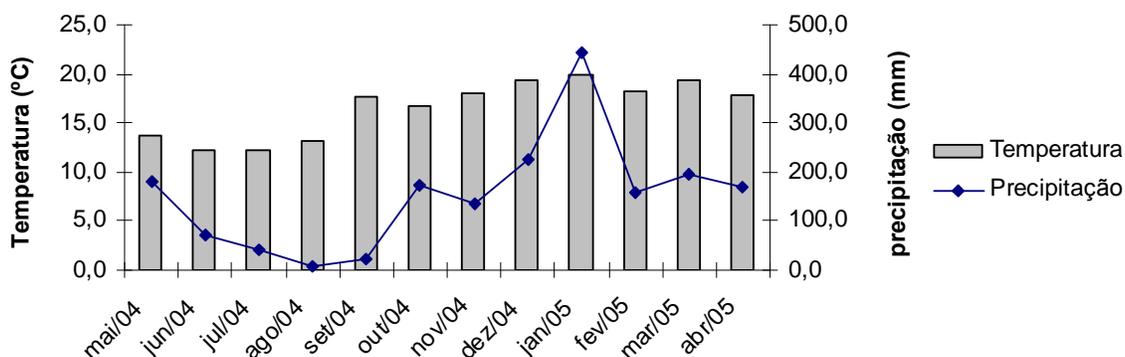
### 6.1- Variações climáticas e alterações no habitat dos moluscos

#### 6.1.1- Variação nas médias mensais de temperatura e precipitação

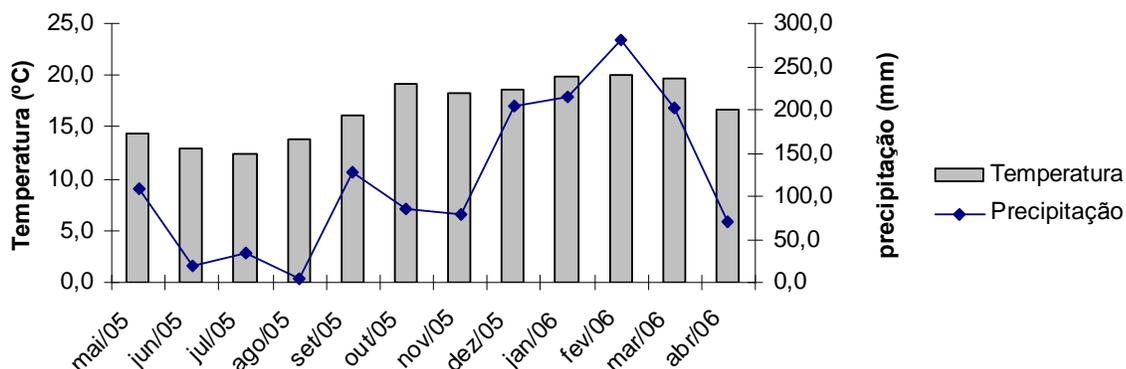
A variação da precipitação e das médias de temperatura durante o trabalho encontram-se nos gráficos 1, 2 e 3. A precipitação mensal variou de 0mm (junho de 2003, agosto de 2004 e agosto de 2005) a 475mm (janeiro de 2005). As maiores médias de temperatura foram observadas em fevereiro de 2006 (20°), e as menores em julho de 2004 (14°). Nos três anos de estudo foi observado um aumento na precipitação de outubro a fevereiro, e uma redução de março a setembro.



**Gráfico 1- Variação mensal de precipitação e temperatura em Itajubá, MG, de maio de 2003 a abril de 2004**



**Gráfico 2- Variação mensal de precipitação e temperatura em Itajubá, MG, de maio de 2004 a abril de 2005**



**Gráfico 3- Variação mensal de precipitação e temperatura em Itajubá, MG, de maio de 2005 a abril de 2006**

### 6.1.2- Alterações observadas nos canais de drenagem

Todos os canais foram limpos pelos fazendeiros, através da remoção da vegetação, pelo menos uma vez em cada um dos anos de amostragem (FIG. 7).

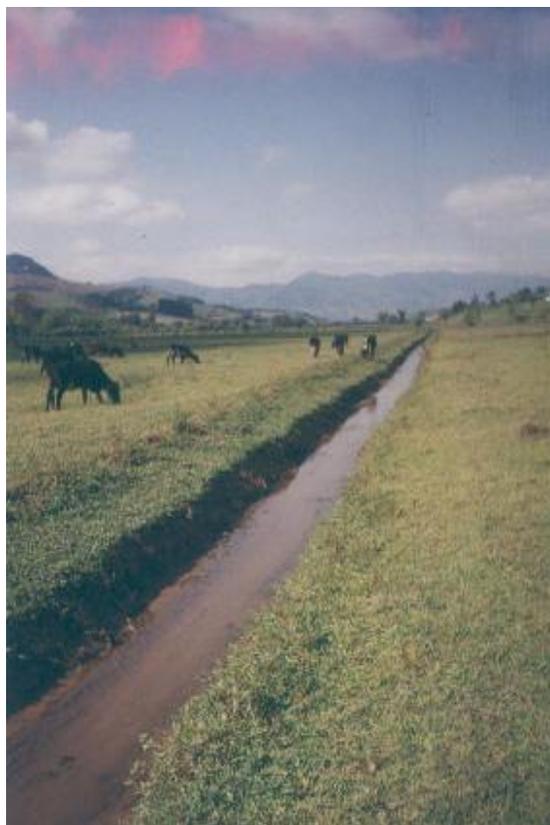


Figura 7- Canal 3 após limpeza, março de 2004. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG

O canal 1 foi limpo em dezembro de 2004, e nos meses de abril e junho de 2005. O canal 2 foi limpo nos mesmos meses que o canal 1, e foi dragado e limpo em outubro de 2005. O canal 3 foi limpo nos meses de agosto e dezembro de 2003, em março de 2004, e nos meses de abril, julho e outubro de 2005. O canal 4 foi limpo em novembro de 2003, e nos meses de março e maio de 2004, e abril e junho de 2005. O canal 5 foi limpo em março e maio de 2004, e nos meses de abril e junho de 2005. As limpezas que ocorreram nos canais amostrados estão resumidas na Tabela 1.

TABELA 1

Descrição dos canais onde foram estabelecidos os pontos de amostragem, com as coordenadas geográficas (UTM) obtidas de GPS, número de meses em que foi limpa, durante o trabalho (NML), os meses em que ocorreu a limpeza e os anos em que foram limpos (AL) várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG

	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4	Canal 5
UTM	7516182	7516181	7516445	7516324	7516456
NML	3	4	6	5	4
Meses em que ocorreu a limpeza	Dez/2004 Abr/2005 jun/2005	Dez/2004 Abr/2005 Jun/2005 Out/2005	Ago/2003 Dez/2003 Mar/2004 Abr/2005 Jul/2005 Out/2005	Nov/2003 Mar /2004 Mai/2004 Abr/2005 Jun /2005.	Mar/2004 Mai/2004, Abr/2005 Jun/ 2005
AL*	1° 2° 3°	1° 2° 3°	1° (3x) 2° 3°	1° (2x) 2° (2x) 3°	1° 2° (2x) 3°

\* 1° ano: maio de 2003 a abril de 2004. 2° ano: maio de 2004 a abril de 2005. 3° ano: maio de 2005 a abril de 2006.

Além da remoção da vegetação, outras alterações do habitat dos moluscos ocorreram no local. A água dos canais transbordou durante a estação chuvosa nos três anos de amostragem, alagando parcialmente a várzea. (FIG 8).



Figura 8- Várzea inundada-Dezembro de 2004. Várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

A inundação ocorreu com maior intensidade em janeiro de 2005, quando a várzea foi completamente alagada. Os canais 1 e 2 foram assoreados gradualmente durante os dois primeiros anos, mas foram dragados e limpos no terceiro ano.

## **6.2- Identificação das espécies de moluscos**

As espécies encontradas nos pontos de amostragem foram identificadas como: *Lymnaea columella*, *Physa marmorata*, *Drepanotrema cimex*, *Biomphalaria* sp., e *Pomacea* sp. Durante a realização do trabalho, só foram encontrados espécimes jovens de *Pomacea* sp. e *Biomphalaria* sp., o que impossibilitou a identificação até nível específico, uma vez que os moluscos não apresentavam órgãos sexuais completamente desenvolvidos.

## **6.3- Coleta de moluscos**

### **6.3.1- Variação das populações de moluscos**

Durante o trabalho foram coletados 1026 exemplares de *L. columella*, 439 de *D. cimex*, 75 de *P. marmorata*, 12 de *Biomphalaria* sp. e 9 de *Pomacea* sp.

Nos três anos de coleta observou-se que as populações de *L. columella* apresentavam um aumento durante os meses em que a precipitação era menor: entre junho e setembro de 2003, entre agosto e setembro de 2004 e entre junho e setembro de 2005. Populações de *D. cimex* apresentaram um padrão diferente, com um aumento entre dezembro e abril. Espécimes de *Pomacea* sp. somente

foram encontrados nos meses de março, setembro e novembro de 2005, e em janeiro de 2006. O terceiro ano de amostragem foi o período em que o menor número de moluscos foi coletado. A tabela 2 mostra a variação das populações de moluscos nos três anos de trabalho.

TABELA 2

Variação das populações de gastrópodes nos pontos de amostragem de maio de 2003 a abril de 2006- várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG

	<i>Lymnaea</i>	<i>Physa</i>	<i>Drepanotrema</i>	<i>Biomphalaria</i>	<i>Pomacea</i>
mai/03	0	0	0	0	0
jun/03	0	0	0	0	0
jul/03	120	0	3	1	0
ago/03	164	5	52	0	0
set/03	193	7	2	0	0
out/03	60	17	0	1	0
nov/03	31	3	46	1	0
dez/03	22	2	2	1	0
jan/04	18	0	16	0	0
fev/04	19	1	19	1	0
mar/04	14	1	118	0	0
abr/04	6	2	26	1	0
mai/04	7	2	34	1	0
jun/04	0	0	0	0	0
jul/04	13	0	0	0	0
ago/04	12	0	12	0	0
set/04	180	3	0	0	0
out/04	15	3	0	0	0
nov/04	32	1	1	1	0
dez/04	16	16	9	2	0
jan/05	0	0	0	0	0
fev/05	0	0	31	2	0
mar/05	0	0	34	0	5
abr/05	0	0	15	0	0
mai/05	0	3	2	0	0
jun/05	1	1	0	0	0
jul/05	12	2	0	0	0
ago/05	40	2	0	0	0
set/05	42	0	2	0	1
out/05	6	0	0	0	0
nov/05	2	0	1	0	2
dez/05	1	0	2	0	0
jan/06	0	4	5	0	1
fev/06	0	0	2	0	0
mar/06	0	0	2	0	0
abr/06	0	0	3	0	0
Total	1026	75	439	12	9

**pdfMachine** - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

### 6.3.2- Variação das populações de *L. columella*

Durante o período de estudo, a população de *L. columella* apresentou um aumento durante o período de junho a outubro, seguido de uma diminuição nos meses seguintes. Os testes de correlação entre as populações de *L. columella* nos três anos de amostragem indicaram correlações fortes entre os mesmos ( $r_s = 0,73$  entre anos 1 e 2,  $r_s = 0,85$  entre anos 1 e 3 e  $r_s = 0,76$  entre anos 1 e 3.)

#### 6.3.2.1- Comparação entre os pontos de amostragem

Foram observadas diferenças significativas entre as populações dos diversos pontos de amostragem. As maiores semelhanças foram observadas entre os pontos de amostragem 4 e 5 ( $r=0,72$ ), e a maior diferença foi observada entre os pontos 3 e 5 ( $-0,11$ ). Os gráficos 4, 5 e 6 mostram a variação da população de *L. columella* nos cinco pontos de amostragem. A comparação da variação das populações de *L. columella* entre os cinco pontos de amostragem encontra-se na Tabela 3, e os resultados dos testes de correlação entre os mesmos estão resumidos na Tabela 4.

