

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Ehrlichiose Monocítica Equina: Características biológicas de
gastrópodes e trematódeos envolvidos na transmissão de
*Neorickettsia risticii***

Juliana Garcia da Silva

Pelotas, 2012

JULIANA GARCIA DA SILVA

Ehrlichiose Monocítica Equina: Características biológicas de gastrópodes e trematódeos envolvidos na transmissão de *Neorickettsia risticii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Sanidade animal).

Orientador: Dr. Luiz Filipe Damé Schuch

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586e

Silva, Juliana Garcia da

Ehrlichiose monocítica equina : características biológicas de gastrópodes e trematódeos envolvidos na transmissão de *Neorickettsia risticii* / Juliana Garcia da Silva. – 80f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Sanidade animal. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2012. – Orientador Luiz Filipe Damé Schuch.

1.Veterinária. 2.*Heleobia piscium*. 3.Salinidade. 4.Membrana corioalantóide. 5.Ciclo biológico. 6.Ehrlichiose monocítica equina. 7.Gastrópodes. 8.Trematódeos. 9.*Neorickettsia risticii* I.Schuch, Luiz Filipe Damé. II.Título.

CDD: 594.3

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas

Prof. Dr. João Luiz Zani

Prof. Dr. Tânia Regina Bettin dos Santos

Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch

Orientador

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força e coragem.

Meu Orientador Schuch... por tudo: pela mão estendida e confiança no meu potencial.

Meus pais e dinda pelas orações, compreensão e apoio incondicional... mãe, obrigada pelo companheirismo e dedicação ao me ajudar.

Pati, a irmã que escolhi pra mim, obrigada pela lealdade... sem ti tudo seria bem mais difícil! Agradeço as broncas e empurrões, acredite, essenciais para que eu chegasse até aqui!

Meu afilhado Pedro Henrique, mesmo tão pequeno, se mostra um gigante ao perdoar, com um simples sorriso a ausência da sua “dimba”.

Ao ICBIO (FURG), deixo meu sincero muito obrigada pela acolhida e parceria estabelecida, assim como o reconhecimento da coragem dos meninos ao enfrentar o GPS para acompanharem as coletas em Arroio Grande, e Léo, valeu pela incansável ajuda, e também por repetir sempre o mantra “calma, no final tudo vai dar certo...”

Um agradecimento que nunca será suficiente aos Profs. Drs. e amigos Kika e Cleber, que abriram as portas de seu laboratório e de sua casa, sempre confiantes na minha capacidade, até mesmo quando nem eu acreditava mais em mim...

Professora Tânia, obrigada pela “lupa amiga”, prof. Gilberto, santa paciência e confiança durante a incubação dos ovos... e as meninas do laboratório, em especial Marta Oyarzabal, valeu pelo incentivo e “moradia” emprestada em Pelotas, e Carol, obrigada pela dedicação!

Imensa gratidão aos Drs. Luis Simone (MZUSP) e Suzana Amato (UFRGS) que, mesmo à distância ajudaram muito na reta final, na identificação dos moluscos e na condução dos experimentos com trematódeos, respectivamente.

Ao CAVG (Pelotas) o agradecimento pela doação dos ovos embrionados para o estudo, e ao CAPES, agradeço pelo apoio financeiro.

E com todo meu amor e amizade, te agradeço Murilo, meu marido e melhor amigo por todo o apoio de sempre...

Resumo

SILVA, Juliana Garcia. **Ehrlichiose Monocítica Equina: características biológicas de gastrópodes e trematódeos envolvidos na transmissão de *Neorickettsia risticii***. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A *Neorickettsia risticii* é um parasito intracelular obrigatório de leucócitos e agente etiológico da Ehrlichiose Monocítica Equina (EME), conhecida como a “Febre do Cavalo de Potomac” (“*Potomac Horse Fever*”). Foi descrita pela primeira vez em 1979 no Estado de Maryland, nos arredores do rio Potomac (EUA). É uma enfermidade de grande importância na criação de cavalos no sul do Brasil, especialmente da raça crioula, apresentando a diarreia como principal sintoma, podendo agravar-se, ocasionando a morte. A contaminação dos animais ocorre possivelmente por via oral, havendo relação com trematódeos digenéticos de ambientes aquáticos que, por sua vez, necessitam de mais de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida. Os cavalos presentes em regiões alagadiças podem ingerir vetores aquáticos, o que aumenta as chances de infecção, principalmente nos meses de temperaturas mais elevadas, quando a EME apresenta seus característicos picos sazonais de ocorrência. Os objetivos deste estudo foram investigar as espécies de gastrópodes do gênero *Heleobia*, primeiro hospedeiro intermediário da *N. risticii*, em área endêmica à EME (Propriedade Rural em Arroio Grande), estimar a taxa de contaminação parasitária e o efeito da salinidade na sobrevivência dos moluscos da espécie *Heleobia piscium*, bem como, sua reprodução e frequência de emissão de cercárias. Através do cultivo de trematódeos em membrana corioalantóide de ovos de galinha, buscou-se a forma adulta do parasita albergado nos gastrópodes. Os moluscos encontrados durante as coletas foram classificados como *Heleobia piscium*, constatando-se que 6,24%, dentre os 962 gastrópodes dissecados apresentaram-se parasitados. Ocorreu emissão de cercárias em local com salinidade variável até 12‰, o que indica parcialmente a adaptabilidade da espécie a ambientes estuarinos. Não houve resultados satisfatórios quanto ao cultivo de trematódeos em Membrana corioalantóide, possivelmente devido à alta especificidade da técnica requerida. O conhecimento resultante representa um ponto de partida para o estabelecimento de uma metodologia específica quanto à obtenção do trematódeo adulto. Os resultados apresentados são importantes para a elucidação do ciclo biológico do parasita em estudo, contribuindo com maiores esclarecimentos sobre a epidemiologia da EME, servindo como base para futuras pesquisas que visem minimizar seu impacto na criação de cavalos no Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: *Heleobia piscium*. Salinidade. Membrana corioalantóide. Ciclo biológico.

Abstract

SILVA, Juliana Garcia. **Ehrlichiose Monocítica Equina: características biológicas de gastrópodes e trematódeos envolvidos na transmissão de *Neorickettsia risticii***. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Neorickettsia risticii is an obligatory leukocytes' intracellular parasite, the etiologic agent of Equine Monocytic Ehrlichiosis (EME), known as "Potomac Horse Fever". It was first described in 1979 in the State of Maryland, in the vicinity of the Potomac River, United States. It is a disease of great importance in the creation of horses in the southern Brazil, especially the creole's breed, presenting the diarrhea as the main symptom, which can deteriorate and lead to death or complications such as laminitis. Contamination of animals possibly occurs by the oral route, being related to digenetic trematodes of aquatic environments, which in turn require more than one host to complete its life cycle. The location of the horses in overflowed regions provides an increase in the ingestion of aquatic vectors, making higher the chances of contracting the infection, especially in the months of higher temperatures, when the EME presents its characteristic seasonal peaks of occurrence. The objectives of this study were to investigate the species of *Heleobia*, the first intermediate host of *N. risticii* in an endemic area for EME (rural property in Arroio Grande), in order to estimate its rate of parasite contamination. We evaluated the effect of salinity on the survival of mollusk of *Heleobia piscium* specie, as well as its reproduction and emission frequency of cercariae. Through the cultivation of trematodes in membrane chorioallantoic of chicken eggs, we sought the adult form of the parasite housed in gastropods. The snails found during the collections were classified as *Heleobia piscium*, noting that 6,24%, among 962 dissected gastropods presented themselves parasitized. Cercarial output occurred in an environment with variable salinity to 12‰, which indicates partially the adaptability of the species in estuarine regions. There was no satisfactory results regarding the cultivation of trematodes in chorioallantoic membrane, possibly due to the high specificity of the technique required. Several parameters have been analyzed and the outcomes represent a starting point for the establishment of a specific methodology for obtaining the adult trematode. The results presented are important for the elucidation of the biological cycle of the parasite analysed in this study, contributing to highlight the epidemiology of EME, serving as the basis for future researches that aim to minimize its impact on the creation of horses in Rio Grande do Sul.

Keywords: *Heleobia piscium*. Salinity. Membrane Chorioallantoic. Biological Cycle.

Lista de Figuras

Figura 1	Vista aérea do Estado do Rio Grande do Sul, destacando a localização da Lagoa Mirim e Lagoa dos Patos.....	17
Figura 2	Imagem aérea da Barragem com eclusa no Canal São Gonçalo...	18
Figura 3	Propriedade Rural em Arroio Grande.....	38
Figura 4	Equinos pastando em áreas alagadiças.....	39
Figura 5	Água sendo peneirada (a) e gastrópodes capturados retidos na peneira (b).....	40
Figura 6	Gastrópodes acondicionados em frascos.....	40
Figura 7	Diferenças nos tamanhos dos moluscos capturados (a) e tamanho proporcional de um gastrópode coletado (b).....	41
Figura 8	Manutenção dos moluscos nos aquários com aeração e alimentação.....	42
Figura 9	Diluição da água do mar com a água do local da coleta.....	42
Figura 10	Medições de salinidade através do refratômetro.....	43
Figura 11	Moluscos divididos em duplicata nos diferentes níveis de salinidade.....	43
Figura 12	Transferência das metacercárias para placas contendo solução salina tamponada.....	45
Figura 13	Abertura de orifício em câmara de fluxo laminar.....	46
Figura 14	Abertura dos ovos em fluxo laminar.....	47
Figura 15	Inspeção da membrana corioalantóide a olho nu.....	47
Figura 16	Inspeção da membrana corioalantóide com auxílio de lupa.....	47
Figura 17	Esmagamento dos moluscos entre lâminas de vidro.....	49
Figura 18	Dissecação dos moluscos.....	49
Figura 19	Exemplar de <i>Heleobia piscium</i>	51
Figura 20	Desenvolvimento de embrião de <i>Heleobia piscium</i> , estágio de formação de blástula.....	54
Figura 21	Adesão de ovos de <i>Heleobia piscium</i> sob as conchas dos demais indivíduos pertencentes à mesma coleta em Arroio Grande.....	54
Figura 22	Cercária apresentando cauda bifurcada.....	55

Figura 23	Formação de cercárias unidas pelas caudas (formato radiado).....	55
Figura 24	Cercárias encontradas rotineiramente nas placas de petri.....	56
Figura 25	Cercária pigmentada (a e b) e manchas ocelares aparentes (b) emitidas por <i>Heleobia piscium</i>	56
Figura 26	Cercária em fase de encistamento encontrada em placa de petri..	57
Figura 27	Estruturas das metacercárias: camadas (a e b) e ocelos aparentes (b).....	57
Figura 28	Medição das camadas da metacercária.....	58
Figura 29	Local da coleta com desenvolvimento prejudicado dos aguapés em três períodos: primeira coleta (a); segunda coleta (b); terceira coleta (c). Dificuldade na obtenção das amostras (d).....	59
Figura 30	Macrófitas aquáticas flutuantes <i>Eichornea spp</i> (aguapés).....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1	Níveis de tolerância da <i>Biomphalaria glabrata</i> quanto às características físico-químicas das águas por eles habitadas	22
Tabela 2	Variáveis físico-químicas das amostras de água coletadas nos pontos do estudo na Praia do Cassino, Lago Polegar e Arroio Grande, no ano de 2011	51
Tabela 3	Caracterização dos exemplares de Hidrobídeos coletados em Arroio Grande.....	52

Sumário

1. Introdução geral	12
2. Revisão de literatura	15
2.1 Ehrlichiose Monocítica Equina (EME)	15
2.2 Características Geográficas da Região	17
2.3 Procedimento das Coletas de Moluscos	21
2.4 Mensuração de Parâmetros Físico-químicos da água	22
2.5 Pesquisa de Vetores	23
2.5.1 Moluscos	23
2.5.1.1 Reprodução dos Moluscos	26
2.5.2 Trematódeos	27
2.6 Fator Salinidade	31
2.7 Cultivo de Trematódeos em Membrana Corioalantóide (MCA)	32
2.7.1 Descrição da Técnica	35
2.8 Frequência de Parasitismo	36
3. Material e Métodos	38
3.1 Características Geográficas da Região	38
3.2 Procedimento das Coletas de Moluscos	39
3.3 Mensuração de Parâmetros Físico-químicos da água	40
3.4 Processamento das Amostras	41
3.5 Fator Salinidade	41
3.6 Cultivo de Trematódeos em Membrana Corioalantóide (MCA)	44
3.7 Pesquisa de Vetores	48
3.7.1 Reprodução dos Moluscos	48
3.7.2 Trematódeos	48
3.8 Frequência de Parasitismo	48
4. Resultados	50

4.1	Procedimento das Coletas de Moluscos	50
4.2	Mensuração de Parâmetros Físico-químicos da água	50
4.3	Processamento das Amostras	51
4.4	Fator Salinidade	52
4.5	Cultivo de Trematódeos em Membrana Corioalantóide (MCA)	53
4.6	Pesquisa de Vetores	53
4.6.1	Reprodução de Moluscos	53
4.6.2	Trematódeos	54
4.7	Frequência de Parasitismo	58
5	Discussão	59
5.1	Procedimento das Coletas de Moluscos	59
5.2	Mensuração de Parâmetros Físico-químicos da água	60
5.3	Processamento das Amostras	61
5.4	Fator Salinidade	61
5.5	Cultivo de Trematódeos em Membrana Corioalantóide (MCA)	62
5.6	Pesquisa de Vetores	63
5.6.1	Moluscos	63
5.6.1.1	Reprodução dos Moluscos	64
5.6.2	Trematódeos	64
5.7	Frequência de Parasitismo	66
6	Conclusão	67
7	Referências	69

1 Introdução geral

A Ehrlichiose Monocítica Equina (EME) é uma doença infecciosa não contagiosa causada pela *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, cujas células-alvo são os monócitos circulantes. O agente apresenta tropismo pelo trato intestinal, produzindo um quadro de diarreia severa nos animais contaminados (HOLLAND et al., 1985; CORDES et al., 1986).

Diagnosticada em equinos do sul do Brasil, a enfermidade os atinge independente de idade, raça ou sexo (HOLLAND et al., 1985), apresentando como principais sinais clínicos febre, diarreia e desidratação, podendo agravar-se em alguns casos, ocasionando a morte (ZIEMER et al., 1987) ou complicações como laminite, caracterizada por dificuldade de locomoção e dor digital em equinos (RIKIHISA; PERRY, 1985; ZIEMER et al., 1987; DUTRA, 1988; LONG et al., 1995).

Estudos sustentam ser oral a forma de contaminação da EME, havendo relação com a presença de trematódeos aquáticos (BARLOUGH et al., 1998; PUSTERLA et al., 2000). Caracóis do gênero *Heleobia* foram identificados como primeiros hospedeiros intermediários dos trematódeos infectados com a *N. risticii* no Rio Grande do Sul (COIMBRA, 2005).

A enfermidade relaciona-se com regiões alagadiças, portanto, a criação dos equinos nessas áreas proporciona um aumento na ingestão de vetores aquáticos (PUSTERLA et al., 2000; MOTT et al., 2002), tornando maiores as chances de contrair a infecção, principalmente nos meses de temperatura mais elevada, quando a EME apresenta seus característicos picos sazonais de ocorrência (GOETZ et al., 1989, ATWILL et al., 1992; ATWILL et al., 1994).

Em 1979, registrou-se o primeiro caso da enfermidade no Estado de Maryland, Estados Unidos, próximo ao Rio Potomac, denominando-se desde então “Febre do Cavalo de Potomac” (“Potomac Horse Fever”) (RIKIHISA; PERRY, 1985).

No Brasil, casos foram documentados no Rio Grande do Sul nos municípios de Rio Grande, Santa Vitória, Maquiné, Palmares do Sul e Arroio Grande, onde neste, em propriedade localizada próxima a Lagoa Mirim, casos de EME foram confirmados e gastrópodes do gênero *Heleobia*, caracterizados como positivos para *N. risticii*, sendo relatada como a principal causa de diarreia em cavalos não estabulados (ALMEIDA et al., 2001; COIMBRA et al., 1999; COIMBRA, 2003; COIMBRA et al., 2005). As espécies de moluscos *Heleobia parchappei*, *Heleobia davisi* e *Heleobia piscium* foram identificadas, albergando cercárias do tipo *Parapleurolophocercous cercariae* como portadores de *N.risticii* (COIMBRA et al., 2005).

A região estudada (Propriedade rural em Arroio Grande, às margens da Lagoa Mirim – pertencente ao estuário da Lagoa dos Patos) representa uma área de criação de equinos da raça Crioula, que, devido ao manejo na propriedade, utilizam os mananciais hídricos como principal fonte de ingestão de água. O encontro ao longo de vários anos de larvas de trematódeos em moluscos desta região demonstra que os ciclos biológicos desses helmintos vêm sendo mantidos, causando prejuízos à propriedade.

Barreira e Araujo (2005) afirmam que a salinidade é um dos principais fatores reguladores do ciclo reprodutivo de moluscos nos estuários. Em seu estudo, observaram que a diminuição da salinidade, em razão do aumento da precipitação pluviométrica no período chuvoso, poderia influenciar a reprodução dos animais, uma vez que induziria as células do animal à realização de ajustes da osmolaridade.

O conhecimento das áreas geográficas de ocorrência dos moluscos hospedeiros intermediários de trematódeos é importante para se detectar os riscos de transmissão de parasitoses aos rebanhos nas regiões. De acordo com o verificado, ressalta-se a possibilidade da distribuição dos parasitas ser mais ampla do que a registrada. A compreensão do ciclo biológico da doença, juntamente com a delimitação de sua área de ocorrência são ferramentas úteis para que medidas profiláticas como o manejo dos animais no pastoreio nas propriedades possam ser tomadas.

Com este estudo objetivou-se testar em laboratório os efeitos da salinidade na sobrevivência, reprodução e emissão de cercárias do gastrópode *Heleobia piscium*, primeiro hospedeiro intermediário de trematódeos envolvidos na epidemiologia da

Ehrlichiose Monocítica Equina no Sul do Brasil, assim como estabelecer a frequência de infestação parasitária nos moluscos coletados, visando com isso, obter resultados que possam ser utilizados na demarcação de possíveis novas zonas apropriadas à enfermidade, principalmente regiões estuarinas, onde as águas são mais salinas. Outro objetivo do estudo foi a obtenção da forma adulta do trematódeo encontrado parasitando os moluscos através da técnica de inoculação de metacercárias em membrana corioalantóide de ovos de galinha embrionados.

2 Revisão de literatura

2.1 Ehrlichiose Monocítica Equina (EME)

A Ehrlichiose Monocítica Equina (EME) é uma síndrome diarréica infecciosa não contagiosa causada pela *Neorickettsia risticii* que acomete equinos, instalando-se em seus monócitos circulantes, promovendo um quadro de diarreia, desidratação, febre e anorexia (HOLLAND et al., 1985).

A *Neorickettsia risticii* (*N. risticii*) é uma riquetsia classificada na Ordem Rickettsiales, da Família Rickettsiaceae e Tribo Ehrlichiae. As ehrlichias caracterizam-se como bactérias gram-negativas, altamente pleomórficas e comportam-se como parasita intracelular obrigatório de leucócitos (TORTORA et al., 2000).

Conhecida como “Potomac Horse Fever” ou “Febre do Cavallo de Potomac”, a EME, cuja ocorrência se dá de forma endêmica e sazonal em regiões alagadiças nos meses mais quentes do ano, foi primeiramente descrita em 1979, em Maryland, Estados Unidos, próximo às pastagens ao longo do Rio Potomac, e desde então já foi relatada em diversas regiões, como América Central, América do Sul e Europa (PALMER et al., 1986; BREIDER e HENTON, 1987; JOHN et al., 1989; RIKIHISA, 1998; DUTRA et al., 2001).

A Ehrlichiose Monocítica Equina no sul do Rio Grande do Sul é relatada como a principal causa de diarreia em equinos não estabulados em propriedades localizadas à orla da Lagoa Mirim (COIMBRA et al., 1999; COIMBRA et al., 2006), e conhecida como “Curso”, descrito como sazonal, ocorrendo do final da primavera até o outono (DUTRA et al., 2001; COIMBRA et al., 2006). Equinos em geral são suscetíveis à doença, sem qualquer relação com sexo ou idade. No entanto, a maior incidência dá-se entre os animais acima de quatro anos, e, aqueles transportados para regiões endêmicas parecem ser mais sujeitos a infecções mais graves do que

os que já estavam nessas áreas (ATWILL et al., 1992; DUTRA et al., 2001).

A região Sul do Brasil e o Uruguai apresentam características semelhantes, como a baixa altitude e áreas alagadiças, banhadas pelas Lagoas Mirim e Mangueira, onde casos compatíveis com EME já foram identificados. A ocorrência de diarreia em equinos e perda de animais sem causa determinada foi relatada durante vários anos por veterinários e proprietários da região, principalmente nos Municípios de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande e Arroio Grande (COIMBRA et al., 1999; DUTRA et al., 2001).

Investigações com vetores possivelmente responsáveis por sua transmissão foram realizadas (RIKIHISA, 1998), como por exemplo, o estudo dos artrópodes Tabanídeos e moscas de estábulo, sendo que nenhuma relação entre a enfermidade e os possíveis vetores pôde ser estabelecida (LEVINE et al., 1990; LEVINE et al., 1992; GORDON et al., 1988; PERRY et al., 1989).

Devido à semelhança genética com riquetsias de transmissão oral (*Ehrlichia sennetsu*, *Neorickettsia helminthoeca*), sugeriu-se que a EME poderia acompanhar esse padrão intermediado por trematódeos aquáticos (RIKIHISA, 1998; BARLOUGH et al., 1998; PUSTERLA et al., 2000; KANTER et al., 2000). A transmissão do agente parece ser por via oral, onde a *N. risticii* é veiculada por trematódeos que parasitam caracóis do gênero *Heleobia* em ambientes aquáticos (COIMBRA, 2003).

Barlough et al., (1998) estudaram caramujos da Família Pleuroceridae do gênero *Juga* como possíveis hospedeiros intermediários de trematódeos portadores da *E. risticii*. Os gastrópodes foram coletados em regiões de ocorrência de EME, quando estágios de esporocistos e cercárias de um trematódeo foram encontrados. Estas cercárias foram morfológicamente classificadas como virguladas, com duas ventosas, uma oral e outra ventral. Os estágios do trematódeo foram coletados e testados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quanto à presença de DNA de *E. risticii*, com resultados compatíveis para o agente, tornando assim os trematódeos liberados pelo caramujo *Juga spp.* possíveis vetores da *Neorickettsia*. No Rio Grande do Sul, Coimbra (2003) identificou caramujos do gênero *Heleobia* que albergavam cercárias do tipo *Parapleurolophocercous* como portadores de *N. risticii*.

2.2 Características geográficas da região

Segundo dados obtidos na Agência da Lagoa Mirim (ALM), Pelotas, a Bacia Hidrográfica da Lagoa Mirim localiza-se entre os paralelos 31°30' e 34°30'S e entre os meridianos 52° e 56°O (Fig. 1), possuindo aproximadamente 62.250 km² de superfície, dos quais 29.250 km² (47%) situam-se em território brasileiro e 33.000 km² (53%) em território uruguaio, é uma das mais importantes lagoas de água doce da América do Sul, uma vez que é considerada o segundo maior corpo hídrico com características lacustres do Brasil, superada apenas pela Laguna dos Patos (KOTZIAN; MARQUES, 2004).

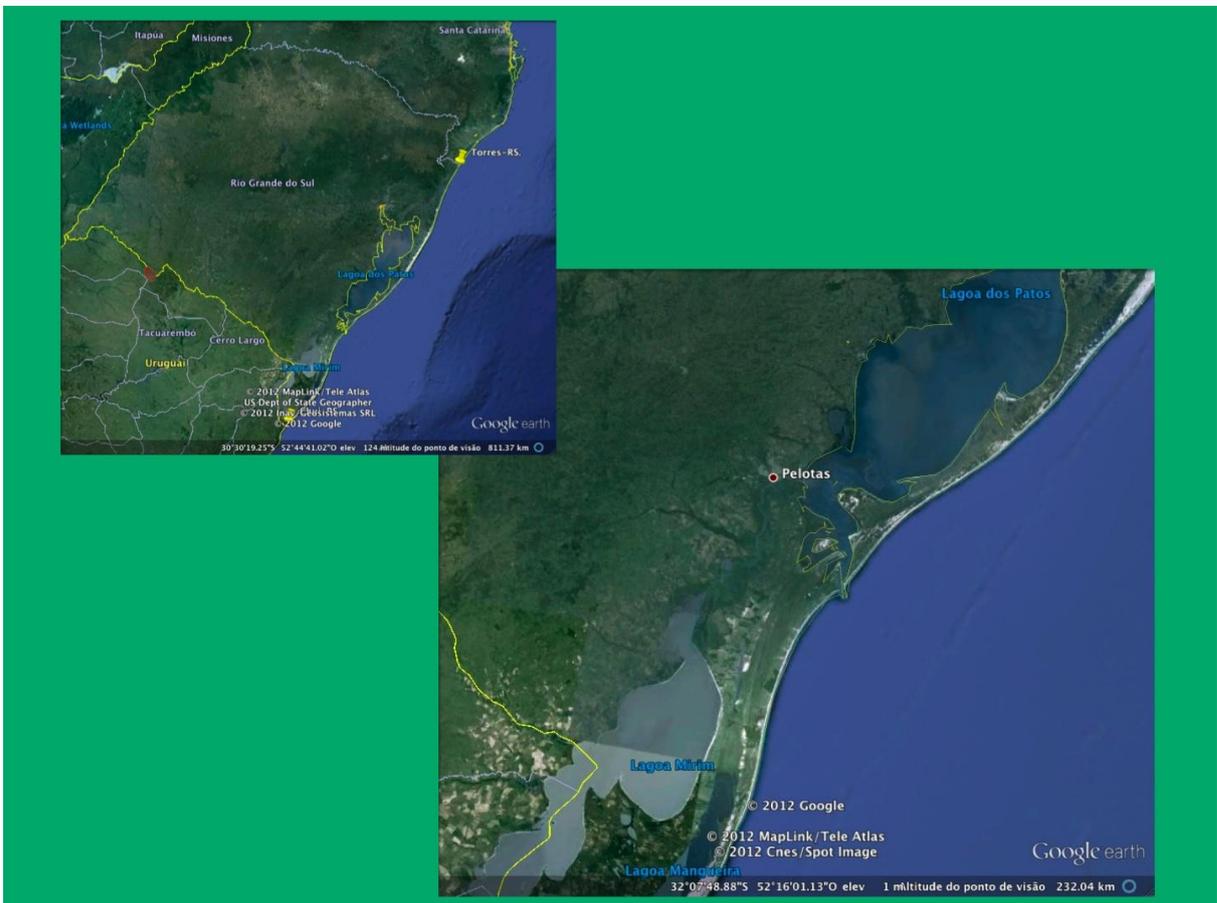


Figura 1 – Vista aérea do Estado do Rio Grande do Sul, destacando a localização da Lagoa Mirim e Lagoa dos Patos.

Pertencente ao complexo do Estuário da Lagoa dos Patos, a Lagoa Mirim, como corpo de água principal da bacia, possui uma área de 3.749km², dividindo-se em oito bacias hidrográficas menores, conhecidas no lado brasileiro como São Gonçalo, Arroio Grande e a do Litoral, onde estão localizados o Banhado do Taim e a Lagoa Mangueira, entre outras; no lado uruguaio, a bacia do Tacuari, Cebollati, Sarandi e São Miguel; na divisa entre o Brasil e o Uruguai, está a bacia do Rio Jaguarão (AGÊNCIA DA LAGOA MIRIM).