TABELA 3

Número de exemplares de *Lymnaea. columella* coletadas nos cinco pontos de amostragem de maio de 2003 a abril de 2006 várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG

(Continua)

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Total
mai/03	0	0	0	0	0	0
jun/03	0	0	0	0	0	0
jul/03	0	0	0	87	33	120
ago/03	46	0	0*	49	69	164
set/03	63	0	0	16	29	193
out/03	12	6	0	18	30	60

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

TABELA 3

Número de *Lymnaea columella* coletadas nos cinco pontos de amostragem de maio de 2003 a abril de 2006 várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG  
(Conclusão)

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Total
nov/03	2	4	6	4	15*	31
dez/03	1	4	17*	2	0	22
jan/04	7	8	3	0	0	18
fev/04	18	1	0	0	0	19
mar/04	13	1	0*	0	0*	14
abr/04	3	0	0	0	3	6
mai/04	5	0	0	2	0*	7
jun/04	0	0	0	0	0	0
jul/04	1	0	0	6	6	13
ago/04	2	0	0	10	0	12
set/04	5	0	0	147	28	180
out/04	4	0	1	10	0	15
nov/04	9	0	0	5	18	32
dez/04	4*	0*	8	2	2	16
jan/05	0	0	0	0	0	0
fev/05	0	0	0	0	0	0
mar/05	0	0	0	0	0	0
abr/05	0*	0*	0*	0	0	0
mai/05	0	0	0	0	0	0
jun/05	0*	0*	0	0	1	1
jul/05	0	0	0*	0	12	12
ago/05	0	0	0	8	32	40
set/05	0	0	0	26	16	42
out/05	0	0*	0*	4	2	6
nov/05	0	0	0	2	0	2
dez/05	0	0	1	0	0	1
jan/06	0	0	0	0	0	0
fev/06	0	0	0	0	0	0
mar/06	0	0	0	0	0	0
abr/06	0	0	0	0	0	0

(\*)- meses em que ocorreu a limpeza do canal.

TABELA 4

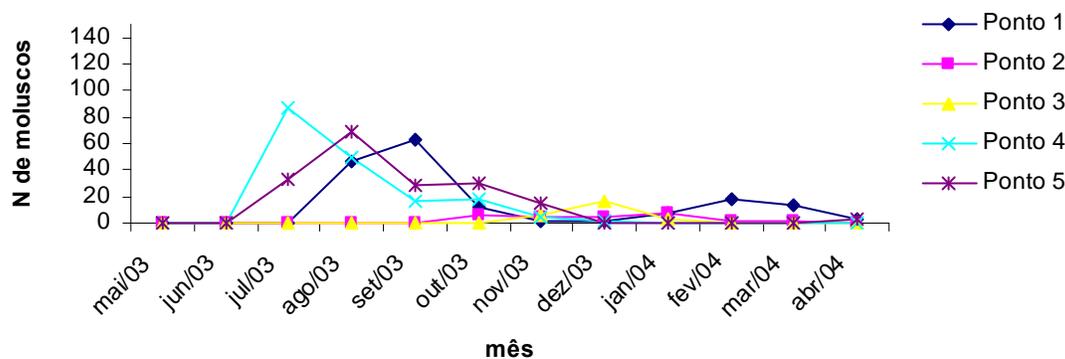
Coefficientes de correlação (r) entre as populações de *Lymnaea. columella* nos pontos de amostragem várzea do córrego Piranguçu, Itajubá, MG

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Ponto 1	x	0,49	0,22	0,43	0,32
Ponto 2	0,49	x	0,45	-0,01	-0,03
Ponto 3	0,23	0,45	x	0,05	-0,11
Ponto 4	0,43	-0,01	0,05	x	0,72
Ponto 5	0,32	-0,03	-0,11	0,72	x

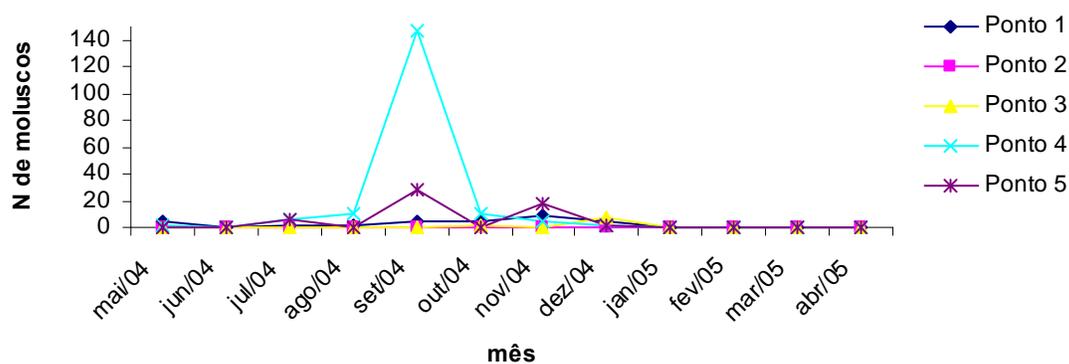
pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

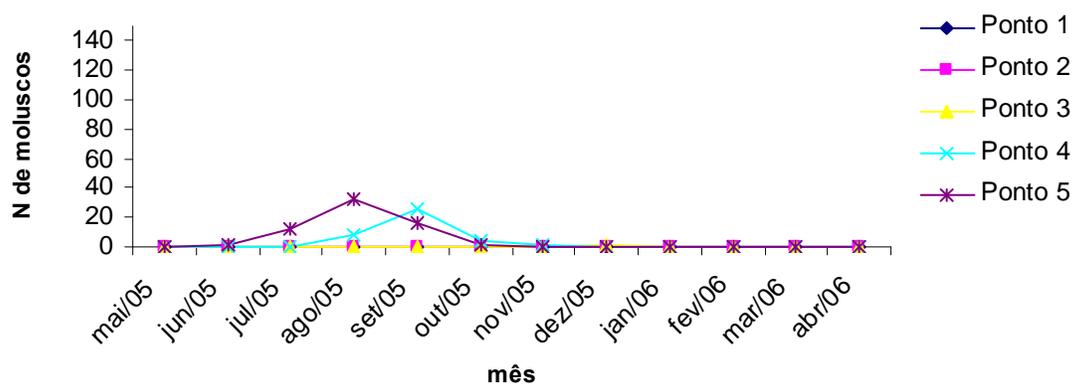
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA



**Gráfico 4- Variação da população de *Lymnaea columella* nos cinco pontos de amostragem de maio de 2003 a abril de 2004**



**Gráfico 5- Variação da população de *Lymnaea columella* nos cinco pontos de amostragem de maio de 2004 a abril de 2005**



**Gráfico 6- Variação da população de *Lymnaea columella* nos cinco pontos de amostragem de maio de 2005 a abril de 2006**

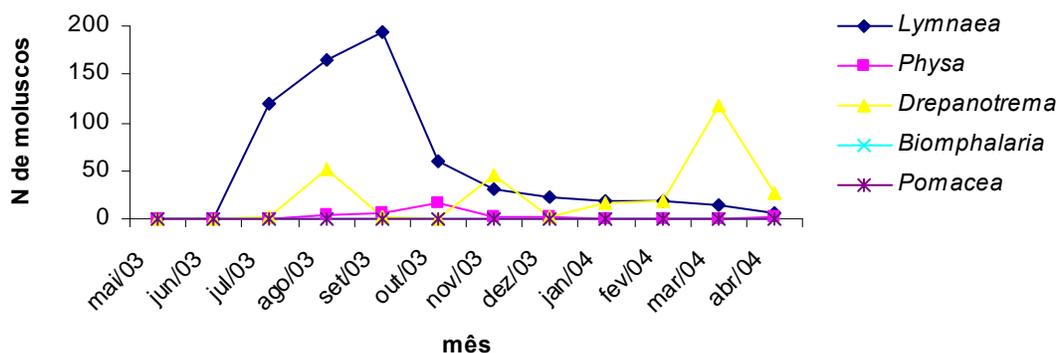
### 6.3.2.2-Comparação com populações de outros gastrópodes

A comparação entre as variações das populações de gastrópodes encontram-se nos gráficos 7, 8 e 9. Os testes de correlação mostraram que há pouca semelhança entre as variações de populações das diferentes espécies de gastrópodes. Os coeficientes de correlação encontrados estão resumidos na tabela 5. A única correlação estatisticamente significativa foi observada entre as populações de *L. columella* e *P. marmorata* ( $r=0,52$ ).

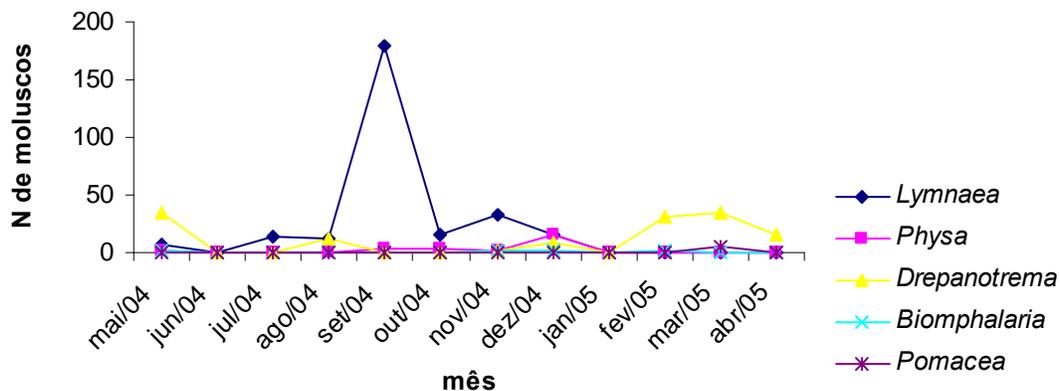
TABELA 5

Coeficientes de correlação observados na comparação entre as variações de populações das diferentes espécies de gastrópodes presentes no local de estudo

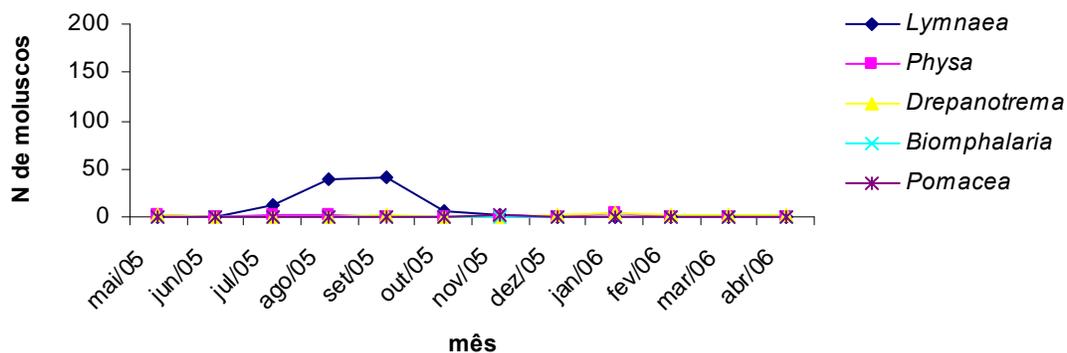
	<i>Lymnaea</i>	<i>Physa</i>	<i>Drepanotrema</i>	<i>Biomphalaria</i>	<i>Pomacea</i>
<i>Lymnaea</i>	x	0,52	0,05	0,3	-0,14
<i>Physa</i>	0,52	x	0,09	0,32	-0,14
<i>Drepanotrema</i>	0,05	0,09	x	0,36	0,12
<i>Biomphalaria</i>	0,3	0,32	0,36	x	-0,22
<i>Pomacea</i>	-0,14	0,14	-0,13	-0,22	x



**Gráfico 7- Comparação da variação das populações de gastrópodes de maio de 2003 a abril de 2004**



**Gráfico 8- Comparação da variação das populações de gastrópodes de maio de 2004 a abril de 2005**



**Gráfico 9- Comparação da variação das populações de gastrópodes de maio de 2005 a abril de 2006**

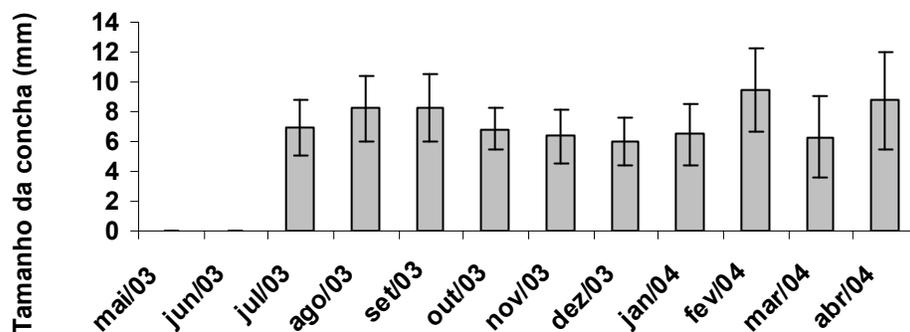
### 6.3.2.3- Correlações entre populações de *L. columella* e dados climáticos

Ao se comparar as variações mensais das populações de *L. columella* com os dados climáticos através dos testes de correlação, foram observadas correlações negativas fracas entre as médias de populações e as médias mensais

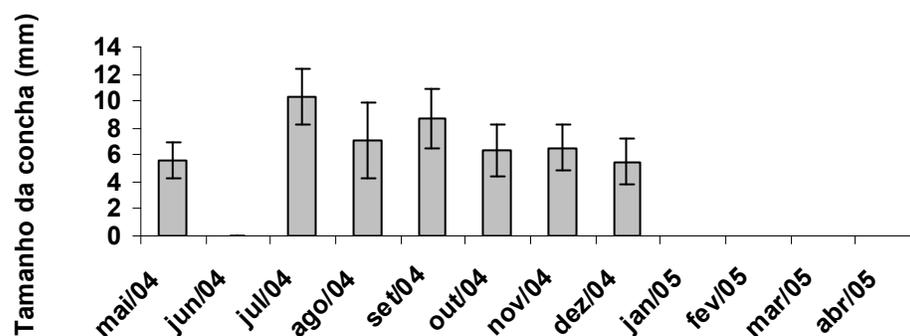
de temperatura ( $r_s = 0,2$ ), e entre as médias de populações e as médias mensais de precipitação ( $r_s = 0,28$ ).