A Lagoa dos Patos é classificada como a maior lagoa do tipo “estrangulado” no mundo, com superfície de 10.227 km² (KJERFVE, 1986), e recebe água de uma bacia de drenagem de 201.626 km², tanto diretamente, a partir de tributários, como da área de drenagem da Lagoa Mirim, através do Canal de São Gonçalo (Fig. 2). A área estuarina no sul da Lagoa é de 971 km² (aproximadamente 10% da Lagoa), na qual existe uma troca de água com o Oceano Atlântico através de um canal com 20 km de comprimento e 0,5-3km de largura (BONILHA; ASMUS, 1994).



Figura 2 – imagem aérea da Barragem com eclusa no Canal São Gonçalo.

FONTE: www.popa.com.br

Confirmando as informações obtidas de estações pluviométricas e meteorológicas, a Agência da Lagoa Mirim afirma que a região apresenta um clima subtropical, com temperaturas médias mensais entre 25°C em Janeiro a 11°C em Julho, e que as precipitações são bem distribuídas ao longo do ano, variando entre 1.200 e 1.450 mm, os meses de junho a setembro, que, segundo Machado (2007) em geral são mais chuvosos e, novembro e dezembro, os mais secos. Portanto, Beltrame e Tucci (1998) apontam que a sustentabilidade hídrica da Lagoa Mirim e Canal São Gonçalo é obtida por precipitações médias anuais, e que a grande parte da água que chega à bacia da Lagoa por meio das precipitações é perdida através do escoamento superficial e mesmo pela evaporação, que chega a valores iguais a 1.000 mm/ano.

No entanto, são frequentes as deficiências de umidade nos solos devido às estiagens, associadas a uma maior evapotranspiração na primavera e verão, quando ocorrem chuvas concentradas que ocasionam o encharcamento dos solos em áreas mal drenadas, prejudicando os cultivos e, ainda, provocando alagamentos e inundações (AGÊNCIA DA LAGOA MIRIM).

O escoamento do Complexo Mirim se faz através do Canal do São Gonçalo, cujo fluxo de água é controlado por barragens artificiais, para impedir a penetração de água salgada do estuário para a Lagoa Mirim e somente durante períodos de grande acúmulo de água na Lagoa Mirim, estas barragens são abertas. Conseqüentemente, a descarga de água doce na porção norte do estuário é variável, sendo normalmente mais intensa durante o inverno e primavera (GARCIA, 1998).

A distribuição de salinidade não tem forte relação com a variabilidade de maré, mas correlaciona-se com o vento e com variações na descarga de água doce, em uma escala de horas a semanas (MÖLLER et al., 1991), sendo que o estuário, zona de transição entre a zona límnic e oceânica, apresenta variações diárias e até horárias de constituintes químicos (BAPTISTA, 1984).

Devido às características do estuário “estrangulado”, a pequena oscilação de maré e à grande variabilidade sazonal e anual da precipitação pluviométrica, as marismas do estuário da Lagoa dos Patos são irregularmente alagadas por águas com salinidade variável. Condições eurialinas tendem a prevalecer no verão,

quando, durante períodos de déficit hídrico extremo, estas podem ocasionalmente aproximar-se de hipersalinas (D'INCAO et al., 1992; BASTOS et al., 1993a).

No estuário da Lagoa dos Patos, a composição da macrofauna bentônica apresenta um maior número de espécies estuarinas e marinhas eurialinas em relação às límnicas, comum em ambientes estuarinolagunares (BEMVENUTI, 1998). Capítoli et al. (1978) relacionaram 15 espécies de macroinvertebrados tipicamente estuarinas e apenas três espécies límnicas, entre elas *Heleobia parchapei*, que ocorrem na área estuarina durante períodos de maior influência de água doce.

Nas áreas de canais mais profundos, as populações bentônicas são pobres, restritas a espécies comedoras de depósito superficial, entre as quais, destacam-se *Heleobia australis*, que ocorre em maior abundância (CAPÍTOLI et al., 1978, BEMVENUTI et al., 1992), possuindo, segundo Capítoli et al. (1978) ampla distribuição batimétrica, considerando-se a espécie de maior abundância em águas rasas, entre dois e seis metros de profundidade, e, de acordo com o mesmo autor, o gastrópode apresenta uma ampla distribuição vertical em fundos arenolodosos, ocorrendo desde os planos intermareais até o canal.

Na América do Sul, *Heleobia australis* (Orbigny, 1835) é a espécie dominante da família Hydrobiidae, e considerada um importante recurso alimentar para diversas outras espécies (ALBERTONI et al., 2003). Reise (1985) afirma que os gastrópodes Hydrobiidae são submetidos à severa predação devido à preferência por esses sedimentos e pela provável migração da espécie quando a salinidade aproxima-se de zero (CHOMENKO e SCHAFFER 1984; BEMVENUTI et al., 1992). Sob condições desfavoráveis, o deslocamento de *H. australis* é facilitado pela sua relativa mobilidade e capacidade de dispersão, utilizando a tensão superficial da água (BEMVENUTI et al., 1992; BEMVENUTI e NETTO 1998).

O gastrópode *Heleobia australis*, de ampla distribuição na região estuarina, ocorre inclusive nos canais (BEMVENUTI et al., 1978), caracterizando-se pela abundância na região estuarina, porém suas densidades diminuem em baixas salinidades. A espécie parece bem adaptada para habitar em regiões sob influência marinha e pode migrar, caso não encontre uma determinada concentração salina para sua osmorregulação. Drásticas flutuações na densidade desse gastrópode no infralitoral estuarino durante períodos com salinidade próxima a zero foram

atribuídas às reações de escape, utilizando-se para isso, da tensão superficial da água (CHOMENKO e SCHAFER 1984; BEMVENUTI et al., 1992).

Os macroinvertebrados bentônicos compreendem um grupo de invertebrados com tamanho superior a 1mm, diretamente relacionados com o fundo, o que determina uma relativa uniformidade nos seus modos de vida, apesar da variedade de suas origens filogenéticas. Em ambientes estuarinos, por exemplo, as flutuações de salinidade influenciam desde variações diárias até interanuais na composição, abundância e diversidade do macrozoobentos, que, durante o verão têm a atividade reprodutiva ativada da maioria de seus integrantes. As variações de salinidade no estuário, fortemente influenciadas pelo nível da água na Lagoa dos Patos, direção e intensidade dos ventos, são as principais responsáveis pela composição de espécies, diversidade e abundância da macrofauna bentônica, podendo caracterizar cenários recorrentes num futuro próximo (GARCIA et al., 2001; COLLING et al., 2007a).

Num cenário de aquecimento global com aumento do nível do mar, a influência marinha tende a se estender através da região do estuário até 150 km laguna adentro, como observado em período de seca prolongada durante o evento La Niña de 1988 (ODEBRECHT et al., 2005). Alguns estudos sugerem que eventos El Niño poderão se tornar mais frequentes e intensos com o agravamento do aquecimento global (TIMMERMANN et al., 1999).

2.3 Procedimento das Coletas de moluscos

Os gastrópodes *Heleobia piscium* (Orbigny, 1835) são encontrados aderidos à vegetação (raízes de água-pé e macrófitas aquáticas), às rochas, às margens e também no sedimento/substrato, enterrados no fundo do corpo d'água (MANSUR et al., 2008).

A presença de *Heleobia piscium* pode ser observada em diferentes tipos de coleções hídricas, como arroios, canais de irrigação, rios, açudes, lagos, brejos, valas de esgoto ou drenagem, córregos ou riachos (PEREIRA et al., 2000 e 2001; MANSUR et al., 2008). A correnteza é um fator importante: as colônias geralmente são abundantes em águas estagnadas, enquanto que em águas correntes, com

velocidade superior a 30cm por segundo, os moluscos não formam populações. A capacidade em se adaptar aos diferentes tipos de substratos, e sua ampla distribuição nos microhabitats explica a elevada incidência e densidade populacional dos gastrópodes (PEREIRA et al., 2010).

Moluscos permanecem vivos na lama seca durante vários meses, resistindo às baixas temperaturas (OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009). Sobrevivem fora da água por longos períodos através da retração de seus corpos no interior da concha, diminuindo os efeitos da dessecação; obrigam-se a manter-se por meio de suas próprias reservas alimentares, com um suprimento limitado de oxigênio e acumulação de excretas potencialmente tóxicas. Assim, a sobrevivência à seca depende de sua capacidade em conservar recursos como água, oxigênio e energia e eliminar ou neutralizar produtos tóxicos do metabolismo (THIENGO et al., 2007).

2.4 Mensuração de Parâmetros Físico-químicos da água

Os níveis de tolerância das características físico-químicas das águas habitadas pelos moluscos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiros intermediários naturais de *Schistosoma mansoni* (trematódeo causador da esquistossomose em humanos) podem chegar a faixas relativamente amplas de condutividade, oxigênio dissolvido, temperatura e pH (THIENGO et al., 2007), conforme tabela a seguir:

Tabela 1. Níveis de tolerância de *Biomphalaria glabrata* quanto às características físico-químicas das águas por eles habitadas.

Fatores Físico-químicos	Valores	
	Mínimos	Máximos
Condutividade (µmho/cm)	117	2000+
Saturação de Oxigênio (%)	0	86,4
Temperatura (°C)	18	41
pH	5,6	9,1

*Thiengo et al. (2007)

2.5 Pesquisa de vetores

2.5.1 Moluscos

A zoologia classifica os caracóis como moluscos, nome originado do latim “*mollis*”, significando “mole”, cujas características os definem como: corpo mole, inteiriço, com cabeça e pé que se confunde com o ventre e vísceras localizadas na parte superior, tudo protegido pela concha helicoidal (FERRAZ, 1999).

Silva et al. (2010) afirma que moluscos desenvolvem esqueleto rígido em forma de concha para se proteger de predadores e suportar a pressão hídrica do meio aquático em que habitam. As conchas são basicamente formadas pela deposição contínua do nácar pelo próprio molusco a partir da superfície interna da concha onde se desenvolve, proporcionando um mecanismo de defesa contra parasitas e uma forma de manter a área lisa e livre de corpos estranhos como grãos de areia.

Thiengo et al. (2007) descrevem que a família Hydrobiidae possui concha pequena oval-cônica ou turriculada, opérculo córneo, às vezes calcificado, vivendo em água doce ou salobra. De acordo com Liu et al. (2001), a família possui mais de 300 gêneros e tem sua sistemática ainda muito confusa, apresentando, segundo Kabat e Hershler (1993), distribuição global em zonas entre marés de lagos e estuários. Entre os gêneros que ocorrem no Brasil, citam-se: *Littoridina*, *Heleobia* e *Idiopyrgus*.

Antes de 1982, o gênero *Heleobia* chamava-se *Littoridina* (GAILLARD 1973; GAILLARD; CASTELLANOS, 1976). Davis et al. (1982) sugeriram que todas as espécies deveriam ser substituídas no Gênero *Heleobia*, Hershler e Thompson (1992); Kabat e Hershler (1993) concordaram. Alguns autores ainda defendem a identidade de hidrobídeos sul-americanos como *Littoridina* (Aguirre; Farinati, 2000), o que gera confusão entre os especialistas.

Thiengo et al. (2007) afirmam que, entre as classes pertencentes ao Filo Mollusca, a Gastropoda merece destaque pela sua importância médica, veterinária e econômica, pois constitui cerca de 75% do número total de espécies do Filo e inclui transmissores de helmintoses em geral. Alguns moluscos de água doce são os primeiros hospedeiros intermediários de trematódeos que causam parasitoses em

humanos e animais, e assim ocupam lugar de destaque no que pode ser chamado de limnologia médica (STRAYER, 2000).

O poder de infecção do trematódeo é alto, pois um único miracídio, ao penetrar no hospedeiro intermediário, resulta em mais de 4.000 cercárias que irão se fixar na vegetação existente ao redor das fontes de água. O grau de infestação de uma pastagem depende da produção de ovos pelos parasitos adultos e das condições climáticas adequadas para a sobrevivência dos moluscos (OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009).

Na Argentina, *Heleobia piscium* (d'Orbigny, 1835) e *Heleobia parchappii* (d'Orbigny, 1835) foram confirmados como hospedeiros de cercárias de diferentes espécies de trematódeos digenéticos (OSTROWSKY DE NUÑEZ, 1975).

Apesar da grande importância atualmente atribuída aos moluscos como indicadores da qualidade ambiental (BOUCHET; GARGOMINY, 1998; STRAYER, 1999a; SALÁNKI et al., 2003; CATALDO et al., 2001), poucos estudos deste grupo têm sido realizados no Brasil (SANTOS; MONTEIRO, 2001).

Dentre os fatores que regulam a taxa de crescimento no ciclo de vida dos pulmonados, a temperatura é o mais decisivo: sob baixas temperaturas, muitos moluscos terrestres e de água doce param de alimentar-se, tornando-se totalmente inativos (hibernação), ou alimentam-se muito pouco e, conseqüentemente, crescem lentamente (MICHELSON, 1961; GHOSE, 1963; HYMAN, 1967; HAUT; GHOSE, 1986; QUIJON et al., 2001). A temperatura portanto, pode afetar a produção de gametas, o desenvolvimento embrionário, a taxa de eclosão de filhotes, o crescimento, a sobrevivência e o comportamento desses animais (VAN DER SCHALIE, 1973; DIMITRIEVA, 1975; SIEFKER et al., 1977; RAUT; GHOSE, 1980; RAUT et al., 1992; FURTADO, 2002).

O enterramento no substrato constitui uma resposta comportamental exibida por diversas espécies de moluscos pulmonados, durante condições desfavoráveis de temperatura e umidade (HYMAN, 1967; DIMITRIEVA, 1975). Esse comportamento diminui o risco de dessecação, já que o substrato fornece a umidade necessária à sobrevivência dos moluscos e pode funcionar como uma barreira física à evaporação da água corporal (COMBRINCK; VAN EEDEN, 1975) e também propicia a continuidade dos ciclos parasitários (BEZERRA et al., 1999; PIERI;

JURBEG, 1981).

Diversas espécies apresentam estratégias fisiológicas e comportamentais, tais como a estivação, a retração da massa cefalopodal no interior da concha e o enterramento, as quais garantem a sobrevivência durante períodos desfavoráveis, com altas temperaturas e nenhuma oportunidade para a re-hidratação (ARAD, 1993; EMBERTON, 1994).

A estivação é um estado de torpor aeróbico, que envolve mudanças comportamentais, fisiológicas e bioquímicas, que permitem aos moluscos pulmonados resistir a condições desfavoráveis de umidade, temperatura e disponibilidade de alimento (RICHARDOT, 1977; 1978; STIGLINGH; VAN EEDEN, 1977; STOREY, 2002). Esta fisiologia quiescente pode ocorrer durante um período curto, mas normalmente é empregada como uma estratégia que garante a sobrevivência dos moluscos durante uma longa estação seca (STOREY, 2002).

Os elementos críticos para a sobrevivência durante a estivação são a capacidade de retenção de água e a disponibilidade de reservas energéticas (STOREY, 2002). Os moluscos pulmonados terrestres exibem adaptações que garantem a manutenção das reservas energéticas e da água corporal em níveis compatíveis com a sua sobrevivência, durante a estivação. A seleção de locais protegidos, que ajudem a minimizar a área da superfície corporal exposta e, portanto, sujeita à evaporação; a retração da massa cefalopodal no interior da concha e a imobilização são comportamentos relacionados à economia da água e energia, que antecedem a série de modificações ao nível fisiológico e bioquímico que caracterizam o estado de estivação (STOREY, 2002). A perda de água por evaporação durante a respiração é minimizada por padrões de respiração apnóica, com liberação de CO₂ e captação de O₂ descontínuas (STOREY, 2002; RAMOS-VASCONCELOS; HERMESLIMA, 2003).

A estivação pode ser acompanhada pela formação de uma estrutura de fechamento temporário da abertura da concha, denominada epifragma, que funciona como uma barreira física, que impede a perda de água por evaporação (STIGLINGH; VAN EEDEN, 1977; STOREY, 2002).

2.5.1.1 Reprodução dos Moluscos

Cazzaniga (1981) estudou *Heleobia parchappii* em ambientes de água doce do Sul da província de Buenos Aires (Argentina) e documentou dois picos de desova durante o ciclo reprodutivo da espécie. No ano seguinte, o mesmo autor destacou que *H. parchappii* apresentou flutuação marcante quanto à densidade, estrutura de tamanho instável e abundância de moluscos jovens nos ambientes mesoalinos.

De Francesco e Isla (2004) descreveram dois picos de desova para *H. parchappii*, um no início da primavera e outro durante o outono nos canais salinos da lagoa costeira Mar Chiquita, Argentina. A similaridade observada nos ciclos de vida em diferentes condições salinas aponta para a relativa importância deste fator no condicionamento da atividade reprodutiva dos moluscos. Os autores descobriram que o tamanho da estrutura permanece relativamente estável e que o grupo pode ser seguido mensalmente durante o ano. Dessa maneira, a salinidade parece não exercer influência marcante na atividade reprodutiva de *H. parchappii*, no entanto afeta a estrutura da população. Portanto, moluscos do canal salino alcançaram tamanhos menores que aqueles encontrados nos ambientes de água doce.

De Francesco e Isla (2003) descreveram a temperatura da água como o parâmetro que melhor se encaixa no crescimento das amostras de *H. piscium*. No entanto, não possui efeito determinante no ciclo reprodutivo e no crescimento das espécies, como a condutividade tem em outras espécies de *Heleobia*. Não existem dados disponíveis para comparação entre as populações de *Heleobia piscium* em diferentes tipos de habitats.

A população de moluscos aumenta durante as estações chuvosas e diminui com temperaturas baixas e nos períodos de seca. A produção de uma nova geração de moluscos leva aproximadamente um mês em condições adequadas (OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009).

Fêmeas maduras depositam seus ovos fertilizados em cápsulas (ou massas de ovos), preferencialmente em conchas de indivíduos vivos da mesma espécie (Fish; Fish, 1974), mas também podem ser deixados em conchas de indivíduos mortos, ou de conchas de outras espécies, nos grãos de areia ou algas (ANDERSON, 1971).

Experimentos enfatizando aspectos biológicos e comportamentais de moluscos em laboratório são importantes para o desenvolvimento de técnicas de criação e manejo destes animais com aplicação em trabalhos experimentais com parasitos. Dentre os aspectos importantes da biologia dos moluscos, destacam-se o crescimento e a reprodução (LEAHY, 1984), uma vez que a produção de ovos associa-se ao tamanho das conchas (GOMES et al., 1975).

2.5.2 Trematódeos

De Leon (2001) define trematódeos digenéticos como os helmintos mais comumente encontrados parasitando vertebrados. Segundo Ruppert & Barnes (1996), em geral são achatados dorsoventralmente, alguns grossos e carnudos, outros longos e filamentosos, variando em tamanho de aproximadamente 0,2mm a 6cm de comprimento. Travassos (1950) os caracteriza com formato de folha, porém podem ainda apresentar diversos feitios, desde ovóide até filiforme, com duas ventosas e presença de cutícula lisa ou provida de espinhos geralmente pouco desenvolvidos. São anaeróbios facultativos, em geral hermafroditas, possuindo vários estágios larvais (FRIED, 1986; TRAVASSOS, 1950).

Trematódeos digenéticos são endoparasitos comuns em todos os táxons maiores de vertebrados: peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, sendo que alguns causam doenças debilitantes em criações de animais e em seres humanos (RUPPERT; BARNES, 1996). Devido à sua prevalência e abundância na natureza, é um dos grupos mais importante de parasitas a ser considerado no manejo da biodiversidade, conservação e também como indicador de monitoramento de ecossistema (DE LEON, 2001).

Travassos (1950) os caracteriza como parasitas em todas as fases do ciclo, evoluindo sempre em dois hospedeiros. Corroborando, Ruppert e Barnes (1996) afirmam que seu complexo ciclo de vida inclui dois ou mais hospedeiros e pelo menos dois estágios infectantes, o que é responsável pelo nome Digenea (duas gerações). O primeiro hospedeiro intermediário trata-se normalmente de um molusco gastrópode específico, no qual ocorre o desenvolvimento do estágio intra-molusco (FRIED, 1986) e, se um segundo hospedeiro intermediário ocorre, este é quase

sempre um artrópode ou um peixe; sendo um vertebrado seu hospedeiro definitivo (RUPPERT; BARNES, 1996).

Ruppert e Barnes (1996) constataram que, embora variações ocorram entre espécies, o ciclo de vida dos digenéticos consiste nos seguintes estágios: zigoto – larva miracídio – esporocisto – rédia – cercária – metacercária – adulto.

Para Travassos (1950), a evolução dos trematódeos obedece a um tipo geral e se processa do seguinte modo: o ovo dá origem a uma larva ciliada, miracídio, que atinge um hospedeiro intermediário e nele penetra, sofrendo uma evolução e multiplicação que a torna apta a penetrar no hospedeiro definitivo. O miracídio, penetrando no hospedeiro intermediário, sempre um molusco, se encista, originando um esporocisto, constituído por um conjunto de células embrionárias semelhantes a uma blástula, contendo células germinativas. Estas células originam novas formações pela ruptura do esporocisto, invadindo o organismo do molusco e, evoluindo, vão constituir uma nova fase larval, a rédia, geralmente situada no hepato-pâncreas do hospedeiro. A rédia, com estrutura semelhante à do esporocisto, porém com rudimento de aparelho digestivo, possui células germinativas, que se multiplicam, dando origem a novas rédias — rédias filhas — e à cercárias.

As cercárias abandonam o corpo da rédia por um orifício especial e vão para o meio exterior à procura do hospedeiro definitivo. As rédias filhas permanecem no interior do molusco e produzem uma nova geração de cercárias. Esta evolução pode sofrer modificações e adaptações: assim, a fase de esporocisto pode ser suprimida, evoluindo o miracídio diretamente para a rédia e esta dando logo origem a cercárias; pode também não existir a fase de rédia, dando o esporocisto origem a organismos alongados e sem tubo digestivo — esporocisto de segunda geração, que produzirão cercárias; pode, ainda, não haver a fase de cercária, evoluindo o esporocisto diretamente à metacercária ou jovens trematódeos. A evolução pode também complicar-se pelo aparecimento de duas gerações de rédias (TRAVASSOS, 1950).

De acordo com Ruppert e Barnes (1996), ao deixar o caramujo hospedeiro, a cercária nada em busca do segundo hospedeiro intermediário ou encista como uma metacercária sobre a vegetação aquática ou um objeto inanimado na água, aguardando a ingestão pelo hospedeiro definitivo. Se o ciclo de vida inclui um

segundo hospedeiro intermediário, comumente um artrópode ou peixe, a cercária penetra sua pele, perde sua cauda e encista como uma metacercária no tecido do hospedeiro. Quando a metacercária livre ou o hospedeiro intermediário mais metacercária são ingeridos pelo vertebrado hospedeiro definitivo, a metacercária escapa de seu cisto, migra para o local característico do corpo do hospedeiro e cresce até atingir a forma sexual adulta. No hospedeiro definitivo, os locais de infecção incluem trato digestivo e outros órgãos endodérmicos, como intestino, fígado, dutos biliares, dutos pancreáticos e pulmões.

Travassos (1950) refere-se a parasitismo errático quando larvas de helmintos penetram em hospedeiros cuja espécie não apresenta condições convenientes ao seu desenvolvimento. Estas larvas depois de algumas migrações, encistam-se em qualquer parte do organismo invadido, perecendo ou prosseguindo na sua evolução até completo crescimento, sem, contudo atingir a maturidade sexual.

Segundo Tang e Tang (1977), não só os aspectos morfológicos dos parasitos adultos são utilizados para sua distinção, mas a morfologia das formas larvais nos hospedeiros intermediários também é considerada. Moriyama, Tsuji e Seto (1980) estudaram as diferenças destas espécies através da cariotipagem e concluíram haver diferenças morfológicas e biométricas dos cromossomos, bem como as posições dos centrômeros destas duas espécies.

Dillon (2000) define cercárias como larvas nadantes de trematódeos com caudas bem desenvolvidas, que emergem de esporocistos, migrando para a glândula digestiva do hospedeiro, e, posteriormente adquirindo sua forma livre na água, alternando entre períodos de nados curtos e longos de flutuação ou afundando.

Cercárias acarretam ao organismo que as hospeda fortes perturbações traumáticas; outras vezes, por sua localização em órgão de função nobre e essencial, pode ocasionar resultado letal. Para sua nutrição, absorvem ora substâncias dos organismos hospedeiros, ora substâncias digeridas para uso deste. Além disto, por seus sucos digestivos, determinam intoxicações agudas ou crônicas por vezes muito graves (TRAVASSOS, 1950).

O aparecimento de cercárias começa em média de três a cinco semanas após infecção, alcançando seu auge em 10 semanas. Antes do começo da emissão de cercárias, uma infecção por trematódeos é chamada “latente” ou “pré-patente”, e subsequentemente considerada “patente”. As cercárias emitidas por um hospedeiro infectado, durante seu ciclo podem chegar a milhares (DILLON, 2000).

De acordo com Dillon (2000), cada cercária mede cerca de 500µm de comprimento, portanto, o molusco sofre danos teciduais consideráveis durante sua emissão. Após emergir do tecido do molusco, a larva dos trematódeos (cercária) pode encontrar o hospedeiro intermediário secundário ou hospedeiro definitivo através de transmissão passiva (metacercária) ou penetração ativa, respectivamente (ISMAIL, 1989; GALAKTIONOV, 1980).

Fried (1997) afirma que o processo de encistamento é complexo e ainda não totalmente compreendido. Após deixar o molusco, as cercárias nadam pela água, encistando-se em plantas submersas para tornarem-se metacercárias. De acordo com Sey (1979), existem espécies que, devido ao seu nado lento após deixarem o hospedeiro, acabam encistando a uma curta distância do mesmo.

Oliveira e Spósito Filha (2009) definem metacercárias como formas de resistência ao ambiente, onde podem sobreviver por muitas semanas. Sua viabilidade é maior em temperaturas abaixo de 20°C. Durante seu experimento, Koppel (2011) avaliava a sobrevivência das metacercárias através da observação do parasita se movendo no interior dos cistos.

Itagaki e Chinone (1982) destacaram que o aumento da temperatura ambiente acelera o desenvolvimento da cercária em metacercária no hospedeiro intermediário, podendo atingir o amadurecimento em 15 dias, na temperatura de 30°C. Lwambo et al. (1987) descobriu que a infectividade dos miracídios do *Schistosoma mansoni* era influenciada por alguns fatores como a temperatura da água e salinidade.

Em seu estudo, Dreyfuss et al. (2004) registrou que algumas espécies de metacercárias eram encontradas nas paredes das caixas experimentais enquanto outras em caules de juncos. Grande parte das metacercárias de *Paramphistomum daubneyi* foram encontradas no fundo das placas, enquanto os cistos de *Fasciola hepatica* e *Fasciola magna* localizavam-se nas paredes (RONDELAUD, 2007).

2.6 Fator Salinidade

Águas doces, salobras e salinas são classificadas conforme sua salinidade, segundo especificado na Resolução CONAMA nº 357 de 2005. Por definição, as águas doces apresentam valor igual ou inferior a 0,5‰ para salinidade, águas salobras ficam entre 0,5‰ e 30‰, e águas salinas, valor igual ou superior a 30‰.

A importância do fator salinidade influenciando a distribuição de *Heleobia spp.* ainda não é totalmente conhecida, já que os habitats têm sido descritos qualitativamente, sem informações suficientes sobre suas condições físico-químicas (DE FRANCESCO; ISLA, 2003).

Em ambientes estuarinos, o fator ecológico mais importante é o teor salino de suas águas, o qual determina o padrão de distribuição e densidade dos organismos (MARGALEF, 1984; ROBINEAU, 1987), assim como dos moluscos que habitam este ambiente (CHOMENKO; SCHÄFER, 1984; SPRECHMANN, 1978). Lanzer e Schäfer (1985) observam que o padrão de distribuição dos moluscos dulceaquícolas das lagoas costeiras do Sul do Brasil não responde a barreiras geográficas, e sim a barreiras ecológicas associadas a áreas de variação da concentração salina. Cherril e James (1985) consideram a salinidade o principal fator determinante da distribuição dos Hydrobiidae.