A maior média do tamanho da concha foi observada em setembro de 2005 ( $x=10,4$   $s=10,2$ ), e a menor, em julho de 2004 ( $x=5,5$   $s=1,7$ ). Observou-se uma diminuição desta média entre os meses de outubro, novembro e dezembro em 2003 e 2004, e no mês de setembro de 2005. Um aumento gradual do tamanho da concha foi observado entre os meses de julho e setembro de 2003, janeiro e fevereiro de 2004, agosto e setembro deste mesmo ano, e entre julho e agosto de 2005. Portanto, nos três anos pesquisados, observou-se um aumento na proporção de moluscos menores durante os primeiros meses da estação das chuvas (outubro e novembro). Estes dados sugerem a existência de duas gerações distintas de *L. columella* por ano no local de trabalho, uma vez que nos três anos pesquisados houve pelo menos dois picos diferentes na média do tamanho de concha, seguidos por uma diminuição dos mesmos.

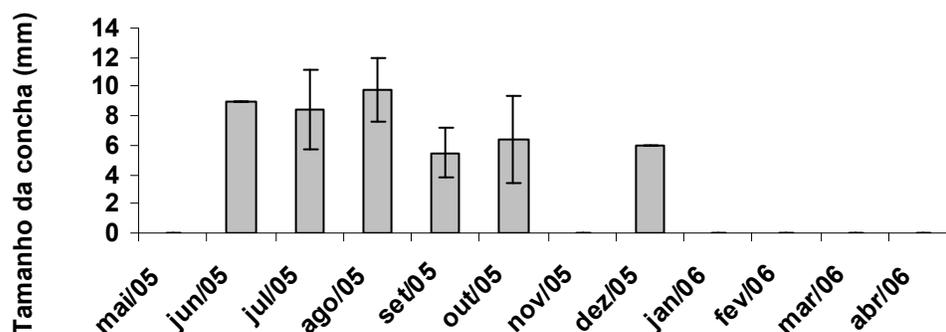
Os testes de correlação indicaram correlações negativas fracas entre média do tamanho da concha e temperatura ( $r_s = -0,44$ ) e entre tamanho da concha e precipitação ( $r_s = -0,56$ ). Os gráficos 10, 11 e 12 mostram a variação das médias dos tamanhos da concha de *L. columella* nos três anos de amostragem.



**Gráfico 10- Variação das médias das medidas de conchas de *Lymnaea columella* no período de maio de 2003 a abril de 2004**



**Gráfico 11- Variação das médias das medidas de conchas de *Lymnaea columella* no período de maio de 2004 a abril de 2005**



**Gráfico 12- Variação das médias das medidas de conchas de *Lymnaea columella* no período de maio de 2005 a abril de 2006**

### 6.3.3- Taxa de infecção natural de *L. columella* com *F. hepatica*.

A variação mensal do número de moluscos naturalmente infectados se encontra na tabela 6.

TABELA 6

Número de moluscos coletados, número de indivíduos naturalmente infectados e taxa de infecção natural de *Lymnaea columella* na área de estudo

Mês/ano	N de moluscos coletados	N de infectados	% de infectados
mai/03	0	0	0
jun/03	0	0	0
jul/03	120	0	0
ago/03	164	0	0
set/03	193	6	3,1
out/03	60	0	0
nov/03	31	1	3,2
dez/03	22	1	4,5
jan/04	18	0	0
fev/04	19	1	5,3
mar/04	14	0	0
abr/04	6	0	0
mai/04	7	0	0
jun/04	0	0	0
jul/04	13	0	0
ago/04	12	0	0
set/04	180	1	0,6
out/04	15	1	6,7
nov/04	32	0	0
dez/04	16	3	18,8
jan/05	0	0	0
fev/05	0	0	0
mar/05	0	0	0
abr/05	0	0	0
mai/05	0	0	0
jun/05	1	0	0
jul/05	12	2	16,7
ago/05	40	0	0
set/05	42	1	2,4
out/05	6	0	0
nov/05	2	0	0
dez/05	1	0	0
jan/06	0	0	0
fev/06	0	0	0
mar/06	0	0	0
abr/06	0	0	0
Total	1026	17	1,7

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

A média mensal de infecção natural de *L. columella* com *F. hepatica* observada foi baixa (1,7%). Espécimes de *L. columella* naturalmente infectados por *F. hepatica* foram encontrados em nove dos 36 meses de coleta. A variação da taxa de infecção natural não apresentou um padrão definido, e as maiores taxas de infecção foram observadas em dezembro de 2004 (18,7%) e julho de 2005 (16,6%).

## 6.4-Resultado das infecções experimentais

### 6.4.1- Influência do tamanho da concha de *L. columella* na infecção experimental

As ocorrências de infecção por classe de tamanho das conchas dos caramujos infectados em laboratório encontram-se na tabela 7.

TABELA 7

Comparação entre os resultados das infecções de *Lymnaea columella* com *Fasciola hepatica* nas sete categorias de tamanho testadas

Classes de tamanho (mm)	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	>14
N de moluscos infectados	100	100	100	100	100	100	100
moluscos com rédias (%)	67	79	78	51	16	21	2
moluscos com cercárias (%)	38	14	3	9	2	0	0
moluscos mortos no 31º dia após infecção (%)	21	23	17	40	36	38	50
Média de rédias por molusco positivo	21,3	14	9,1	10,9	7,8	2,6	2
Média de cercárias por molusco positivo	22,1	15,4	2,3	15,2	8	0	0

O grupo que apresentou maior suscetibilidade foi o de moluscos com conchas de 4-6 milímetros (79%), e o que apresentou menor suscetibilidade foi o de caramujos com concha maior que 14mm (2%). Rédias foram observadas em todos os moluscos infectados, enquanto cercárias estavam presentes em apenas

21% dos mesmos, sendo que a maior proporção foi observada nos moluscos com tamanho de concha de 2-4mm (38%), e a menor nos moluscos com tamanho de concha superior a 12mm (0%). A maior taxa de mortalidade foi observada nos moluscos com tamanho de concha maior que 14 mm (50%), e a menor nos de 6-8mm (17%). No entanto, não foi observada nenhuma relação entre tamanho de concha e taxa de mortalidade após a infecção, e as únicas diferenças estatisticamente significativa foram observadas entre os grupos de 2-4mm e 8-10mm (Q= 8,52, p=0,04) e entre os grupos 2-4mm e >14mm (Q=18,36, p=0).

O modelo de regressão logística indicou uma associação não linear entre a classe de tamanho dos caramujos e o fator infecção. A probabilidade de ocorrer infecção em um caramujo de uma determinada categoria de tamanho pode ser calculada pela fórmula:

$$P(I = 1) = \frac{1}{1 + \exp\{-(\beta_0 + \beta_1 T)\}}$$

$P(I = 1)$ : probabilidade de ocorrer infecção;

T: Categoria de tamanho: T= 1 (2-4mm)...T=7 (>14mm)

$\beta_0$  e  $\beta_1$ : coeficientes de regressão

A tabela 8 mostra os resultados do teste de regressão logística para a presença de rédias em moluscos de diferentes categorias de tamanho, e a tabela 9 mostra os resultados do teste para a presença de cercárias.

TABELA 8  
Resultados da regressão logística binária: Rédias x categoria de tamanho

<i>"Predictor"</i>	<i>Coef</i>	<i>SE Coef</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>	<i>"Odds Ratio"</i>	<i>95% "Lower"</i>	<i>CI "Upper"</i>
Constante	2,37608	0,217591	10,92	0	-	-	-
Classe de tamanho	-0,666868	0,0526176	-12,67	0	0,51	0,46	0,57

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

TABELA 9  
Resultados da regressão logística binária: cercárias x categoria de tamanho

"Predictor"	Coef	SE Coef	Z	P	"Odds Ratio"	95% "Lower"	CI "Upper"
Constante	0,238312	0,273193	0,87	0,383	-	-	-
Classe de tamanho	-0,666868	0,0526176	-12,67	0	0,41	0,33	0,52

Os coeficientes encontrados para rédias e cercárias foram negativos (-0.6668 e -0.8877, respectivamente), o que significa que quanto maior a categoria de tamanho, menor a probabilidade de ocorrer infecção. Portanto, a probabilidade de *L. columella* se infectar e apresentar rédias aos 31 dias após infecção para uma categoria de tamanho pode ser calculada como:

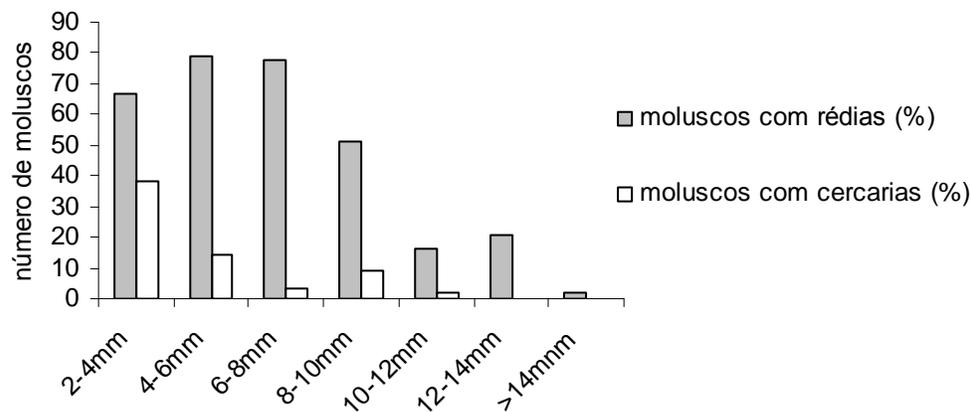
$$P(I = 1) = \frac{1}{1 + \exp\{-(2,376808 - 0,666868T)\}} = 0,51$$

Isto significa que é 0,51 a probabilidade do caramujo de uma classe de tamanho menor. A probabilidade de um molusco de se infectar e apresentar cercárias 31 dias após infecção pode ser calculada como:

$$P(I = 1) = \frac{1}{1 + \exp\{-(0,2383 - 0,8877T)\}} = 0,41$$

Logo, ela é 0,41 a probabilidade de um caramujo de uma classe de tamanho menor.

Estes resultados indicam que, além da frequência de ocorrência, o número de formas larvárias encontrados por caramujo também diminuiu com o aumento da classe de tamanho (Gráfico 13).



**Gráfico 13- Frequência de infecções de *Lymnaea columella* com *Fasciola hepatica* por classe de tamanho**

#### 6.4.2- Efeito do número de miracídios

Os resultados das infecções encontram-se na tabela 10.

TABELA 10

Frequência de infecção de *Lymnaea columella* com diferentes números de miracídios de *Fasciola hepatica*.

Número de miracídios usado	1	2	3	4
Número de moluscos expostos à infecção	50	50	50	50
moluscos infectados (%)	42	28	53	72
Média de rídias encontradas nos moluscos infectados	23,3	23,5	18,5	14
moluscos que apresentaram cercárias após 31 dias(%)	26	18	26	14
Média de cercárias	52,6	31,9	34,4	15,4

Os moluscos infectados com quatro miracídios foram os que apresentaram maior proporção de positivos (72%), e os infectados com dois miracídios os que apresentaram menor proporção (28%). A maior média do número de rídias foi observada nos moluscos infectados com dois miracídios (23,5%), e a menor média foi observada nos infectados com quatro miracídios (15,4%).

(14%). O teste do qui-quadrado indicou diferenças significativas nos resultados das infecções ( $p < 0,05$ ), usando-se de 1 a 4 miracídios, sendo que as maiores diferenças foram observadas entre o grupo infectado com um miracídio, e o grupo infectado com 4 miracídios ( $q = 18,36$ ,  $p = 0,000183$ ). No entanto, não foi observada uma relação linear entre o número de miracídios utilizado e o sucesso da infecção.

#### 6.4.3- Comparação da suscetibilidade de moluscos provenientes de diferentes localidades

##### 6.4.3.1-Comparação da suscetibilidade à infecção por *F. hepatica*

A Tabela 11 mostra a comparação dos resultados das comparações da infectividade de *L. columella* proveniente de diferentes localidades.