Algumas espécies de gastrópodes pertencentes ao gênero *Heleobia* são comumente encontradas no estuário da Lagoa dos Patos, ambiente fechado e protegido (WASIELESKY, 2000) sujeito a grandes variações de salinidade (BAUMGARTEN; NIENCHESKI, 1990).

Amostras de zoneamento das espécies de *Heleobia* têm sido pouco estudadas, apesar de que esses moluscos constituem o maior componente biótico de ambientes estuarinos (GONÇALVES et al., 1998).

Sob condições extremas de salinidade existentes nos ecossistemas estuarinos, ligeiras diferenças na capacidade osmorregulatória das espécies podem ter uma grande influência nas adaptações fisiológicas. A salinidade é um dos principais fatores ambientais que ordena a distribuição horizontal de invertebrados marinhos, dulcícolas e de água mixohalina que vivem em estuários tropicais (GONZÁLES-ORTEGÓN et al., 2005).

Moluscos estuarinos são geralmente confrontados com mudanças na salinidade devido à influência da água marinha. Muitas espécies eurialinas são hábeis para enfrentar o estresse a que são submetidos através de regulação osmótica e iônica. A aclimação de moluscos eurialinos à água marinha diluída é acompanhada por mudanças morfológicas, etológicas e fisiológicas (LOVETT et al., 2006). Péqueux (1995) afirma que a eurialidade é uma característica necessária aos habitantes estuarinos, uma vez que estes, de acordo com Sabóia-Morais (1996), respondem e se adaptam a variações de salinidade nos corpos d'água, permitindo que sejam responsivos às condições adversas do ambiente aquático.

Contrariando Gaillard e Castellanos (1976), que consideram *H. piscium* uma espécie dulceaquícola, Darrigran (1995) o classifica como eurialino suficiente para suportar mudanças na salinidade da água entre 0.5 e 25‰. A definição de eurialino se dá de acordo com a plasticidade nos mecanismos de regulação iônica e osmótica, que permite que um indivíduo viva, em um momento como uma espécie de água doce e, depois, como uma espécie marinha (SAMPAIO, 2003).

2.7 Cultivo de trematódeos em Membrana Corioalantóide (MCA)

Helminthos são obtidos a partir de hospedeiros naturalmente infectados ou de infecções laboratoriais que usam estágios larvais para infectar hospedeiros definitivos (FRIED, 1991). Segundo Chappell (1980), o cultivo dos parasitas "*in vitro*" pode ser usado para simular condições biológicas do hospedeiro durante vários períodos. No entanto, desta forma os parasitas podem decair seu status fisiológico durante longo cultivo. Regiões ectópicas, como embriões de galinha promovem lugares intermediários, entre o normal "*in vivo*" e o ambiente de cultivo "*in vitro*", de acordo com Fried (1991).

Embriões de galinha têm sido usados no estudo da sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de trematódeos, particularmente, os digenéticos. Sua utilização visa adquirir informações básicas, através do crescimento e identificação de espécies desconhecidas de parasitas, em que o hospedeiro definitivo não é conhecido ou não está disponível (SHIMAZU, 1974), e determinação da habilidade das cercárias em desenvolver-se até sua fase adulta sem passar pelo

estágio de metacercária (FRIED; GROMAN, 1985).

Dentre as razões para o uso de embriões de galinha nas pesquisas biológicas e biomédicas, destacam-se o baixo custo de ovos férteis de galinha, bem como a facilidade em serem obtidos e também na sua manipulação durante os experimentos. Além disso, o maior equipamento necessário é uma incubadora que permita o controle da temperatura e umidade (FRIED, 1991). Da mesma forma, problemas com animais experimentais, como espaço físico, manejo e as restritas regulamentações governamentais sobre seu uso são evitados, além de reduzir a chance de contaminação cruzada.

Trematódeos digenéticos podem crescer em membrana corioalantóide (MCA) de embriões de galinha, técnica primeiramente descrita por Fried (1962). Em 1989, Fried propôs ovocultivo e o desenvolvimento de grande variedade de trematódeos em ovos férteis de galinha, levando de sete a dez dias para obter-se o estágio adulto do parasita, de acordo com sua técnica.

O lugar mais utilizado no embrião de galinha é a membrana corioalantóide, que consiste no ectoderma coriônico mais externo, camada do meio de tecido de conexão ou mesênquima permeável com artérias, veias e capilares e a membrana mais interna de endoderme alantóide (FRIED; STABLEFORD, 1991).

O embrião de galinha desenvolve quatro membranas: saco da gema, âmnion, córion (serosa) e alantóide. No final do desenvolvimento, as duas últimas se unem para formar a membrana corioalantóide, material de grande interesse aos helmintólogos, segundo Fried (1991). Esta membrana consiste em três camadas de tecido: epitélio alantóico derivado da endoderme alantóica, a camada do meio de tecido areolar conector, contendo os vasos sanguíneos e derivada da fusão dos mesodermas alantóico e coriônico, e o epitélio coriônico externo, derivado do ectoderma do córion. Assim como a MCA, outras regiões extraembrionárias podem substituir vários habitats *“in vivo”*.

A membrana corioalantóide foi usada como lugar de desenvolvimento parasitário de sucesso pela primeira vez quando Fried (1962) transplantou mecanicamente metacercárias excistadas de *Philophthalmus hegeneri* para a MCA de embriões de galinha.

Helmintos crescidos em MCA aproveitam nutrientes deste lugar, alimentando-se de tecidos, exsudatos celulares, secreções ou sangue, cujas contribuições nutricionais ainda são desconhecidas. A composição ideal do meio apropriado ao desenvolvimento e à produção de ovos, contudo, varia de acordo com as espécies de hospedeiros e local preferido de infecção dentro do trato gastrointestinal do hospedeiro definitivo (IRWIN, 1997).

Em ovos de galinha fertilizados, ao utilizar-se o embrião, os parasitas têm uma fonte de alimentação sanguínea mais acessível, já que podem ingerir e utilizar o sangue da rede vascular da MCA (FRIED, 1965; FRIED; HUFFMAN et al., 1984).

Os parasitas em geral necessitam de uma alavanca, um estímulo, normalmente proporcionado pelo hospedeiro para passar do estágio larval para o adulto. Na maioria dos estudos de cultivo “*in ovo*” de helmintos, metacercárias livres ou excistadas foram colocadas em MCA. Como fatores possivelmente desencadeadores do desenvolvimento em MCA, destacam-se os requerimentos nutricionais, tensão de oxigênio, tensão de dióxido de carbono, potencial de oxidação-redução, concentração do íon hidrogênio, pressão osmótica e temperatura (FRIED, 1991).

A mudança na temperatura como fator estimulante pode ser evidenciada quando larvas, normalmente obtidas de lugares com temperaturas mais baixas, como peixes ou moluscos de água doce a 4-15^oC, atingem desenvolvimento em MCA, que, por sua vez ocorre sob temperaturas mais elevadas, normalmente 37-41^oC (FRIED, 1991).

Um total de 23 espécies digenéticas de 14 famílias já foram estudadas em embriões de galinha, principalmente em MCA. No entanto, dados de algumas fases dos ciclos de vida dos parasitas frequentemente ficaram faltando. A maioria das espécies que o cultivo produziu ovígeros adultos em embriões de galinha eram digenéticos de aves (FRIED; STABLEFORD, 1991).

Kannangara e Smyth (1974) no final de seu estudo comentaram sobre a impossibilidade de desenvolver um meio universal para o cultivo de trematódeos digenéticos.

Metacercárias de *Fasciola hepatica* foram implantadas na MCA de embriões de sete a dez dias, em temperatura de 39^oC graus (FRIED; BUTLER, 1979). Apenas

quatro (menos de 0,5%) de 1.250 metacercárias foram recuperadas de 50 MCA inoculadas, representando apenas um parasita por MCA (DAVIES; SMYTH, 1978).

2.7.1 Descrição da Técnica

O primeiro estudo de sucesso descrito por Fried (1962) baseou-se no procedimento modificado de Woodruff e Goodpasture (1931), utilizando ovos fertilizados de oito a dez dias, abrindo-se uma janela de 1x1x1cm na superfície superior das cascas dos ovos. A membrana da casca abaixo da janela era umedecida com uma gota de solução salina estéril e removida com um fórceps fino. Usando procedimentos assépticos, os parasitas eram colocados na MCA veiculados pela mínima quantidade de solução salina estéril com auxílio de uma pipeta.

As janelas fechadas com fita transparente ou celofane e os ovos colocados em incubadora umidificada a $38 \pm 1^\circ\text{C}$. Os ovos foram usualmente examinados de um a sete dias depois. A MCA começava a secar por volta dos dias 17 e 18, portanto, se os parasitas precisassem ser mantidos nela durante longos períodos, deveriam ser transferidos para a MCA de novos embriões com oito a dez dias de fecundação (Fried, 1962). Para o exame dos ovos, as fitas foram removidas das janelas, e as cascas retiradas com fórceps, revelando as superfícies das membranas. A maioria dos parasitas foi geralmente recuperada das áreas mais periféricas da membrana, removidos de sua superfície com uma pipeta, examinados vivos e, se procedimentos assépticos fossem utilizados, transferidos para uma nova membrana (FRIED, 1991).

De acordo com Fried e Bradford (1984); Fishbein et al. (1985); Huffman et al. (1984), fragmentos de MCA com parasitas aderidos podem ser removidos para exame histopatológico "*in situ*" ou estudos pato-bioquímicos.

Alguns estudos sustentam que as metacercárias devem ser excistadas e lavadas em várias trocas de solução estéril de Locke, suplementadas com 200UI de penicilina ml^{-1} e 200 μg de streptomomicina ml^{-1} antes da inoculação dos parasitas na MCA (FRIED, 1991).

A idade de desenvolvimento do embrião é um fator importante para alcançar o desenvolvimento pós-metacercarial de alguns trematódeos, considerando que a

idade da MCA usada para estudos de cultivo é mais crítica para alguns trematódeos do que para outros (FRIED, 1973).

Byong-Seol (1989) optou pela lavagem dos trematódeos em solução salina antisséptica, posteriormente despejados na membrana corioalantóide na menor quantidade possível de solução estéril salina (0,1 a 0,3 ml). A janela era então fechada com fita adesiva, e os embriões incubados a 37-38⁰C com ventilação e umidade controladas. Os ovos eram examinados normalmente após sete dias. Após remover a fita, a casca ao redor da janela era lascada e removida, e os parasitas eram retirados da membrana e submersos em solução salina. As amostras coletadas eram fixadas e coradas, e, em alguns experimentos, transferidos para novos ovos embrionados para uma segunda inoculação.

Pekkarinen (1993) costumava lavar as metacercárias diversas vezes em solução de Ringer, e as inoculava na mesma solução, porém em menor volume, através de um orifício (1-1,5cm de diâmetro) na MCA exposta em ovos fertilizados, com 6 a 10 dias de incubação. A membrana da casca era removida em alguns ovos numa área maior (1-2cm de diâmetro), enquanto noutros, apenas na pequena área de inoculação. Durante seu experimento, Pekkarinen (1993) não utilizou antibiótico, os orifícios nos ovos eram fechados com fita "tape", e sua incubação continuava a 37-38⁰C durante dois a seis dias.

Para recuperar os vermes dos ovos, primeiramente o lugar da inoculação era visualizado através do orifício de inserção, que teria sido alargado, e, por último, o embrião era colocado numa placa de petri e minuciosamente examinado. Os parasitas eram coletados em solução de Ringer e examinados ao microscópio imediatamente ou após fixação em formalina. Em seu estudo, muitos parasitas não foram encontrados ou morreram, quando o orifício na membrana da casca era pequeno (PEKKARINEN, 1993).

2.8 Frequência de Parasitismo

Para detectar infecções parasitárias com trematódeos na fase de cercárias, Krailas et al. (2003) utilizou o método de emissão pelos moluscos ou esmagamento dos mesmos. Em ambos os casos, as cercárias foram coletadas em água

desclorada e observadas quanto ao seu comportamento “nadador”. A ocorrência de esporocistos e/ou rédias foi examinada em microscópio durante a dissecação.

3 Material e Métodos

3.1 Características geográficas da região

O presente estudo foi realizado em uma propriedade rural do Município de Arroio Grande (Fig. 3), Rio Grande do Sul, as margens da Lagoa Mirim, endêmico para Ehrlichiose Monocítica Equina (EME) (COIMBRA et al., 2003; DUTRA et al., 2001), de acordo com as coordenadas geográficas obtidas através de Sistema de Posicionamento Global (GPS, marca Garmin nauvi, modelo 255W).



Figura 3 - Propriedade Rural em Arroio Grande.

O local se caracteriza pela criação de cavalos crioulos, que, conforme a Fig. 4, muitas vezes pastam em áreas alagadas devido a confluências de canais de drenagem de campos e lavouras de arroz com o Arroio Parapó, distante aproximadamente 5Km da Lagoa Mirim. Naquele ponto, o arroio possui cerca de 50 metros de largura e está ao nível da Lagoa Mirim.



Figura 4 - Equinos pastando em áreas alagadiças.

3.2 Procedimento das Coletas de moluscos

As coletas ocorreram nos dias 04/01/2011, 24/01/11 e 25/11/11, sendo a primeira delas utilizada para a adequação do método de manutenção “*in vitro*” dos moluscos, e as demais para o estudo do comportamento de moluscos e trematódeos frente a diferentes graus de salinidade, e inoculação de trematódeos em membrana corioalantóide (MCA) de ovos de galinha embrionados, respectivamente.

Foram capturados moluscos do Gênero *Heleobia* através de batidas na vegetação aquática existente, visando o seu desprendimento das raízes, e logo após, sua coleta com o auxílio de baldes e tamis 500 μm de malha por polegada, de acordo com Gomes (2002).

As macrófitas aquáticas flutuantes *Eichornea spp.* (aguapés), onde comumente encontravam-se os moluscos aderidos, foram lavadas e, conforme submergiam-se as raízes dentro dos baldes, os animais que se desprendiam foram recolhidos. Também foram coletados moluscos provenientes do sedimento presente no arroio da propriedade em estudo, seguindo Coimbra (2005). A água contida nos baldes foi peneirada em outro recipiente (Figs. 5a e 5b) e, com o auxílio de uma pinça, os gastrópodes foram capturados e acondicionados em frascos de polipropileno com tampa contendo água própria do local, conforme Fig. 6.