TABELA 11

Comparação da suscetibilidade de *Lymnaea columella* proveniente de diferentes localidades

Localidade	Taxa de infecção (%)	Média de rédias	de caramujos com cercárias após 31 dias (%)	Médias de cercárias	Mortalidade (%)
Itajubá	71	14	20	16	23
Rio Doce	86	19,8	53,5	47,3	30,6
Jaboticatubas	76	24,5	63	64	33
Fortaleza	68	18,17	35	16	36
Pelotas	46	28,6	12	22	29

Dentre os espécimes de *L. columella* de diferentes localidades infectados experimentalmente, os que demonstraram a maior suscetibilidade à infecção com *F. hepatica* foram os do município de Rio Doce (86%), e os que apresentaram a menor suscetibilidade foram os provenientes de Pelotas (46%). A maior média de rédias nos espécimes positivos foi observada em caramujos de Pelotas (46), e a menor nos moluscos de Fortaleza (18,17). A maior mortalidade aos 31 dias após

infecção foi observada nos caramujos de Fortaleza (36%), a menor entre os de Pelotas(29%). A única diferença estatisticamente significativa entre as taxas de mortalidade foi observada entre os moluscos de Fortaleza e Itajubá (Q= 4,06 p=0,043). Os moluscos de Jaboticatubas apresentaram a maior proporção de indivíduos com cercárias aos 31 dias após infecção (63%), assim como a maior média de cercarias (64).

#### 6.4.3.2-Comparação do número de rédias e cercárias obtidos de moluscos de diferentes localidades

As Tabelas 12 a 16 mostram os resultados do teste estatístico de Poisson para o número de rédias encontrado nos moluscos de diferentes localidades.

TABELA 12  
Comparação de Fortaleza (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	"Estimate"	"Std. Error"	"z value"	Pr(> z )
(Intercept)	0.6523	0.1021	6.392	1.64e-10
Rio Doce	1.6991	0.1110	15.307	2.05e-9
Pelotas	-1.7311	0.2631	-6.579	4.74e-11
Jaboticatubas	2.0807	0.1082	19.223	< 2e-16
Itajubá	0.1131	0.1228	0.922	0.357

A análise do número de rédias obtidas de *L. columella* proveniente de Fortaleza apresentou coeficientes estatisticamente inferiores aos de moluscos do Rio Doce e de Jaboticatubas, coeficientes maiores que Itajubá e coeficientes não diferentes de Pelotas.

TABELA 13

Comparação de Rio Doce (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	"Estimate"	"Std. Error"	"z value"	Pr(> z )
(Intercept)	2.35138	0.04364	53.877	< 2e-16
Fortaleza	-1.69905	0.11100	-15.307	< 2e-16
Pelotas	-3.43018	0.24643	-13.919	< 2e-16
Jaboticatubas	0.38169	0.05661	6.742	1.56e-11
Itajubá	-1.58591	0.08097	-19.587	< 2e-16

Ao se comparar moluscos do Rio Doce com os dos demais municípios, a análise apresentou coeficientes maiores que os de Fortaleza, Pelotas e Itajubá. Apesar do valor-p na comparação com *L. columella* proveniente de Jaboticatubas (valor-p= 0.03665) não ser inferior ao nível de significância (0.0125), ele pode ser considerado pequeno, e indica que os moluscos do Rio Doce apresentaram coeficientes estatisticamente inferiores aos moluscos desta localidade.

TABELA 14

Comparação de Pelotas (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	"Estimate"	"Std. Error"	"z value"	Pr(> z )
(Intercept)	-1.0788	0.2425	-4.448	8.67e-06
Rio Doce	1.7311	0.2631	6.579	4.74e-11
Fortaleza	3.4302	0.2464	13.919	< 2e-16
Jaboticatubas	3.8119	0.24520	15.546	< 2e-16
Itajubá	1.8443	0.2519	7320	2.48e-13

Na comparação dos moluscos de Pelotas com os dos demais municípios, verificou-se que a análise gerou coeficientes maiores que os de Itajubá, mas inferiores aos do Rio Doce e de Jaboticatubas. Os moluscos de Pelotas não geraram coeficientes estatisticamente diferentes dos de Fortaleza.

TABELA 15

Comparação de Jaboticatubas (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	<i>"Estimate"</i>	<i>"Std. Error"</i>	<i>"z value"</i>	<i>Pr(&gt; z )</i>
(Intercept)	2.73307	0.03606	75.790	< 2e-16
Rio Doce	-2.08074	0.10824	-19.223	< 2e-16
Pelotas	-0.38169	0.05661	-6.742	1.56e-11
Fortaleza	-3.81188	0.24520	-15.546	< 2e-16
Itajubá	-1.96760	0.07715	-25.505	< 2e-16

Os moluscos de Jaboticatubas apresentaram coeficientes superiores a todos os demais municípios, com menos ênfase para sua comparação com os do Rio Doce, que apesar de ter apresentado um valor-p pequeno (0.0366), este não é considerado significativo, por não ser inferior ao nível descritivo de 0.0125.

TABELA 16

Comparação de Itajubá (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	<i>"Estimate"</i>	<i>"Std. Error"</i>	<i>"z value"</i>	<i>Pr(&gt; z )</i>
(Intercept)	-1.96760	0.07715	-25.505	< 2e-16
Rio Doce	-1.58591	0.08097	-19.587	< 2e-16
Pelotas	1.8443	0.2519	7320	2.48e-13
Jaboticatubas	-1.96760	0.07715	-25.505	< 2e-16
Fortaleza	0.1131	0.1228	0.922	0.357

Os moluscos de Itajubá apresentaram a menor taxa de incidência de Rédias, que se mostrou estatisticamente inferior nos quatro modelos. Os resultados obtidos na modelagem das rédias mostram que os moluscos provenientes do Rio Doce e de Jaboticatubas apresentam coeficientes, ao nível de 5%, superiores aos demais.

As Tabelas 17 a 21 mostram os resultados do modelo de Poisson para os números de cercarias encontrados em moluscos de diferentes localidades.

TABELA 17

Comparação de Fortaleza (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	<i>"Estimate"</i>	<i>"Std. Error"</i>	<i>"z value"</i>	<i>Pr(&gt; z )</i>
(Intercept)	0.6523	0.1021	6.392	1.64e-10
Rio Doce	1.6991	0.1110	15.307	2.05e-09
Pelotas	-1.7311	0.2631	-6.579	4.74e-11
Jaboticatubas	2.0807	0.1082	19.223	< 2e-16
Itajubá	0.1131	0.1228	0.922	0.357

Comparando-se os moluscos de Fortaleza com os das demais regiões foi demonstrado que sua suscetibilidade gerou coeficientes estatisticamente inferiores aos apresentados por moluscos do Rio Doce e de Jaboticatubas, maiores que os de Pelotas e não diferentes de Itajubá.

TABELA 18

Comparação de Rio Doce (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	<i>"Estimate"</i>	<i>"Std. Error"</i>	<i>"z value"</i>	<i>Pr(&gt; z )</i>
(Intercept)	2.35138	0.04364	53.877	< 2e-16
Fortaleza	-1.69905	0.11100	-15.307	< 2e-16
Pelotas	-3.43018	0.24643	-13.919	< 2e-16
Jaboticatubas	0.38169	0.05661	6.742	1.56e-11
Itajubá	-1.58591	0.08097	-19.587	< 2e-16

Os moluscos do Rio Doce apresentaram coeficientes estatisticamente maiores que os de Fortaleza, Pelotas e Itajubá, e inferiores aos de Jaboticatubas.

TABELA 19

Comparação de Pelotas (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	<i>"Estimate"</i>	<i>"Std. Error"</i>	<i>"z value"</i>	<i>Pr(&gt; z )</i>
(Intercept)	-1.0788	0.2425	-4.448	8.67e-06
Rio Doce	1.7311	0.2631	6.579	4.74e-11
Fortaleza	3.4302	0.2464	13.919	< 2e-16
Jaboticatubas	3.8119	0.24520	15.546	< 2e-16
Itajubá	1.8443	0.2519	7320	2.48e-13

Os moluscos provenientes de Pelotas apresentaram coeficientes estatisticamente menores que todos os demais, e os do município de Jaboticatubas apresentaram os maiores coeficientes dentre todas as raças geográficas testadas.

TABELA 20

Comparação de Jaboticatubas (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	"Estimate"	"Std. Error"	"z value"	Pr(> z )
(Intercept)	2.73307	0.03606	75.790	< 2e-16
Rio Doce	-2.08074	0.10824	-19.223	< 2e-16
Pelotas	-0.38169	0.05661	-6.742	1.56e-11
Fortaleza	-3.81188	0.24520	-15.546	< 2e-16
Itajubá	-1.96760	0.07715	-25.505	< 2e-16

TABELA 21

Comparação de Itajubá (localidade de referência) com as demais localidades, através do teste de Poisson. Coeficientes:

	"Estimate"	"Std. Error"	"z value"	Pr(> z )
(Intercept)	-1.96760	0.07715	-25.505	< 2e-16
Rio Doce	-1.58591	0.08097	-19.587	< 2e-16
Pelotas	1.8443	0.2519	7320	2.48e-13
Jaboticatubas	-1.96760	0.07715	-25.505	< 2e-16
Fortaleza	0.1131	0.1228	0.922	0.357

Os resultados obtidos na modelagem das cercárias mostram que os moluscos de Rio Doce e Jaboticatubas apresentam coeficientes, superiores aos demais, ao nível de 5%. Os moluscos que apresentaram os menores coeficientes para ocorrência de cercárias 31 dias após infecção foram os de Pelotas, que se mostrou estatisticamente inferior nos quatro modelos.

#### 6.4.4- Associações simpátricas/alopátricas de *F. hepatica* com *L. columella*

A Tabela 22 mostra a comparação dos resultados das infecções experimentais com associações simpátricas e alopátricas do parasito com o hospedeiro:

TABELA 22

Comparação dos resultados das infecções em associações simpátricas de *L. columella* com *F. hepatica* (Parasito de Itajubá x hospedeiro de Itajubá) e alopátricas (Parasito de Itajubá x hospedeiro de Pelotas; parasito de Pelotas x hospedeiro de Itajubá).

	Taxa de infecção (%)	Média de rédias	moluscos com cercárias(%)	Média de cercárias Por molusco	Mortalidade
<i>Lymnaea</i> Pelotas	46	28,6	12	22	29
<i>Fasciola</i> Itajubá					
<i>Lymnaea</i> Itajubá	60	23,5	16	15,7	23,8
<i>Fasciola</i> Pelotas					
<i>Lymnaea</i> Itajubá	76	17,5	18	19	27
<i>Fasciola</i> Itajubá					
<i>Lymnaea</i> Pelotas	20	9,2	0	0	30
<i>Fasciola</i> Pelotas					

A associação alopátrica entre parasita e hospedeiro foram mais eficientes que as associações simpátricas nos caramujos de Itajubá, no entanto foi mais eficiente nos moluscos provenientes de Pelotas. As Tabelas 23 a 26 mostram o resultado das comparações no modelo de regressão logística.

TABELA 23

Comparação através do modelo de regressão logística da associação simpátrica de *Lymnaea columella* com *Fasciola hepatica* de Itajubá (CMG/FMG, associação de referência) com as demais associações: *L. columella* de Pelotas com *F. hepatica* de Pelotas (CRS/FRS), *L. columella* de Pelotas com *F. hepatica* de Itajubá (CRS/FMG), *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Pelotas (CMG/FRS)

"Predictor"	Coef	SE Coef	z	P	Razão		
Constante	1,38629	0,353551	3,92	0			
CRS/FRS	-2,53897	0,484404	-5,24	0	0,08	0,03	0,20
CRS/FMG	-1,54664	0,453336	-3,41	0,001	0,21	0,09	0,52
CMG/FRS	-0,980829	0,456433	-2,15	0,032	0,38	0,15	0,92

TABELA 24

Comparação através do modelo de regressão logística da associação simpátrica de *Lymnaea columella* com *Fasciola hepatica* de Pelotas (CRS/FRS, associação de referência) com as demais associações: *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Itajubá (CMG/FMG), *L. columella* de Pelotas com *F. hepatica* de Itajubá (CRS/FMG), *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Pelotas (CMG/FRS)

"Predictor"	Coef	SE Coef	z	P	Razão		
Constante	-1,15268	0,331133	-3,48	0			
CMG/FMG	2,53897	0,484404	5,24	0	12,67	4,90	32,73
CRS/FMG	0,992337	0,436078	2,28	0,023	2,70	1,15	6,34
CMG/FRS	1,55814	0,439298	3,55	0,000	4,75	2,01	11,24

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

TABELA 25

Comparação através do modelo de regressão logística da associação alopatrica de *L. columella* de Pelotas com *F. hepatica* de Itajubá (CRS/FMG, associação de referência) com as demais associações: *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Itajubá (CMG/FMG), *L. columella* de Pelotas com *F. hepatica* de Pelotas (CRS/FRS), , *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Pelotas (CMG/FRS)

"Predictor"	Coef	SE Coef	Z	P	Razão		
Constante	-0,160343	0,283752	-0,57	0,572			
CRS/FRS	-0,992337	0,436078	-2,28	0,023	0,37	0,16	0,87
CMG/FMG	1,54664	0,453336	3,41	0,001	4,70	1,93	11,42
CMG/FRS	0,565808	0,404782	1,40	0,162	1,76	0,80	3,89

TABELA 26

Comparação através do modelo de regressão logística da associação alopatrica de *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Pelotas (CMG/FRS, associação de referência) com as demais associações: *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Itajubá (CMG/FMG), *L. columella* de Pelotas com *F. hepatica* de Pelotas (CRS/FRS), , *L. columella* de Itajubá com *F. hepatica* de Pelotas (CMG/FRS)

"Predictor"	Coef	SE Coef	Z	P	Razão		
Constante	1,38629	0,353551	3,92	0			
CRS/FRS	1,55814	0,439298	3,55	0,000	4,75	2,01	11,24
CRS/FMG	0,565808	0,404782	1,40	0,162	1,76	0,80	3,89
CMG/FMG	-0,980829	0,456433	-2,15	0,032	0,38	0,15	0,92

Todas as associações apresentaram valores-p próximos a 0.016, com exceção da associação alopatrica de moluscos de Itajubá com *F. hepatica* de Pelotas, (p= 0.032). Portanto, a probabilidade de infecção na associação simpática entre *L. columella* e *F. hepatica* de Itajubá é estatisticamente maior que nas demais.