Figura 5 - Água sendo peneirada (a) e gastrópodes capturados retidos na peneira (b).



Figura 6 - Gastrópodes acondicionados em frascos.

Na segunda coleta, 20 litros de água local foram coletados e distribuídos em quatro galões de 05 litros cada, os quais foram armazenados em temperatura ambiente de 25⁰C, durante os 30 dias de experimento.

3.3 Mensuração de Parâmetros Físico-químicos da água

Visando estabelecer maior homogeneidade no estudo, a água dos pontos de coleta utilizados (Arroio Grande, Lago Polegar - situado no *campus* Carreiros da FURG e Praia do Cassino) teve alguns de seus parâmetros físico-químicos considerados relevantes ao experimento, e portanto, avaliados. Dentre os quais estão as concentrações de oxigênio dissolvido na água e sua temperatura,

mensurados através do oxímetro digital HANNA HI - 9146, pH - pHmetro HANNA HI - 8314, condutividade - condutímetro HANNA HI - 8733 e salinidade - refratômetro Salinometer S-1 Meiji Techno.

3.4 Processamento das Amostras

Após a remoção do sedimento residual das amostras, estas passaram por um processo de limpeza ao chegar ao laboratório, constituído por sua lavagem em água corrente, seguida de triagem, sendo determinado o número total de exemplares obtidos em cada coleta, separados conforme a homogeneidade de seus tamanhos (Figs 7a e 7b).

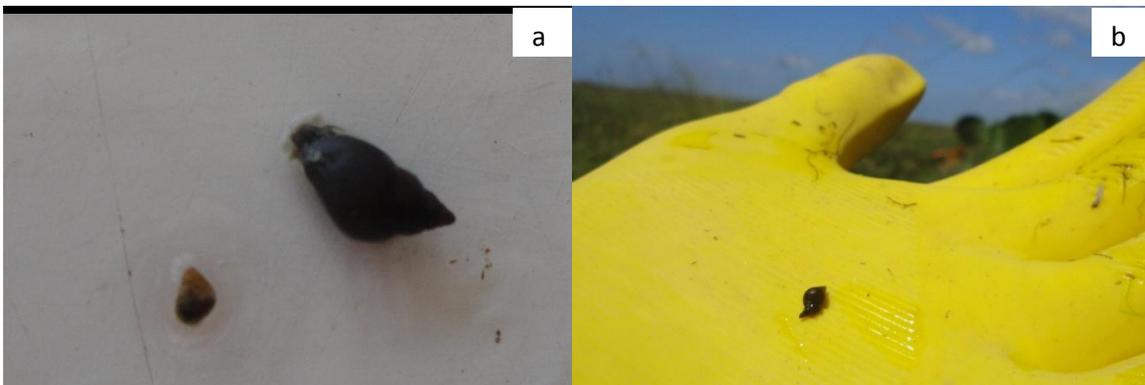


Figura 7 - Diferenças nos tamanhos dos moluscos capturados (a) e tamanho proporcional de um gastrópode coletado (b).

Para a identificação dos exemplares, foram enviadas amostras de moluscos inteiros (concha e corpo), fixados em álcool 70^oGL em três lotes com duplicata para o Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Entre um envio e outro houve um intervalo de nove meses, e, posteriormente à sua classificação os lotes foram incorporados ao acervo do MZUSP.

3.5 Fator Salinidade

Para o experimento da tolerância à salinidade, método adaptado de Lima (2010), foram coletados 900 gastrópodes no dia 24/01/2011, que, após serem separados por tamanho, foram encaminhados ao laboratório de Limnologia da

Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Os moluscos foram mantidos em laboratório em dois aquários, conforme Fig. 8, sob condições adequadas à sobrevivência, tais como: água proveniente do local de coleta (ambiente límnico), substratos e demais organismos oriundos do seu biótopo natural, aeração permanente promovida por bombas de oxigênio e temperatura ambiente de 25°C. A alimentação fornecida aos gastrópodes foi diária, baseada em folhas de alface. Uma tampa, feita de tela de tecido, foi colocada sobre o aquário, conforme Thiengo et al. (2007).



Figura 8 - Manutenção dos moluscos nos aquários com aeração e alimentação.

Para atingir os níveis de salinidade desejados, a água do mar foi diluída com a água do local da coleta (Fig. 9), até que a concentração desejada fosse obtida, sendo as medições realizadas por meio de um refratômetro (Fig. 10).



Figura 9 - Diluição da água do mar com a água do local da coleta.



Figura 10 - Medições de salinidade através do refratômetro.

Transcorridas 24 horas desde o começo da aclimação dos moluscos, estes foram transferidos para placas de petri secas, divididos em 14 indivíduos por placa, para, somente então receberem as soluções, na medida de 50mL cada, contendo os níveis de salinidade: doce, 5‰, 8‰, 10‰, 12‰, 20‰ e 30‰, segundo Fig. 11. O experimento foi realizado com sete placas em duplicata com duração de 30 dias.



Figura 11 - Moluscos divididos em duplicata nos diferentes níveis de salinidade.

As placas foram monitoradas em sala de incubação com temperatura de 25°C e foto-período controlado de 12 horas no escuro e 12 horas no claro, conforme descrição de Thiengo et al. (2007). Durante o experimento, a água foi totalmente renovada diariamente, os indivíduos mortos foram retirados e seu número registrado.

Avaliou-se a sobrevivência das Heleobias e emissão de cercárias nas diversas salinidades medidas em dias, bem como a quantidade total de metacercárias encistadas.

3.6 Cultivo de Trematódeos em Membrana Corioalantóide (MCA)

Para o experimento da inoculação de metacercárias em ovos embrionados, 500 moluscos foram obtidos na coleta do dia 25/11/11, e levados ao Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Separados em grupos de 10 indivíduos por cada placa de petri de 14 cm de diâmetro, foram submetidos à temperatura ambiente de 25^oC e alimentação baseada em folhas de alface. A limpeza das placas era feita duas vezes por semana, e diariamente, conforme protocolo descrito por Thiengo et al. (2007) adicionava-se água às placas, oriunda do lago Polegar, cujas características foram previamente determinadas.

Para a execução do experimento, foi adquirido um total de 48 ovos de galinha embrionados, oriundos da zona rural do município de Rio Grande e também do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (Cavg) no município de Pelotas. Os ovos foram levados ao Laboratório de Virologia da UFPel, onde foram colocados em Chocadeira modelo STD da marca Brood, com capacidade para até 120 ovos com temperatura e umidade controladas (37^oC e 60%, respectivamente) e examinados através de ovoscopia no terceiro dia após o início da incubação.

Durante inspeção ao ovoscópio, 17 ovos foram descartados por não apresentarem embrião aparente, e o restante teve a câmara de ar delimitada com o auxílio de um lápis. Um sinal esférico foi feito no lado oposto onde se encontrava o embrião, visando não atingí-lo no momento da inoculação, conforme metodologia descrita por Mayr e Guerreiro (1981).

Os ovos foram mantidos na mesma posição, com a câmara de ar voltada para cima até o dia sete. O experimento foi executado em câmara de fluxo laminar, e todo o material utilizado previamente exposto à luz ultra-violeta (UV). Ao quarto dia pós incubação, os moluscos foram trocados para placas de petri estéreis,

objetivando otimizar a viabilidade das metacercárias encontradas, que seriam recentemente encistadas, aumentando com isso sua eficácia. Ao sétimo dia, as placas de petri contendo os moluscos foram transportadas até o laboratório de Virologia, onde foi executado o procedimento de inoculação.

As metacercárias foram descoladas das paredes das placas de petri com auxílio de agulhas de insulina, e depois retiradas com micropipetador 20-200 μ l para serem “lavadas”, por duas vezes em placas contendo solução salina tamponada (“phosphate buffered saline” - PBS), conforme Fig. 12.



Figura 12 – Transferência das metacercárias para placas contendo solução salina tamponada.

Após serem novamente examinados ao ovoscópio, e confirmada a viabilidade dos embriões, os ovos positivos foram expostos à UV para a desinfecção da casca, e, um a um retirados para submeterem-se ao deslocamento da câmara de ar, abrindo-se dois orifícios: o primeiro na câmara de ar propriamente dita, e o segundo na parte agora superior, no mesmo lado anteriormente assinalado, oposto ao embrião (Fig. 13).



Figura 13 - Abertura de orifício em câmara de fluxo laminar.

A técnica orienta manter o ovo em posição horizontal, a succionar o orifício onde originalmente encontra-se a câmara de ar, até sentir seu deslocamento para o local do segundo orifício, na parte agora superior do ovo, evento confirmado pelo ovoscópio. Seguindo este procedimento, foi selado o primeiro orifício com cola especial para isopor, que possui rápida secagem quando exposta ao calor, e, imediatamente após a segunda lavagem das metacercárias, cinco delas foram capturadas com uma seringa de insulina e inoculadas na membrana corioalantóide - MCA - de forma superficial através do segundo orifício do ovo.

O deslocamento correto da câmara de ar confirmava-se novamente no momento em que, após injetadas as metacercárias, não havia qualquer tipo de refluxo de líquido. Os orifícios eram então igualmente vedados com a cola de isopor e prontamente levados novamente à incubadora, onde eram mantidos em sentido horizontal, sem a “viragem” dos mesmos, evitando-se com isso que a câmara de ar voltasse à sua posição original.

A viabilidade dos embriões pós-infecção foi observada diariamente, durante sete dias, por meio da ovoscopia. Aqueles que morreram dentro das primeiras 72 horas após a infecção foram descartados.

No sétimo dia pós-inoculação, os ovos foram abertos em fluxo laminar (Fig. 14), e os embriões e seus anexos retirados das cascas para que fosse feita a inspeção em busca da presença de formas desenvolvidas de parasitas na membrana corioalantóide por exame direto a olho nu (Fig. 15), com auxílio de microscópio e lupa (Fig. 16). Depois de completa observação, os embriões e seus anexos foram armazenados em formol a 10% para análise.

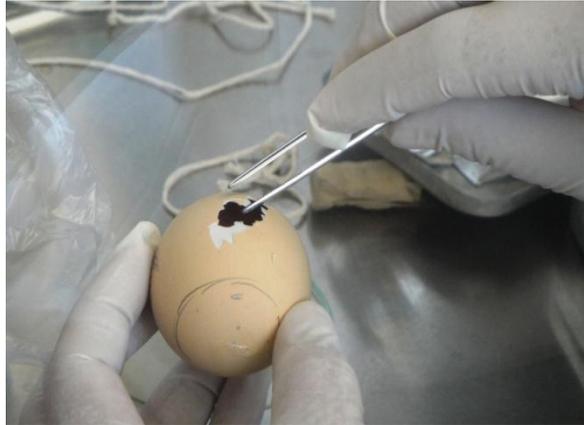


Figura 14 - Abertura dos ovos em fluxo laminar.

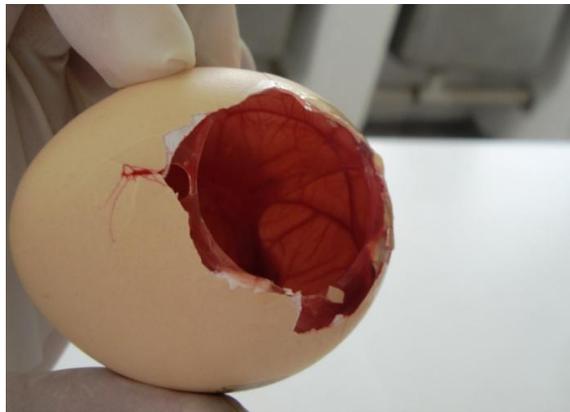


Figura 15 - Inspeção da membrana corioalantóide a olho nu.



Figura 16 - Inspeção da membrana corioalantóide com auxílio de lupa.

3.7 Pesquisa de Vetores

3.7.1 Reprodução dos Moluscos

Os moluscos utilizados durante ambos experimentos foram diariamente observados à lupa em aumento de 8X quanto à sua atividade reprodutiva.

A localização dos ovos depositados era diariamente assinalada na parte externa das placas de petri e os mesmos eram mantidos junto com os demais até o final dos experimentos.

3.7.2 Trematódeos

Da água onde os trematódeos eram mantidos, as cercárias e metacercárias encontradas, incluindo fase de encistamento, foram isoladas e analisadas à microscopia num aumento de 20x, e tiveram suas estruturas parcialmente identificadas por meio de fotomicrografia.

3.8 Frequência de Parasitismo

Objetivando a determinação da taxa percentual de parasitismo, ao final dos experimentos os moluscos foram dissecados através do método de esmagamento entre duas lâminas de vidro, de acordo com Thiengo et al. (2007). Colocados em placas de petri, foram levemente pressionados contra a placa com o auxílio de uma lâmina de vidro para que a concha se quebrasse, sem que fossem destruídos os tecidos moles (Fig. 17).



Figura 17 - Esmagamento dos moluscos entre lâminas de vidro.

Os fragmentos de concha foram retirados com uma pinça e as vísceras examinadas em aumento de 8x sob a luz de lupa, para que fossem evidenciados esporocistos ou rédias albergados nos hospedeiros (Fig.18).



Figura 18 - Dissecção dos moluscos.

4 Resultados

4.1 Procedimento das Coletas de moluscos

As maiores quantidades de *Heleobia piscium*, moluscos infestados por formas imaturas de trematódeos, na primeira e segunda coleta foram encontradas aderidas às raízes dos aguapés. Entretanto, na terceira captura a maioria dos organismos pesquisados encontrava-se no material sedimentado, que foi removido e cuidadosamente analisado quanto à presença de gastrópodes.

4.2 Mensuração de Parâmetros Físico-químicos da água

Os valores mensurados das variáveis físico-químicas referentes às amostras de águas da propriedade rural utilizada, praia do Cassino e Lago Polegar (FURG), estão contidos na tabela 2, assim como suas respectivas coordenadas geográficas.