Os valores-p obtidos na comparação da associação simpática CRS/FRS com as demais também foram todos significativos, mostrando que as chances de infecção, em todas as associações, são maiores que as desta, que apresentou a menor taxa de infecção. A associação alopatrica CMG/FRS não apresentou uma suscetibilidade estatisticamente diferente da associação alopatrica CRS/FMG.

Através da análise do qui-quadrado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as mortalidades dos grupos testados.

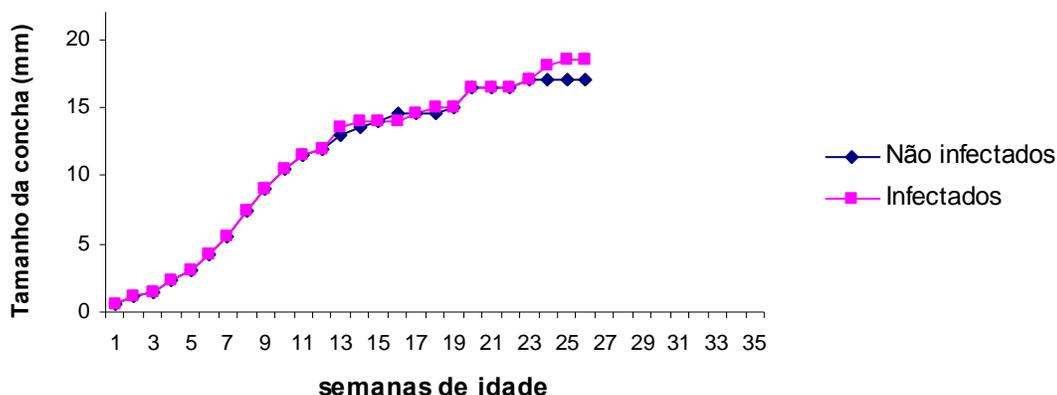
#### **6.4.5- Infecção experimental de *Physa marmorata***

Nenhum dos espécimes de *P. marmorata* expostos a miracídeos de *F. hepatica* apresentou formas larvárias do parasito aos 31 dias após infecção.

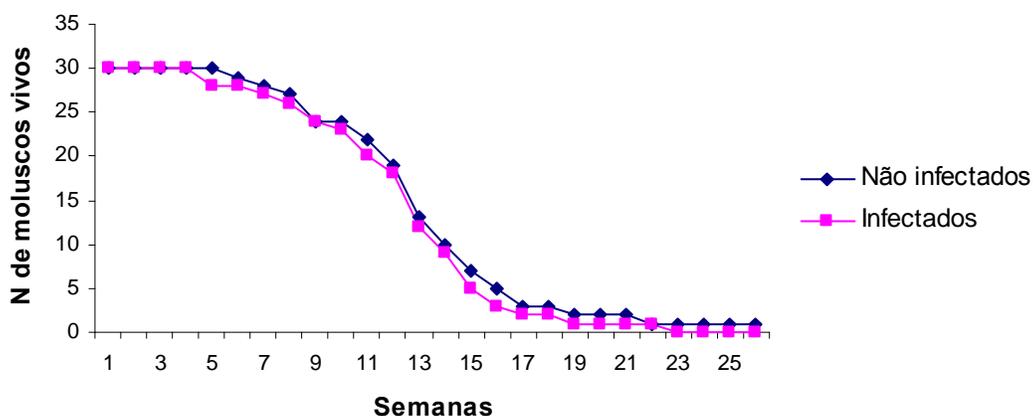
### **6.5- Manutenção do ciclo da *F. hepatica* em animais de laboratório**

#### **6.5.1- Comparação entre crescimento e mortalidade dos moluscos infectados e isentos de infecção**

A longevidade máxima alcançada pelos moluscos criados em laboratório foi de 183 dias, e o maior tamanho de concha observado foi 20.5 mm. O início da ovoposição foi observado a partir do 32º dia após seu nascimento, com a presença de posturas apresentando um número médio de 29,2 ovos por massa, e a eclosão dos primeiros moluscos foi observada a partir de 10 dias após a ovoposição. O ciclo de vida completo, definido como o tempo passado da eclosão do ovo até a realização da primeira postura, variou de 42 a 67 dias. O gráfico 11 mostra a comparação entre o crescimento de espécimes de *L. columella* livres de infecção e infectada experimentalmente, e o gráfico 12 mostra a comparação da mortalidade entre os dois grupos (infectados e não-infectados).



**Gráfico 13- Taxa de crescimento de *Lymnaea columella* livre de infecção e infectada por *Fasciola hepatica***



**Gráfico 14- Sobrevivência de *Lymnaea columella* livre de infecção e infectada por *Fasciola hepatica***

Os moluscos infectados apresentaram o mesmo padrão de crescimento dos não-infectados, com uma taxa de crescimento um pouco superior a partir da 17ª semana pós- infecção, quando os moluscos apresentavam 25 semanas de idade. No entanto, teste de ANOVA não indicou diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tamanhos de concha de moluscos infectados e

isentos de infecção. A mortalidade dos moluscos infectados foi maior que dos grupos não-infectados nas primeiras semanas pós-infecção, tornando-se menor a partir da 9ª. Semana (gráfico 14), mas através do teste do qui-quadrado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as mortalidades dos dois grupos.

A emergência de cercárias foi observada pela primeira vez em um molusco aos 61 dias pós-infecção. No entanto, nos demais testes de suscetibilidade, cercárias retiradas de moluscos dissecados foram observadas se encistando nas placas de Petri aos 31 dias após infecção, quando examinadas.

#### **6.5.2- Comparação da suscetibilidade de *L. columella* a miracídios de *F. hepatica* obtidos de ovos provenientes de bovinos e coelhos**

A tabela 27 mostra o resultado da comparação entre as infecções experimentais utilizando-se miracídios de ovos provenientes de hospedeiros bovinos e coelhos.

TABELA 27

Comparação dos resultados das infecções experimentais de *Lymnaea columella* com miracídios obtidos de ovos de *Fasciola hepatica* provenientes de bovinos e coelhos

Hospedeiro	Taxa de infecção (%)	Média de rédias	Moluscos com cercárias (%)	Média de cercárias	Taxa de Mortalidade (%)
Bovinos	79	14	17,7	16	23
Coelhos	64,7	17,8	5,9	7	29,2

A presença de ovos nas fezes dos coelhos foi observada a partir de 52 dias após a infecção, com uma contagem de sete ovos por grama de fezes. Os moluscos infectados com miracídios provenientes de ovos obtidos de hospedeiros

bovinos apresentaram uma taxa de infecção maior que os infectados com *F. hepatica* proveniente de coelhos.

Para a análise estatística, foi criada uma variável indicadora, que assume valores 1 ou 0, para o hospedeiro, sendo 1 para a classe indicar que se trata de bovino e 0 para coelho. Considerou-se  $I$  a variável aleatória que caracteriza a ocorrência do evento infecção, sendo que  $I = 1$ , representa a ocorrência de infecção e  $I = 0$ , representa a não ocorrência. Sendo assim, o modelo proposto produz a seguinte relação:

$$P(I = 1) = \frac{1}{1 + \exp\{-(\beta_0 + \beta_1 V)\}}$$

$P(I = 1)$ : Representa a probabilidade de ocorrer infecção;

$V$ : Indicadora de hospedeiro  $V = 0$  (bovino) ou  $V = 1$  (coelho).

$\beta_0$  e  $\beta_1$ : Os coeficientes do modelo de regressão que precisam ser estimados.

As Tabelas 28 e 29 mostram o resultado do teste de regressão logística para a presença de rédias e cercárias, provenientes dos dois tipos de hospedeiros.

TABELA 28

Coeficientes do modelo de regressão logística, obtidos a partir da comparação do número de rédias

"Predictor"	Coef	SE Coef	Z	P	Ratio	Lower	Upper
Constante	0,575364	0,294628	1,95	0,051			
Bovino/coelho	0,178408	0,422750	0,42	0,673	1,20	0,52	2,74

TABELA 29

Coeficientes do modelo de regressão logística, obtidos a partir da comparação do número de cercárias

"Predictor"	Coef	SE Coef	Z	P	Ratio	Lower	Upper
Constante	-2,75154	0,595488	-4,62	0,000			
Bovino/coelho	0,936245	0,721609	1,30	0,194	2,55	0,62	10,49

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Os parâmetros estimados relativos ao tipo de hospedeiro (bovino/coelho) foram testados e geraram valores-p (Tabelas 18 e 19, coluna P ) maiores que o nível de significância adotado ( 0.05). Isto mostra que, tanto para rédias como para cercárias, a probabilidade de infecção utilizando-se miracídios obtidos de ovos provenientes de hospedeiros bovinos e coelhos não são estatisticamente diferentes.

A comparação da mortalidade dos dois grupos através do teste de qui-quadrado não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre moluscos infectados com miracídios obtidos a partir de hospedeiros bovinos e coelhos.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## 7- DISCUSSÃO

### 7.1- Dinâmica da população dos moluscos

A epidemiologia da fasciolose está relacionada com a ecologia do hospedeiro intermediário, e depende da espécie envolvida, do habitat natural em que vivem e das condições climáticas da região (Mattos *et al.*, 1997). A região do município de Itajubá apresenta condições ideais para a ocorrência da fasciolose, por apresentar pastagens localizadas em áreas alagadiças, onde foram detectados criadouros do hospedeiro intermediário. Neste trabalho, observou-se que o habitat dos moluscos limneídeos estava localizado nos canais de drenagem da várzea do córrego Piranguçu, onde coexistem com gastrópodes dos gêneros *Physa*, *Biomphalaria*, *Drepanotrema* e *Pomacea*. As posturas de *L. columella* foram observadas na vegetação aquática, geralmente na parte inferior das folhas de *H. reniformes* e *E. azurea*. Honer (1979) relata, na Europa, a associação de *L. truncatula* Müller 1774 com *Agropyron rumicion crispi*, e indica esta associação como um importante fator na epidemiologia de fasciolose em diversas áreas. Abílio & Watanabe (1998) assinalaram a presença de *L. columella* no estado da Paraíba em um açude, sempre associada a *Eichornia crassipes* e *Pistia stratioides*.

A comparação dos resultados obtidos nos três anos de amostragem indicou a presença de um ciclo anual na população de *L. columella*. Durante o verão, observa-se uma redução na quantidade de moluscos, e um aumento da

proporção de indivíduos jovens. No inverno a população de moluscos aumenta, assim como a proporção de adultos. Diversos autores afirmam que fatores climáticos exercem uma significativa influência na dinâmica de população de moluscos limneídeos. Rondelaud (1977) observou o impacto da redução da quantidade de água no final do outono nas populações de *L. truncatula*. Amato *et al.* (1986) verificaram que em uma fazenda no município de Piquete, no Vale do Paraíba, em São Paulo, a população decrescia ciclicamente entre setembro e janeiro, e aumentava entre março e setembro. No mesmo local, caramujos maiores foram coletados entre março e julho e entre novembro e dezembro, enquanto os menores foram coletados entre janeiro e fevereiro e entre agosto e outubro.

O padrão da variação das populações de *L. columella* observado no local de trabalho pode ser explicado por uma combinação dos fatores climáticos, associados às características físicas da área de trabalho. Durante os meses mais chuvosos, o aumento do fluxo de água nos canais deslocou os moluscos do seu habitat. O impacto do aumento do volume de água nas populações de gastrópodes foi claramente evidenciado em janeiro de 2005, quando ocorreu no local a maior enchente observada nos três anos de trabalho. O alagamento total da várzea causou uma grande alteração do habitat dos moluscos, pois nenhum espécime de *L. columella* foi coletado nos cinco meses seguintes.