A salinidade da água manteve-se em valores próximos à zero em todos os locais coletados, exceto na praia do Cassino, onde apresentou 30‰, condizendo com à expectativa do estudo. Os valores de pH na Propriedade em Arroio Grande variaram entre 6,7 e 7,74, chegando a 7,87 na Praia do Cassino e 8,6 no Lago Polegar. Os teores de oxigênio dissolvido foram maiores em janeiro (12,64mg/L), alcançando 6,6mg/L em novembro do mesmo ano. A condutividade da água variou entre 10,6 e 12,1- $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ na propriedade em Arroio Grande, e, na Praia do Cassino apresentou 48,5- $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. A temperatura da água apresentou-se mais baixa em novembro (23,3°C) e mais elevada em janeiro (28,2°C).

Tabela 2. Variáveis físico-químicas das amostras de água coletadas nos pontos do estudo na Praia do Cassino, Lago Polegar e Arroio Grande, no ano de 2011.

Data	04/01/2011	04/01/2011	04/01/2011	24/01/2011	25/11/2011
Pontos de Coleta	Praia do Cassino	Lago Polegar	Arroio Grande 1	Arroio Grande 2	Arroio Grande 3
Salinidade (‰)	30	PZ*	PZ**	PZ**	PZ**
pH	7,87	8,6	6,7	7,57	7.74
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	NM*	13,3	NM*	12,64	6,6
Condutividade (-µS.cm⁻¹)	48,5	10	10,6	12,1	11,6
Temperatura da água (°C)	NM*	25	NM*	28,2	23,3
Coordenadas Geográficas	S 32°11'.47"	S 32° 04'.67"	S 32° 93' 33"	S 32° 93' 33"	S 32° 93' 33"
	W52°09'.94"	W 52°10'.14"	W 52° 46' 83"	W 52° 46' 83"	W 52° 46' 83"

*NM – NÃO MENSURADO

**PZ – PRÓXIMA A ZERO

4.3 Processamento das Amostras

Os exemplares de Hidrobídeos (Fig. 19) coletados em 24/01/11 e 25/11/11, utilizados durante o estudo foram classificados em duas diferentes oportunidades, distantes nove meses uma da outra, conforme descrito na Tabela 3, pelo PhD Luiz Ricardo L. Simone¹, de acordo com seu livro “Land and Freshwater Molluscs of Brazil”.



Figura 19 – Exemplar de *Heleobia piscium*.

FONTE: SIMONE, 2006, p. 91.

¹ Pós-doutorado pelo Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (2002) e no Field Museum of Natural History em Chicago, USA (2004), professor titular da Universidade de São Paulo, Museu de Zoologia

Tabela 3. Caracterização dos exemplares de Hidrobídeos coletados em Arroio Grande.

Data de envio	LOTE	ESPÉCIE	TOMBO
24/02/11	1	<i>Heleobia piscium</i>	MZSP 102729
24/02/11	2	<i>Heleobia piscium</i>	MZSP 102730
24/02/11	3	<i>Heleobia piscium</i>	MZSP 102732
25/11/11	1 e 3	<i>Heleobia piscium</i>	MZSP 102728
25/11/11	2	<i>Heleobia sp.</i>	MZSP 102722
25/11/11	2	<i>Heleobia piscium</i>	MZSP 102727

Os exemplares enviados foram classificados como sendo pertencentes à espécie *Heleobia piscium*, por sua vez pertencentes ao Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Prosobranchia e Família Hydrobiidae.

Como principais características morfológicas, os gastrópodes apresentavam em média 0,5cm de comprimento, conchas em espiral, de coloração amarelo castanho (marrom).

4.4 Fator Salinidade

Ao segundo dia de experimento, foram detectadas as mortes de um molusco no controle de água doce, e outro na diluição de 8‰, sendo que, ao final do experimento, a média da mortalidade dos gastrópodes correspondeu a 5% em água doce, 7,15% em 5‰, 10,72% em 8‰, 14,29% em 10‰, 21,43% em 12‰, 75% em 20‰, e 100% em 30‰. Na concentração de 30‰ as mortes dos gastrópodes ocorreram no primeiro dia de experimento, enquanto na concentração de 20‰ registrou-se mortalidade significativa até o sétimo dia. Os demais níveis de salinidade parecem não ter influenciado a sobrevivência dos moluscos.

Foi constatado que, do controle doce até 10‰ os caracóis mantiveram sua homeostasia, e que, nas concentrações de 12‰ houve um desconforto aparente, com 20‰ observou-se morte quase imediata. O aumento de mortes de moluscos foi diretamente proporcional ao aumento na salinidade da água, e a maior taxa de emissão de cercárias ocorreu nas proporções de 8‰ a 12‰.

Cercárias foram emitidas continuamente até a concentração de 12‰, enquanto que, em 20‰ alguns exemplares sobreviveram, porém não apresentaram emissão significativa de trematódeos.

A partir do décimo dia de experimento os gastrópodes das placas com salinidade entre 5‰ e 12‰ iniciaram a oviposição, que terminou seu ciclo 20 dias após, quando ocorreu a eclosão dos ovos.

4.5 Cultivo de Trematódeos em Membrana Corioalantóide (MCA)

Ao todo, foram inoculados 18 ovos, dentre os quais, no decorrer dos sete dias posteriores à inoculação, oito tiveram contaminação. Os demais, no 14^o dia após incubação, ou seja, sétimo dia pós-inoculação foram inspecionados novamente antes de serem abertos.

Verificou-se, por meio da ovoscopia diária, que alguns embriões não resistiram à inoculação com as metacercárias no decorrer dos sete dias após o procedimento. Aqueles embriões que sobreviveram após este período, correspondendo a 15 dias de vida, foram abertos e neles verificou-se a ausência dos trematódeos na MCA.

O interior dos ovos foi inspecionado primeiramente a olho nu através da janela aberta, e, depois à lupa. Quebrou-se cuidadosamente a casca dos ovos para que os embriões fossem retirados com uma pinça e desprezados, e também visando a integridade da membrana para que pudesse ser analisada em placas estéreis à lupa. Estruturas semelhantes a metacercárias aderidas a um líquido espesso e acinzentado, sugerindo ser o veículo usado na implantação foram encontradas quando as membranas, fixadas em formol 10% foram observadas à lupa.

4.6 Pesquisa de Vetores

4.6.1 Reprodução dos Moluscos

Durante o experimento da salinidade, após 10 dias desde seu início, os moluscos iniciaram a depositar ovos nas conchas dos demais, e também no fundo

ou paredes das placas de petri (Fig. 20).



Figura 20 – Desenvolvimento de embrião de *Helicoboa piscium*, estágio de formação de blástula.

Após a coleta de 25/11/11, foi observado durante a triagem dos moluscos, que muitos possuíam ovos aderidos à superfície de suas conchas (Fig. 21). A oviposição dos gastrópodes continuou até o final do estudo.

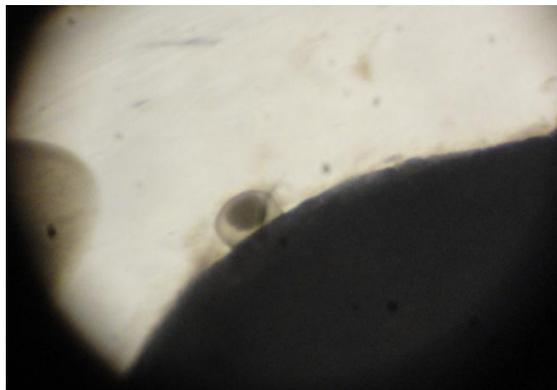


Figura 21 - Adesão de ovos de *Helicoboa piscium* sob as conchas dos demais indivíduos pertencentes à mesma coleta em Arroio Grande.

4.6.2 Trematódeos

Entre as placas observadas, apenas uma das pertencentes ao experimento da salinidade apresentou diariamente cercárias com cauda bifurcada - furca curta, Travassos (1950) - de aspecto incolor (Fig. 22). Quanto à sua movimentação, permaneciam na superfície da água da placa, com a cauda voltada para baixo, e,

com movimentos em espiral, deslocavam-se até o fundo de forma longitudinal, quando aderiam-se à placa através de sua ventosa oral, movendo a cauda vigorosamente, dificultando sua captura. O encistamento destas cercárias não foi observado ao decorrer do estudo.



Figura 22 - Cercária apresentando cauda bifurcada.

Durante o experimento do cultivo de trematódeos em MCA, foram observadas numa das placas, como apresentado na Fig. 23, várias colônias de cercárias radiadas, que se movimentavam juntas, unidas pela cauda. Não foi observado o encistamento deste tipo de cercária.



Figura 23- Formação de cercárias unidas pelas caudas (formato radiado).

Dois tipos de cercárias foram rotineiramente observados nadando nas placas de petri, conforme Fig. 24. Um dos tipos apresentava-se fortemente pigmentado e com movimentos vigorosos de distensão e contração, fazendo com que seu corpo variasse o formato, de arredondado a oval-alongado. A outra forma frequentemente encontrada nas placas era incolor, mesmo padrão de movimento,

apenas de tamanho menor que a anteriormente citada, e apresentando-se habitualmente em maior quantidade.



Figura 24- Cercárias encontradas rotineiramente nas placas de petri.

A identificação de suas estruturas foi feita de forma parcial, destacando-se o corpo pigmentado, representando 445,5 μ m de comprimento por 248,2 μ m de largura em média, cauda longa não bifurcada e maior que o corpo, ventosas oral e ventral bem desenvolvidas, duas ou três manchas oclares fortemente pigmentadas, e sem estilete aparente (Figs. 25a e 25b).

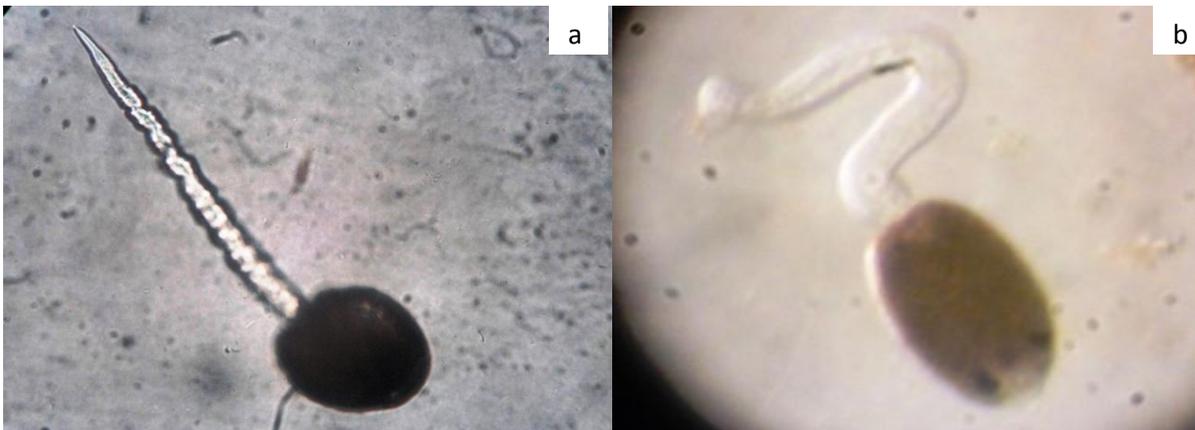


Figura 25- Cercária pigmentada (a e b) e manchas oclares aparentes (b), emitidas por *Heleobia piscium*.

A maioria das cercárias encistava no fundo e, principalmente nas paredes laterais das placas de petri, comumente na borda da água, dificultando assim sua posterior retirada. Na fase de encistamento, percebeu-se a fixação das cercárias à

placa de petri através de uma ventosa situada na parte ventral de seu corpo. Durante este período, a cercária promovia movimentos de contração e distensão do corpo, agitando a cauda vigorosamente, até que esta se desprendesse e continuasse, mesmo solta, por alguns instantes ainda produzindo movimentos involuntários (Fig. 26).



Figura 26- Cercária em fase de encistamento, encontrada em placa de petri.

As metacercárias apresentavam-se envolvidas por uma parede constituída por duas camadas: uma mais externa e outra interna, sendo que a última envolvia a metacercária propriamente dita. Ocelos foram observados, assim como corpo com aspecto granular de coloração marrom escuro. Mesmo após algumas horas desde seu encistamento, ainda mantinham o movimento no interior do cisto (Figs. 27a e 27b).

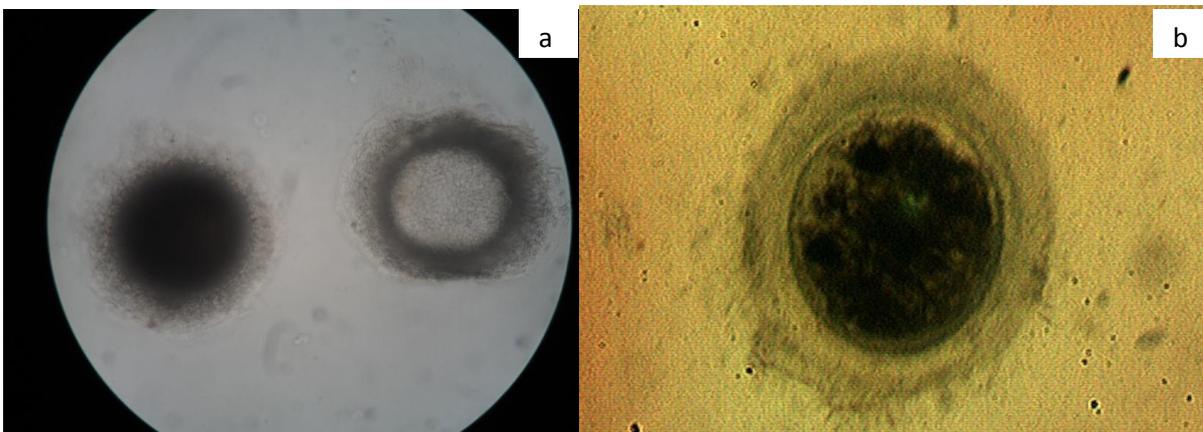


Figura 27- Estruturas das metacercárias: camadas (a e b) e ocelos aparentes (b).