Quando comparados com as coletas realizadas no mesmo local em 1999 e 2000 (Coelho, 2000), os resultados obtidos nas coletas mensais apresentaram o mesmo padrão, com uma redução da população de moluscos em janeiro, devido à inundação da área, outra redução coincidente com a época de limpeza dos canais,

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

e um aumento súbito no mês de setembro. A dinâmica de populações de *L. columella* observada em Itajubá foi semelhante à observada por Amato *et al.* (1986) em Piquete, no norte do estado de São Paulo, e por Oliveira *et al.*, (2002) no município de Miricatu, no Vale do Ribeira, no sul do estado.

A limpeza dos canais de irrigação por parte dos fazendeiros exerce influência na dinâmica de população de *L. columella* no local de estudo, pois remove a vegetação aquática utilizada pelos moluscos para se alimentar e realizar as posturas. Além disso, ela aumenta a velocidade do fluxo da água, o que desloca os moluscos do seu habitat. Canais de drenagem foram limpos em quatro ocasiões no primeiro ano de estudo, duas no segundo ano e uma no terceiro. O número de moluscos coletados nos pontos de amostragem diminuiu nos meses seguintes à sua limpeza, em todas as ocasiões em que foram observadas. Em um trabalho realizado anteriormente no mesmo local (Coelho, 2000) foi observado que os canais de drenagem eram limpos pelos fazendeiros no começo da estação das chuvas (setembro ou outubro) e no final (março ou abril), para facilitar o fluxo da água. Nos meses mais secos, ocorreu uma proliferação de macrófitas aquáticas nos canais.

Neste trabalho, foi observada uma mudança no padrão do manejo dos canais: a remoção das macrófitas ocorreu esporadicamente, em diversos meses ao longo dos três anos de estudo, e não ao mesmo tempo e em épocas bem definidas. No entanto, o padrão geral de variação nas populações de *L. columella* foi o mesmo observado nos dois trabalhos, apesar das diferenças no manejo do habitat dos moluscos. O impacto do manejo de canais de drenagem nas populações de *L. columella* também foi observado por Oliveira *et al.* (2002) no

Vale do Ribeira, e foi indicado como um dos principais responsáveis pelos diferentes padrões de variações populacionais observadas nas propriedades dos municípios de Miricatu (SP) e Eldorado (SP).

Comparando-se as densidades populacionais e as medidas das conchas de *L. columella* foi constatado que não havia sincronismo entre os crescimentos de caramujos de todos os criadouros. Como alguns canais foram limpos em diferentes épocas, a recuperação das populações ocorreu de maneira diferente. O fato de não haver sincronismo entre o desenvolvimento das populações de *L. columella* dos diversos canais tornou a densidade populacional e as médias das medidas das conchas de cada ponto de amostragem heterogêneas. Em um mesmo mês, alguns canais só apresentavam indivíduos jovens, enquanto outros apresentavam uma população de adultos de diferentes tamanhos.

A maneira pela qual *L. columella* voltou a colonizar seu habitat após as inundações e a limpeza de canais não ficou clara. Três possibilidades devem ser levadas em consideração: migração a partir de áreas adjacentes, nascimento de moluscos a partir das posturas presentes na vegetação aquática e retorno de espécimes que se encontravam em estado de estivação. De acordo com Islam *et al.* (2001), moluscos limneídeos possuem dois períodos reprodutivos por ano. Neste trabalho, foi confirmada a existência de duas gerações anuais de *L. columella*, o que pode representar uma estratégia para assegurar sua sobrevivência perante as mudanças ambientais. Segundo Honer (1979), há discordância na literatura se moluscos do gênero *Lymnaea* têm ou não estratégias de sobrevivência envolvendo períodos de hibernação/estivação em épocas desfavoráveis. Em uma única ocasião, no mês de abril de 2005, foram observados

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

espécimes de *L. columella* se enterrando na lama, no leito do canal 2, um dia após sua limpeza. Em alguns casos, quando os moluscos voltavam a ser observados em seu habitat após meses de ausência (julho de 2004 e junho de 2005), estes já apresentavam tamanho da concha superior a 8 mm, indicando tratar-se de indivíduos adultos. Portanto, é pouco provável que estes moluscos sejam provenientes de posturas que permaneceram no local. A recolonização dos canais deve ocorrer através da migração de indivíduos provenientes de outras áreas, ou do retorno de espécimes que se encontravam em estivação.

### **7.2- Taxa de infecção natural de *F. hepatica* em *L. columella***

Comparando-se os dados mensais das taxas de infecção natural de *L. columella*, não foi observado um padrão definido na sua variação. A ausência de um padrão pode ser atribuída ao pequeno número de moluscos naturalmente infectados que foram coletados. Espécimes naturalmente infectados foram coletados no mês de setembro nos três anos, no mês de dezembro dos dois primeiros anos, e esporadicamente em outros meses. Oliveira *et al.* (2002) observaram 5,26 e 1,06% de infecção natural em duas fazendas no Vale do Ribeira, SP. Manga-Gonzales *et al.*, (1991) observou diferenças significativas em espécimes de *L. truncatula* de acordo com mês, precipitação, temperatura, local de coleta e tamanho do indivíduo.

Os meses em que se observou um aumento na população de moluscos coincide com o período descrito por Faria *et al.* (2005) e Coelho (2000), que observaram um aumento da quantidade de ovos de *F. hepatica* nas fezes de

bovinos de Itajubá (de junho a outubro). Portanto, durante estes meses, existe uma possibilidade maior de ocorrer infecção de *L. columella*.

De acordo com Faria *et al.* (2005), as médias de temperatura mínima nos meses de abril a setembro estão abaixo do limite mínimo ideal para o desenvolvimento dos estádios larvais de *F. hepatica*, situado entre 10 e 12°C (Ueno, 1975), mas as variações diárias entre a temperatura mínima e a máxima compensavam este efeito. Neste trabalho, foram observados espécimes de *L. columella* naturalmente infectados nos meses mais frios, confirmando que as baixas temperaturas da região não impedem a infecção dos moluscos nem o desenvolvimento de formas larvais de *F. hepatica*.

### **7.3- Criação de *Lymnaea columella***

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de crescimento e mortalidade de moluscos infectados e não-infectados. O aumento do tamanho e a redução da fecundidade dos moluscos infectados são característicos em infecções com *F. hepatica*, mas alguns autores relataram resultados diferentes, como uma redução no tamanho e um aumento da fecundidade de moluscos infectados (Gutierrez *et al.*, 2002). Dreyfuss *et al.*, (2002) relata ter observado uma associação incomum de *L. truncatula* com o parasito, uma vez que não foram observadas aumento no tamanho e redução da fecundidade dos moluscos infectados. A alimentação e a forma de criação podem ter influenciado nos resultados, uma vez que diversos trabalhos relatam a

influência destes fatores na maturidade e reprodução de moluscos limneídeos (Souza, 2000; Islam, 2001).

#### **7.4- Influência da variação do tamanho de exemplares de *Lymnaea columella* na suscetibilidade**

Quanto ao resultado dos testes do efeito do tamanho da concha, verificou-se o mesmo padrão observado em infecções realizadas anteriormente (Coelho, 2000) com os exemplares de tamanho reduzido apresentando maior suscetibilidade. De acordo com Hodasi (1972), os moluscos do gênero *Lymnaea* de menor tamanho são mais suscetíveis à infecção por *Fasciola hepatica*. No entanto, Smith (1987) observou uma relação linear positiva entre a eficiência do desenvolvimento de formas larvárias de *F. hepatica* em *L. truncatula* e tamanho da concha, atribuindo aos moluscos de maior tamanho uma maior probabilidade de os miracídios penetrarem efetivamente em sua epiderme. Outros trabalhos têm mostrado que, quando moluscos de diferentes idades eram testados, os mais jovens aparentavam ser mais suscetíveis (Dacal, 1988; Dreyfuss 2000). Sindou *et al.* (1991) realizaram infecções experimentais de quatro espécies de *Lymnaea* (*L. glabra*, *L. palustris*, *L. peregra ovata* e *L. truncatula*) e verificaram que apenas espécimes jovens das três primeiras espécies citadas se infectaram com *F. hepatica*. Portanto, a influência do tamanho da concha pode ser interpretada como uma consequência da variação da idade *L. columella*. Alguns autores têm estudado como os sistemas de defesa de moluscos limneídeos reagem a

infecções por trematódeos (Sminia & van der Knaap, 1981; Riley & Chappell, 1992), mas pouco se sabe sobre a influência da idade na eficácia dos mesmos.

### 7.5- Efeito do número de miracídios

Apesar das diferenças observadas entre os grupos infectados utilizando-se de 1 a 4 miracídios, não foi possível estabelecer uma relação precisa entre a variação do número de miracídios e o sucesso das infecções. O grupo infectado com um miracídio apresentou a maior média de rédias e cercárias por caramujo positivo, mas o grupo infectado com quatro miracídios apresentou a maior proporção de indivíduos positivos. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Dreyfuss *et al.* (1999), que compararam o efeito do número de miracídios em infecções de *L. truncatula*, observando que a maior taxa de sobrevivência e o maior número de cercarias foi obtido com um miracídio. Resultados semelhantes foram observados por Lee & Lee (1995) com *Lymnaea viridis* e Dacal (1988) com *L. columella*, mas os autores não discutem as razões pelas quais o aumento do número de miracídios não torna as infecções mais eficientes. Uma provável explicação para este fato seria um aumento da competição entre as formas larvárias da *F. hepatica* no interior do caramujo infectado por mais de um miracídio.

### 7.6- Comparação da suscetibilidade de *L. columella* proveniente de diferentes locais

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Foi constatada a existência de diferenças entre a suscetibilidade de espécimes *L. columella* provenientes de diferentes regiões à infecção por *F. hepatica*. Moluscos provenientes de Jaboticatubas, MG, e do Parque Estadual do Rio Doce foram mais suscetíveis, enquanto os de Pelotas, RS, apresentaram uma suscetibilidade inferior aos de outras localidades. Variações na suscetibilidade de populações de moluscos limneídeos têm sido observadas entre diversas localidades (Gasnier *et al.* 2000; Goumghar *et al.* 2001; Gutierrez *et al.*, 2002), mas poucos trabalhos têm comparado a suscetibilidade de *L. columella* proveniente de diferentes regiões do Brasil. Dacal (1988) demonstrou que espécimes provenientes dos municípios de Sete Lagoas, Santa Rita do Sapucaí, Viçosa e Belo Horizonte eram suscetíveis à infecção por *F. hepatica*. Cardoso *et al.* (2006), estudaram a variabilidade genética de espécimes de *L. columella* provenientes de nove localidades diferentes e encontraram uma pequena variação. Estes resultados demonstram que há o risco da fasciolose se espalhar pelo estado, uma vez que espécimes de diversas localidades que não são consideradas áreas endêmicas para esta parasitose se mostraram suscetíveis à infecção por *F. hepatica*.

### **7.7- Eficiência de associações simpátricas/alopátricas**

As associações alopátricas de *L. columella* com *F. hepatica* foram mais eficientes que as simpátricas nos moluscos de Pelotas, e menos eficientes nos moluscos de Itajubá. Estes resultados estão parcialmente de acordo com os de Gasnier *et al.* (2000) e Goumghar *et al.* (2001), que observaram associações

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

alopátricas mais eficientes em *L. truncatula*. Portanto, influência da simpatria na eficiência das infecções deve ser analisada com precaução, uma vez que pode gerar resultados diferentes em associações entre parasitas e hospedeiros provenientes de diferentes localidades. De acordo com Gasnier *et al.* (2000), parasitos são capazes de mudanças evolutivas em relação aos seus hospedeiros, devido ao seu curto período de vida, curto tempo de geração e alta fecundidade. Os autores discutem que a migração de rebanhos infectados com *F. hepatica* para outros locais deveria ser cuidadosamente monitorada, uma vez que pode resultar na introdução de parasitas mais eficientes.

#### **7.8- Comparação entre o sucesso da infecção de *L. columella* utilizando-se ovos de *F. hepatica* provenientes de hospedeiros bovinos e coelhos**

Apesar das diferenças nos números de rédias e cercárias obtidas de *L. columella* infectada com miracídios de ovos provenientes de hospedeiros bovinos e coelhos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de moluscos. Vignoles *et al.* (2001) compararam a infectividade de miracídios provenientes de ovos obtidos de diferentes hospedeiros e verificaram que a infectividade de miracídios provenientes de bovinos, ovinos não apresentaram diferenças significativas, mas infecções com miracídios de ovos provenientes de ratões-do-banhado renderam um maior número de cercárias. Os moluscos infectados com miracídios obtidos de ovos provenientes de coelhos

exibiram maior mortalidade, menor taxa de infecção e menor número de cercarias, quando comparados com os demais grupos.

### **7.9- Infecção de *Physa marmorata***

Alguns autores discutem a possibilidade de outras espécies de gastrópodes atuarem como hospedeiros intermediários de *F. hepatica* (Buseti *et al.*, 1985). Neste trabalho, nenhum exemplar de *P. marmorata* foi encontrado infectado com o helminto, e nenhum espécime infectado experimentalmente apresentou formas larvárias do helminto 31 dias após a infecção. Portanto, não foi encontrado nenhum indício de que esta espécie atue no ciclo da fasciolose em Itajubá.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

## 8- CONCLUSÕES

- Há um padrão na variação das populações de *Lymnaea columella* ao longo do ano em Itajubá, MG. Ocorre um aumento do número de moluscos em setembro, redução em dezembro e nos meses em que ocorre a limpeza das valas. A proporção de moluscos jovens aumenta durante o verão.
- A inundação da área e a limpeza dos canais são os fatores que causam o maior impacto negativo nas populações de *L. columella*
- *L. columella* é o hospedeiro intermediário de *F. hepatica* em Itajubá, com uma taxa de infecção natural média de 1,7%
- Os moluscos mais jovens são mais suscetíveis à infecção por *F. hepatica*.
- Não há relação entre o número de miracídios utilizado e o sucesso da infecção, usando-se de 1 a 4 miracídios.
- Há diferenças na suscetibilidade de *L. columella* provenientes de diferentes localidades.

- A eficiência de associações simpátricas e alopátricas de *F. hepatica* com *L. columella* pode variar de acordo com a procedência do parasito e do hospedeiro intermediário.
- Não há diferenças entre o sucesso da infecção de *L. columella* com *F. hepatica* utilizando-se miracídios provenientes de ovos do helminto obtidos de hospedeiros bovinos e coelhos
- *P. marmorata* não atua como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* em Itajubá, MG, e não apresenta sinais de infecção aos 31 dias após exposição a quatro miracídios do helminto.
- Existe o risco de a fasciolose se espalhar por outras regiões de Minas Gerais, uma vez que moluscos de outras localidades do estado apresentaram suscetibilidade à infecção por *F. hepatica* superior aos moluscos de Itajubá, MG.

## 9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, F. J. P., WATANABE, T.W. Ocorrência de *L. columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da *F. hepatica*, para o estado da Paraíba, Brasil. *Revista de Saúde Pública* v. 32, n. 2, 1998.

ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., MAGE, C., ROUMIEUX, L. Proposition of a simple method for the production of *F. hepatica* metacercariae from the snail *Lymnaea truncatula*. *Revue de Medecine Veterinaire*, v.149, n. 10, p. 943-948, 1998.

ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., CABARET, J. Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *F. hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Veterinary Research* v.1, n.30, p.113-118, 1999.

ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G. Cercarial productivity of redial generations in single-miracidium infections of *Lymnaea truncatula* with *Paramphistomum daubneyi* or *F. hepatica*. *Journal of Helminthology*, v.74, n.1, p.1-5, 2000.

ABROUS, M., RONDELAUD, D., DREYFUSS, G. The Stress of *Lymnaea truncatula* Just before Miracidial Exposure with *Fasciola hepatica* Increased the Prevalence of Infection. *Experimental Parasitology* v. 99, n.1, p.49-51, 2001.

ACHA, P. N., SZYFRES, B. *Zoonoses y Enfermedades Transmisibles comunes al Hombre y los Animales*. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Publicación Científica N. 354, 1977.

ALCAINO, H. A., GORMAN, T. R., PHILLIPS, J. Distomatosis en equinos fino sangue de carrera en haras e hipodromos de las Regiones V y Metropolitana de Chile. *Parasitologia al Dia*, v. 2, p. 37-40, 1983.

AMATO, S. B., De REZENDE, H. E. B., GOMES, D. R.; e FREIRE, N. M. S. Epidemiology of *F. hepatica* infection in the Paraíba Valley, São Paulo, *Brazilian Veterinary Parasitology* , v.22, n.3-4, p.275-284, 1986.

ANDREWS, S. J. The Life Cycle of *Fasciola hepatica* In: Dalton, J. P. *Fasciolosis*. Dublin: CABI Publishing, 1999. p. 1-29.

BACIGUALUPO, J. 1932. *apud* NUERNBERG, S., REZENDE, H. E. B., SERRA-FREIRE, N. M., GOMES, P. A. C., ARAÚJO, J. L. B. Biologia e suscetibilidade de

*Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) a infecções por *F. hepatica* em condições experimentais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 3, n.1, p.1-10, 1983.

BARANSKI, M. C., SILVA, R. F., CARNEIRO, F. M., AMARAL, D. F., SILVEIRA, H. B. MAGNI, M. R. 1978. *apud* NUERNBERG, S., REZENDE, H. E. B., SERRA-FREIRE, N. M., GOMES, P. A. C., ARAÚJO, J. L. B. Biologia e suscetibilidade de *Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) a infecções por *F. hepatica* em condições experimentais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 3, n.1, p.1-10, 1983.

BERGHEN, P. Some Lymnaeidae as intermediate host of *F. hepatica* in Belgium. *Experimental Parasitology*, v.2, n.15, p. 118-124, 1964.

BORAY, J. C. Studies on the ecology of *Lymnaea tomentosa*, the intermediate host of *F. hepatica*. I. History, geographical distribution, and environment. *Australian Journal of Zoology*. v.12, n.2, p. 217-230, 1964.

BORAY, J. C., FRASER, G. C., WILLIAMS, J. D., WILSON, J. M. The occurrence of the snail *L. columella* on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *F. hepatica*. *Australian Veterinary Journal* v. 62, n. 1, p. 4-6, 1985.

BRICENO-ROSSI, A. L. Trabajo experimental sobre *F. hepatica*. Primeira comprobación del verdadero huésped intermediario de este parasito en Venezuela. *Revista Venezolana de Sanidad Y Asistencia Social*, v. 15, n. 6, p. 381-385, 1950.

BUSETTI, E. T., SOCCOL, T. V., RUIS, M. C. E., CASTRO, E. A. *Physa cubensis*-Hospedeiro intermediário da *F. hepatica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 12, 1985, Campinas, SP, *Anais...Campinas*. Editora UNICAMP, 1985. p. 337.

CALDAS, W. S., LIMA, W. S., CURY, M. C., MALACCO, M. A. F., SILVA, R. S. Prevalência de *F. hepatica* em bovinos de algumas mesorregiões do Estado de Minas Gerais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1995, Campo Grande-MS, 1995. p. 140.

CARDOSO, P. C., CALDEIRA, R.L., LOBATO, M .B., COELHO, P.M., BERNE, M.E., MÜLLER, G., CARVALHO, O. S. Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Acta Tropica* v. 97, n. 3, p. 339-45. 2006.

CARVALHO, J.C.M. 1940. *apud* FARIA, R. *Prevalência e dinâmica de infecção por F. hepatica (Linnaeus, 1758) em bovinos no município de Itajubá, Minas Gerais*. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000. 73p. (Dissertação, mestrado em parasitologia).

CLAXTON, J. R., ZAMBRANO, H., ORTIZ, P., AMOROS, C., DELGADO, E., ESCURRA, E., CLARKSON, M. J. The epidemiology of fascioliasis in the the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Parasitology International*, v. 46, n. 4, p. 281-288, 1997

CLAXTON, J. R., SUTHERST, J., ORTIZ, P., CLARKSON, M.J. The effect of cyclic temperatures on the growth of *F. hepatica* and *Lymnaea viatrix*. *Veterinary Journal* v. 157, n.2, p.166-71, 1999.

COELHO, L. H. L. *Variação Populacional e Dinâmica de Infecção de Lymnaea sp. por F. hepatica no município de Itajubá, MG*. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000. 66p. (Dissertação, mestrado em parasitologia).

COELHO, L. H. L. , LIMA, W. S. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of helminthology*, V. 77, n.1, p.7-10, 2003.

CORRÊA, O. Incidência da hidatidose, fasciolose, estefanurose e cisticercose nos rebanhos riograndese. *Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária*. Porto Alegre, v.7, n.2, p. 137-146, 1965.

COSTA, H. M. A., FREITAS, M. G. 1959. *apud* FARIA, R. *Prevalência e dinâmica de infecção por F. hepatica (Linnaeus, 1758) em bovinos no município de Itajubá, Minas Gerais*. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000. 73p. (Dissertação, mestrado em parasitologia).

DACAL, A. R. C., COSTA, H. M. A. Suscetibilidade de amostras de *Lymnaea* à infecção por miracídios de *F. hepatica*. Belo Horizonte: UFMG, 1979. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1979.

DACAL, A. R. COSTA, H. M., LEITE, A. C. Susceptibility of *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* (Say, 1817) exposed to infection by miracidia of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* v. 30, n. 5, p.361-369, 1988.

DITTMAR, K., TEEGEN, W. R. The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4,500 year old archaeological site in the Saale-Unstrut valley, Germany. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* V. 98, N.1, p.141-143, 2003

DAEMON, E., SERRA-FREIRE, N. M. Estudos da relação custo-benefício em parasitologia: uma proposta de análise. *Parasitologia al Dia*, v.16, n. 1-2, p.59-62, 1992.

DREYFUSS G., MOUKRIM, A., RONDELAUD, D., VAREILLE-MOREL, C. Field observations concerning infection of *Lymnaea palustris* by *F. hepatica*. *Journal of Helminthology* v. 68, n. 2, p. 115-18, 1994.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

DREYFUSS, G., RONDELAUD, D. *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica*: a comparative study of some characteristics of *Fasciola* infection in *Lymnaea truncatula* infected by either of the two trematodes. *Veterinary Research* v. 28, n. 2, p.123-30, 1997.

DREYFUSS, G., ABROUS, M.; RONDELAUD, D. *F. hepatica* L.: the redial burden and cercarial shedding in the juveniles of *Lymnaea peregra peregra* Müller. *Revue de Medecine Veterinaire* . v. 148 n.7, p. 609-612, 1997.

DREYFUSS, G., RONDELAUD, D., VAREILLE\_MOREL, C. Oviposition of *Lymnaea truncatula* infected by *F. hepatica* under experimental conditions. *Parasitology Research* v. 85, n.7, p. 589-93,1999.

DREYFUSS, G., VIGNOLES, P., RONDELAUD, D., VAREILLE MOREL, C. *F. hepatica*: characteristics of infection in *Lymnaea truncatula* in relation to the number of miracidia at exposure. *Experimental Parasitology* v. 92 n. 1, p. 19-23, 1999.

DREYFUSS, G., ABROUS, M., RONDELAUD, D. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *F. hepatica*. *Journal of Parasitology* v. 86, n.1, p. 158-60, 2000.

DREYFUSS, G., VIGNOLES, P., ABROUS, M., RONDELAUD, D. Unusual snail species involved in the transmission of *F. hepatica* in watercress beds in central France. *Parasite* v. 9, n.2, p. 113-20,2002.

FARIA, R. N. *Prevalência e dinâmica de infecção por F. hepatica (Linnaeus, 1758) em bovinos no município de Itajubá, Minas Gerais*. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000. 73p. (Dissertação, mestrado em parasitologia).

FARIA, R. N., CURY, M. C., LIMA, W. S. Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in brazilian cattles. *Revue de Medecine Veterinaire* v. 156, n. 2, p. 85-86. 2005.

FRANÇA, I. *F. hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba. Boletim do Campo, Rio de Janeiro, n. 230, p. 21-22, 1969.

FREITAS, M. G. 1957. *apud* FARIA, R. *Prevalência e dinâmica de infecção por F. hepatica (Linnaeus, 1758) em bovinos no município de Itajubá, Minas Gerais*. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000. 73p. (Dissertação, mestrado em parasitologia).

GAASENBÉCK, C. P. H., OVER, H. J., NOORMAN, N. E., DeLÉUW, W. A. An epidemiological study of *F. hepatica* in Netherlands. *Veterinary Quarterly*, n. 14, p.140-4, 1992.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

GASNIER, N., RONDELAUD, D., ABROUS, M., CARRERAS, F., BOULARD, C., DIEZ-BAÑOZ, P., CABARET, J. Allopatric combination of *F. hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *International Journal for Parasitology* v. 30 n. 5, p. 573-8, 2000.

GOMES, P. A. C., NURENBERG, S., PIMENTEL NETO, M., OLIVEIRA, G.P., REZENDE, H.E.B., ARAUJO, J.L.B., MELLO, R.P. Infecção experimental de *L. columella* Say, 1817, com *F. hepatica* L, 1758, de ocorrência no estado do Rio de Janeiro. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 4, n. 1, p.35-38, 1974.

GOMES, D. C. *Interrelação entre F. hepatica L., 1758 e L. columella Say, 1817: susceptibilidade e patogenia*. Rio de Janeiro: Instituto de Biologia da UFRRJ, 1985. 73p. (Tese, Doutorado em Parasitologia Veterinária).