Metacercárias foram observadas à lupa em aumento de 8x e ao microscópio em 10 e 20x. Através de fotografia foi registrada sua imagem com o Microscópio Olympus CX41 apoiada pelo programa “Motic Images Plus” (Fig. 28), e suas dimensões mensuradas, revelando as proporções de medida de membrana externa (392,5µm) e medida de membrana interna (219,6µm).

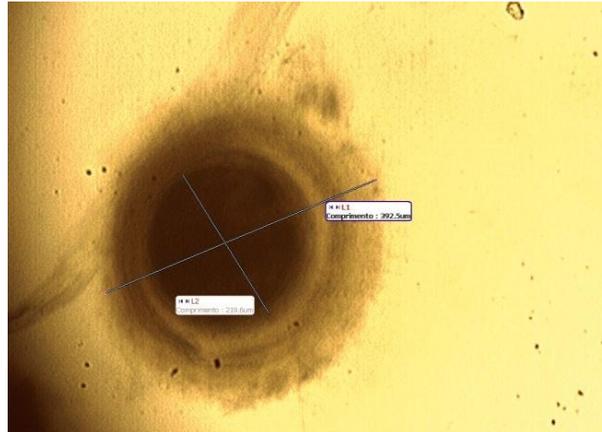


Figura 28. Medição das camadas da metacercária

4.7 Frequência de Parasitismo

A partir do esmagamento das conchas dos caramujos foram obtidas cercárias livres em vários estágios de desenvolvimento: rédias de coloração clara, em diferentes fases foram observadas, tornando possível visualizar internamente a presença de estruturas germinativas. Rédias maiores apresentaram junto à região anterior, a presença de cercárias em formação sem pigmentação escura, podendo ser observado o corpo e curta cauda.

Foram dissecados 962 caramujos da espécie *Heleobia piscium*, objetivando a avaliação da frequência de parasitismo, obtendo-se destes, 60 indivíduos infectados, representando uma frequência de 6,24% de trematódeos em fase de cercária.

5 Discussão

5.1 Procedimento das Coletas de Moluscos

As plantas aquáticas habitualmente encontradas no Arroio Parapó tiveram seu desenvolvimento prejudicado devido à forte estiagem registrada no Rio Grande do Sul durante o ano de 2011 (Figs. 29a, 29b e 29c), quando o município de Arroio Grande teve situação de emergência reconhecida em 16 de março do mesmo ano (SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA CIVIL).

Portanto, a última coleta caracterizou-se principalmente pela dificuldade em sua execução (Fig. 29d), uma vez que, conforme Thiengo et al. (2007) as coleções hídricas aparentemente secas, cobertas por camadas de barro (crostas), tornaram mais lenta a coleta, já que as amostras encontravam-se enterradas no sedimento.



Figura 29- Local da coleta com desenvolvimento prejudicado dos aguapés em três períodos: primeira coleta (a); segunda coleta (b); terceira coleta (c). Dificuldade na obtenção das amostras (d).

Dutra (1988) revelou em seus resultados ter encontrado um número reduzido de jovens possivelmente devido à não visualização dos mesmos durante a coleta, portanto, o sistema de coleta de substrato utilizado em nosso estudo, peneirando-o no local da coleta e também em laboratório facilitou a captura de indivíduos de diversos tamanhos.

O transporte das amostras foi realizado com sucesso mediante a submersão dos moluscos em água, contrariando a técnica de Thiengo et al. (2007), que não utilizava água para o transporte, uma vez que afirmava que algumas espécies não sobreviviam submersos à água.

5.2 Mensuração de Parâmetros Físico-químicos da água

De acordo com os resultados obtidos durante a análise das águas utilizadas no estudo, o Arroio Parapó, ponto de onde foram obtidos os caracóis *H. piscium* teve pH variável ao redor da neutralidade, destacando-se os variáveis índices de oxigenação. Macrófitas aquáticas flutuantes (Fig. 30), segundo Roquete Pinto et al. (1987) são responsáveis pela transferência de oxigênio do ar para o corpo hídrico através de sua parte aérea, oxigenando dessa forma a massa de água. Por este motivo, justifica-se o baixo teor de oxigênio dissolvido observado numa das coletas (novembro de 2011), uma vez que nesta ocasião os aguapés encontravam-se praticamente ausentes devido à estiagem ocorrida na região durante o ano.



Figura 30 - Macrófitas aquáticas flutuantes *Eichornea spp* (aguapés).

Quando comparadas as propriedades físico-químicas das águas, de acordo com padrões estabelecidos por Thiengo et al. (2007), percebe-se que as amostras analisadas durante o estudo estiveram, em geral dentro dos níveis de tolerância mínima e máxima habitadas pela espécie *Biomphalaria glabrata* [Condutividade ($\mu\text{mho/cm}$): 117 a 2000+; Saturação de Oxigênio (%): 0 a 86,4; Temperatura ($^{\circ}\text{C}$): 18 a 41 e pH: 5,6 a 9,1].

5.3 Processamento das Amostras

Coimbra (2003) testou durante o desenvolvimento de seu trabalho amostras de diferentes espécies de caramujos de água doce encontrados em regiões endêmicas à EME. De acordo com seus resultados, os moluscos encontrados em abundância na região eram considerados potenciais vetores para EME, classificados como *Heleobia piscium*, *Heleobia parchappei* e *Heleobia davisii*, condizendo com a identificação dos exemplares feita durante o presente estudo, que caracterizou os gastrópodes como *Heleobia piscium*.

5.4 Fator Salinidade

Discordando de Lima (2010), que utilizou água destilada na diluição de água salgada em seu experimento, durante o presente estudo, a diluição da água marinha foi feita com água doce, proveniente do local da coleta, até que a concentração desejada fosse obtida. As mortes ocorridas no segundo dia de experimento, aparentemente foram ocasionadas por fatores independentes ao estudo.

Wu & Woo (1983) sustentam que os limites letais de salinidade podem ser subestimados quando determinados através de testes agudos, já que, embora as variações de salinidade possam ser rápidas na natureza, elas nunca são instantâneas como em um teste de agudo simulado “*in vitro*”. Sabe-se que a salinidade pode cair de 35 para 0‰ em apenas 24 horas no estuário da Lagoa dos Patos (CASTELLO; MOLLER, 1978), intervalo este que, apesar de pequeno, pode permitir uma sobrevivência mais elevada do que quando a transferência é imediata.

A contínua ovoposição dos gastrópodes nas placas com salinidade entre 5‰ e 12‰ a partir do décimo dia de experimento evidenciou a adaptabilidade dos moluscos aos diferentes níveis salinos.

Os resultados obtidos até o momento indicam que espécies de *Heleobia*, comumente encontradas em ambientes dulceaquícolas, podem ser consideradas hospedeiras intermediárias dos trematódeos portadores de *Neorickettsia risticii*, agente causador da EME em cavalos, também em ambientes costeiros que apresentem salinidade variável até 12‰.

5.5 Cultivo de trematódeos em Membrana Corioalantóide (MCA)

A capacidade de infectividade das metacercárias depende de seu tempo de armazenamento, sendo menor quando as metacercárias são mais velhas (VALERO; MAS-COMA, 2000; VALERO et al., 2001). Por essa razão, durante o experimento os moluscos foram trocados para placas novas dois dias antes da inoculação dos trematódeos em MCA, garantindo dessa maneira, o pouco tempo de encistamento das metacercárias contidas nas placas, aumentando as chances de sua viabilidade.

Os ovos não foram rotacionados durante algum tempo antecedente ao experimento, garantindo que o corioalantóide ficasse abaixo da parte mais alta da superfície do ovo conforme proposto por Irwin (1988).

Foram utilizadas lâmpadas ultravioletas durante os procedimentos laboratoriais, considerada uma alternativa para evitar-se a contaminação das amostras, uma vez que, de acordo com Kornfeld et al. (2001), possuem ação germicida. O embrião, por sua vez, protegido pela casca e membranas, promove um ambiente naturalmente estéril, adequado ao experimento. Se a esterilidade for inadequada devido à ausência de assepsia durante a manipulação com o embrião, os resultados serão comprometidos devido à contaminação do ovo (FRIED, 1991).

Dentre os possíveis fatores responsáveis pelos resultados não satisfatórios durante a execução da técnica escolhida, cita-se o deslocamento das metacercárias junto com a solução inoculada em direção à membrana da casca, devido aos movimentos do embrião, inviabilizando sua recuperação, conforme Pekkarinen (1993) constatou em seus estudos. Outra razão poderia ser a temperatura de

incubação dos ovos após sua inoculação, que, durante o presente experimento foi de 37^oC, corroborando com a literatura de Fried (1962), contrariando Irwin (1988), que utilizava 41^oC.

Estudos com cistos de *Ribeiroia ondatrae* foram realizados com a excitação mecânica, na qual as larvas foram liberadas com o amparo de agulhas. No entanto, pode resultar em danos à larva durante o procedimento, se este não for adequadamente executado. De acordo com revisão feita por Fried (1994), a habilidade de obter metacercárias quimicamente excitadas pode preceder novos estudos e descobertas sobre a fisiologia, bioquímica e imunologia dos trematódeos digenéticos.

5.6 Pesquisa de Vetores

5.6.1 Moluscos

Durante a adequação do método de manutenção dos moluscos “*in vitro*”, foram detectadas por algumas vezes fugas de exemplares das placas de petri. Portanto, no experimento do “Fator Salinidade”, uma tampa feita de tela foi colocada sobre o aquário, corroborando com Thiengo et al. (2007), que indica seu uso, uma vez que permite melhor aeração, evitando fuga e exposição aos insetos.

No decorrer do estudo-piloto, através de medições diárias de salinidade nas placas de petri, foi observada a necessidade da troca total de água diariamente nas devidas concentrações salinas, já que as diluições sofriam alterações de um dia para o outro devido à evaporação da água, que tornava o meio ainda mais salino, diminuindo a confiabilidade dos resultados.

A limpeza das placas era feita duas vezes por semana, e a água acrescentada diariamente. Thiengo et al. (2007) afirmam que a substituição da água depende das condições de criação, influenciada pela mortalidade dos moluscos, excesso de excrementos na água, ausência de substrato, presença excessiva de alimento ou alta turbidez.

De acordo com Leahy (1984), o estudo da biologia (destacando-se o crescimento e a reprodução) e comportamento de moluscos em laboratório são

importantes para o desenvolvimento de suas técnicas de criação e manejo, com aplicação em trabalhos experimentais com parasitos.

5.6.1.1 Reprodução dos moluscos

A ausência de oviposição dos gastrópodes frente à infestação parasitária é apontada por Thiengo et al. (2007). Porém, apesar de parasitados, a desova foi detectada durante ambos experimentos, preferencialmente sobre as conchas de outros espécimes vivos ou mesmo nas paredes das placas de petri ou moluscos mortos (THIENGO et al. 2007).

A presença de cápsulas de ovos aderidas às conchas de alguns moluscos, comportamento típico de Hidrobídeos, segundo Neves; Valentin e Figueiredo (2010) e foi utilizada como evidência indireta da atividade reprodutiva.

5.6.2 Trematódeos

De acordo com Travassos (1950), as principais famílias de cercárias de cauda bifurcada são *Strigeidae* Railliet, 1919 e *Schistosomatidae* Looss, 1899. Desde a descrição das dicranocercárias (cercárias de cauda bifurcada ou furcocercárias) feita por Lutz (1934), ressalta-se a importância médico-veterinária desses tipos de larvas, uma vez que a cercária de *Schistosoma mansoni*, segundo Thiengo et al (2007) trata-se da forma infectante para hospedeiros vertebrados, principalmente o homem da Esquistossomose. A morfologia das cercárias com caudas bífidas encontradas durante o estudo é compatível com a descrita por Thiengo et al (2007), com as seguintes características: tamanho aproximado de 500µm composto de corpo ovalado, cauda cilíndrica e alongada bifurcando-se na extremidade final. Também apresenta duas ventosas (oral e ventral ou acetábulo), glândulas de adesão e penetração e aparelho excretor.

As colônias de cercárias radiadas, que permaneciam constantemente unidas pela cauda, formando uma estrutura semelhante à uma roseta, encontradas numa das placas do experimento de Inoculação de trematódeos em MCA, segundo classificação morfológica encontrada na literatura de Travassos (1950), tratavam-se

de Zygo cercárias (AMATO², comunicação pessoal, 2011).

Claus (1880) utilizou o termo “Rattenkönig”, literalmente traduzido como “Rei dos ratos” ao referir-se a uma nova cercária que ficava ligada as outras por meio de sua extremidade da cauda. Foi primeiramente observado por ele este tipo de comportamento em cercárias marinhas, coletadas perto de Nápolis, Itália. Posteriormente este digenético foi nomeado como *Cercaria clausii*, por Monticelli (1888), quando ocorreu a primeira descrição de uma *Zygo cercous cercaria*. De acordo com Becker & Kemper (1964), um dos significados para a palavra “Rattenkönig” refere-se ao comportamento peculiar dos ratos pretos “*Rattus rattus*”, que, quando os ratos jovens ainda estão no ninho, ou mesmo quando vários indivíduos descansam juntos, suas caudas acidentalmente formam um nó, similar a uma roseta. Portanto, os mesmos autores, em 1994 afirmaram que as Zygo cercárias tem o hábito de unir-se em centenas através de suas caudas, formando elegantes sociedades que nadam como se fossem o mesmo indivíduo. O comportamento de agregar-se é tão raro quanto o toque entre cercárias, comportamento conhecido apenas em 11 tipos de cercárias.

A única zygo cercária de água doce já descrita trata-se, portanto, da *gorgonocephala*, de acordo com Ward (1916), que descreveu essa espécie através de uma única colônia encontrada no lago Eric, próximo à Put-in-Bay, Ohio. Dronen (1973) demonstrou que peixes ciprinídeos poderiam servir como segundo hospedeiro intermediário através da ingestão de agregações de cercárias.

Corroborando com Saad (1994), as cercárias parapleurolophocercous foram encontradas, em sua maioria, nadando no fundo das placas de petri. Emergiam de moluscos infectados durante a noite e o dia, mas