GONZALES, J. C., SANCHES, V. M., THOMÉ, J. W., GONÇALVES, P. C., OLIVEIRA, C. M. B. *L. columella*, hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, (Lin. 1758) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande de Sul*, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1974.

GORDON, H. M. Some aspects of fascioliasis. *Australian Veterinary Journal*, n.31, p.182-188, 1955.

GOUMGHAR, M. D., RONDELAUD, D., BENLEMLIH, M. The habitats of *Lymnaea truncatula* Müller in Morocco. First observations in two valleys located at high altitude in the province of Ifrane (Middle-Atlas). *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, n. 3, p.33-40, 1997.

GOUMGHAR, M.D., DREYFUSS, G., RONDELAUD, D., BENLEMLIH, M., CABARET, J. More efficient allopatric combinations of *F. hepatica* and *Lymnaea truncatula* due to modification of redial development? *Parasitology Research* v. 87, n.12, p. 1016-9, 2001.

GROVE, D. I. *A history of human helminthology*. Wallingford, Oxon, UK : C.A.B. International, 1990.

GUTIERREZ, A., PERERA, G., YONG, M., SÀNCHEZ, J., WONG, L. Life-history Traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under experimental exposure to *F. hepatica* (Trematoda: Digenea). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* v.95, n.5, p.747-752, 2000.

GUTIERREZ, A., YONG, M., WONG, L., SANCHEZ, J. The combined effect of isolation and *F. hepatica* infection on the life history traits of *Fossaria cubensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* v. 78, n.2, p. 66-71, 2001.

GUTIERREZ, A., YONG, M., PERERA, G., SANCHEZ, J., THERON, A. *F. hepatica* (Trematoda: Digenea): its effect on the life history traits of

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

*Pseudosuccinea columella* (Gasteropoda: Lymnaeidae), an uncommon interaction. *Parasitology Research* v. 88, n. 6, p. 535-9, 2002.

HAMMAMI, H., AYADI, A. Ecology of *Lymnaea truncatula* Müller, intermediate host of *F. hepatica* Linne in the microclimate of Tozeur (southeast of Tunisia) *Bulletin de le Société Pathologie Exotique* v. 92, n. 5, p. 302-304, 1999.

HAMMAMI, H., AYADI, A. Natural infestation of *Lymnaea truncatula* Müller by *F. hepatica* in the Tozeur oasis in southwest Tunisia. *Medecine Tropicale* , v. 60, n.2, p. 159-62, 2000.

HODASI, J.K.M. The output of cercariae of *F. hepatica* on *Lymnaea truncatula* . *Parasitology*, n. 64, v.2, p. 53-60, 1972.

HONER, M. R. Aspectos da epidemiologia da fasciolose in: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITOSSES DE BOVINOS, 1, 1979, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: EMBRAPA/CNPGC, 1979. 386p.

ISLAM, M. N., PORT, G. R., McLACHLAN, A. J. The Biology of *Lymnaea peregra* (Muller) (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora) with special reference to the effects of herbicides on its reproduction. *Online Journal of Biological Sciences* v.1, n. 6, p. 532-540, 2001.

LEE, C.G., CHO, S.H., LEE, C.Y. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* v. 58 n. 4 p. 313-318. 1995.

LEUCKART, R. 1882. *apud* TAYLOR, E. L. La fascioliasis y el distoma hepatico. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, n. 64, p. 1-234, 1965.

LUTZ, A. 1921. *apud* NUERNBERG, S., REZENDE, H. E. B., SERRA-FREIRE, N. M., GOMES, P. A. C., ARAÚJO, J. L. B. Biologia e suscetibilidade de *Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) a infecções por *F. hepatica* em condições experimentais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 3, n.1, p.1-10, 1983.

MAGALHÃES, K. G., PASSOS, L.K.J., CARVALHO, O.S. Detection of *Lymnaea columella* Infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n.4, p. 421-424. 2004.

MANGA-GONZALEZ, Y., GONZALEZ-LANZA, C., OTERO-MERINO, C. B. Natural infection of *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *F. hepatica* in the Porma Basin, León, NW Spain. *Journal of Helminthology* , v. 65 n.1, p. 15-27, 1991.

MAS-COMA, S., BARGUES, M.D., VALERO, M.A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* V. 35 n. 11, p.1255-1278, 2005.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

MATTOS, M. J. T., UENO, H., GONÇALVES, P. C., ALMEIDA, J. E. M. Seasonal occurrence and bioecology of *L. columella* Say, 1817 (Mollusca, Lymnaeidae) in its natural habitat in Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.19 n.6, p. 248-252, 1997.

MENDONÇA, M. M., BARATA, M. C. S. Alguns dados epidemiológicos relativos à fasciolose em S. Miguel (Açores). *Revista do Instituto de Investigação Científica tropical*, Lisboa, v. 16, n. 1, p. 31-40, 1989.

MENDONÇA, M., BARATA, M. C. S., ROMBERT, C., MARTINS, M. F. As primeiras serologias positivas da fasciolose humana em S. Miguel (Açores). *Revista do Instituto de Investigação Científica tropical*, Lisboa, v. 21, n. 1, p. 161-164. 1996.

MORALES, G., PINO, L. A. Infection of *Lymnaea cubensis* by *F. hepatica* in a high altitude region in Venezuela. *Annual Parasitology Human Compendium*, v. 58, n.1, p. 27-30, 1983.

MÜLLER, G., LARA, S.I.M., SILVEIRA Jr., P., ANTUNES, P.L. Acompanhamento laboratorial do ciclo biológico de *Lymnaea viatrix*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.4, n. 3, p. 172-176, 1998.

NUERNBERG, S., REZENDE, H. E. B., SERRA-FREIRE, N. M., GOMES, P. A. C., ARAÚJO, J. L. B. Biologia e suscetibilidade de *Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) a infecções por *F. hepatica* em condições experimentais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 3, n.1, p.1-10, 1983.

OAKLEY, G. A. , OWEN, B., KNAPP, N. H. Production effects of subclinical liver flukes infection in growing dairu heifers. *Veterinary Record*, n. 104, p. 503-507, 1979.

OLIVEIRA, A. 1932. *apud* FARIA, R. N. *Prevalência e dinâmica de infecção por F. hepatica (Linnaeus, 1758) em bovinos no município de Itajubá, Minas Gerais*. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000. 73p. (Dissertação, mestrado em parasitologia).

OLIVEIRA, S.M., FUJII, T.U., SPÓSITO FILHA, E., MARTINS, A.M. Ocorrência de *Lymnaea columella* SAY, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758) no vale do ribeira, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v.69, n.1, p.29-37, 2002.

PREVERAUD-SINDOU, M., DREYFUSS, G., RONDELAUD, D. Comparison of the migrations of *F. hepatica* sporocysts in *Lymnaea truncatula* and other related snail families. *Parasitological Research*, v. 80, n.4, p. 342-345, 1994.

RAI, R. B., SENAI, S., AHLAWAT, S. P. S., KUMAR, B. V. Studies on the control of fascioliasis in Andaman and Nicobar islands. *Indian Veterinary Journal*, v. 73, n. 8, p.822-825, 1996.

RAMIRES-VILLAMEDIANA, J. J. R; VERGANI, F. Contribuicion al estudio del ciclo evolutivo de la *Fasciola hepatica* en Venezuela. *Revista Gran Colombiana de Zootecnia, Higiene y Medicina Veterinaria*, v. 3, n.10, p. 817-838. 1949.

RESENDE, H.E.B., ARAÚJO J.L.B., GOMES P.A.C., NURENBERG, S., PIMENTEL NETO, M., OLIVEIRA, G. P., MELLO, R.P. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros de *F. hepatica* L. no estado do Rio de Janeiro. (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae) *Arquivos da Universidade Federal Rural*. Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p.21-23, 1973.

REY, L. 1958. *apud* NUERNBERG, S., REZENDE, H. E. B., SERRA-FREIRE, N. M., GOMES, P. A. C., ARAÚJO, J. L. B. Biologia e suscetibilidade de *Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) a infecções por *F. hepatica* em condições experimentais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 3, n.1, p.1-10, 1983.

RILEY, E.M., CHAPPELL, L.H. Effect of infection with *Diplostomum spathaceum* on the internal defense system of *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Invertebrate Pathology* v. 59, p.190-196. 1992.

RONDELAUD, D. Demographic development of *Lymnaea* (Galba) *truncatula* Müller in Haute-Vienne, France. About observations on 4 years (1973-1976). *Annual Parasitology Human Compendium*, v. 52, n. 5, p.511-520, 1977.

RONDELAUD, D., BARTHE, D. Arguments and proposals for a new developmental interpretation of *F. hepatica* L. in *Lymnaea* (Galba) *truncatula* Müller (author's transl). *Annual Parasitology Human Compendium*,. v. 53, n.2, p. 201-213, 1978.

RONDELAUD, D., DREYFUSS, G., BOUTEILLE, B., DARDÉ, M. L. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observations over a 28-year period in central France. *Parasitology research*, v. 86, p. 753-757, 2000.

RONDELAUD, D., VIGNOLES, P., DREYFUSS, G. The presence of predators modifies the larval development of *F. hepatica* in surviving *Lymnaea truncatula*. *Journal of Helminthology* v. 76, n. 2, p. 175-8, 2002.

SANTOS, L., VIEIRA, T. F. 1967. *apud* NUERNBERG, S., REZENDE, H. E. B., SERRA-FREIRE, N. M., GOMES, P. A. C., ARAÚJO, J. L. B. Biologia e suscetibilidade de *Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) a infecções por *F. hepatica* em condições experimentais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 3, n.1, p.1-10, 1983.

**pdfMachine** - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

SALEM, A. I., OSMAN, M. M., EL-DALY, S., FARAHAT, A. Studies on *Lymnaea* snails and their trematode parasites in Abis II village, Alexandria. *Journal of the Egypt Society of Parasitology*, v. 23, n. 2, p. 477-83, 1993.

SERRA-FREIRE, N. M., BORDIN, E. L., LESSA, C.S. S., SCHERER, P. O., FARIAS, M. T., MALACCO, M. A., CORRÊA, T. C., TSCHUMI, J. A. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. *A Hora Veterinária*, Edição Extra, n.1, p.19-21, 1995.

SILVA, R. E., LIMA, W. S., CALDAS, W. S., CURY, M. C., MALACCO, A. F. Primeiro encontro de *L. columella* (Say, 1817) naturalmente infectada por estádios intermediários de *F. hepatica* (Lynnaeus, 1758) na cidade de Itajubá, MG. *Revista de Patologia Tropical*, Supl., v. 23, n. 2, 1994.

SINDOU, P., CABARET, J., RONDELAUD, D., Survival of snails and characteristic lesions of *F. hepatica* infection in four European species of *Lymnaea*. *Veterinary Parasitology* v. 40, n. 1, p.47-58, 1991.

SMINIA, T., VAN DER KNAPP, W. The internal defence system of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental and Comparative Immunology* v.5, p. 87-97. 1981.

SMITH, G. The relationship between the density of *Fasciola hepatica* miracidia and the net rate of miracidial infections in *Lymnaea truncatula*. *Parasitology* v. 95, n.2, p.159-63, 1987.

SOUZA, C. R., LIMA, L. C. *Moluscos de interesse parasitológico do Brasil*. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz , 1997. 79p.

TAGLE, I. Obsevaciones sobre la evolución de la *F. hepatica* (L. 1758). Comprobación del huésped intermediario en Chile. *Revista Villena de História Natural* v. 46/47, p. 232-241, 1943.

TAYLOR, E. L. La fascioliasis y el distoma hepatico. *FAO Estudios agropecuarios* n.64, p. 1-250, 1965

THOMAS, A. P. 1882. *apud* TAYLOR, E. L. La fascioliasis y el distoma hepatico. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, n. 64, p. 1-234, 1965.

UENO, H., ARANDIA, R., MORALES, G., MEDINA, G. Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the altiplano region of Bolivia. *Natural Institute of Animal Health Quarterly*, v.15, p.61-67, 1975.

UENO, H., WATANABE, S. Ecological studies on the common liver fluke in Japan. I. Comparison of intermediate hosts betwén the japanese native liver fluke and *F.*

*hepatica* from England. Bulletin of the *National Institute of Animal Health* n.38, p.167-168, 1980.

UENO, H., GUTIERRES, V.C., de MATTOS, M. J, MÜLLER, G. Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.11, n.2-3, p.185-191, 1982.

VALERO, M. A., SANTIAGO, M. Comparative Infectivity of *F. hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitologica* v. 47, p. 17-22, 2000.

VIGNOLES, P., MENARD, A., RONDELAUD, D., CHAUVIN, A., DREYFUSS, G. *F. hepatica*: the characteristics of experimental infections in *Lymnaea truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *Parasitology Research* v. 87, n. 11, p. 945-9, 2001.

**pdfMachine** - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

**Get yours now!**

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA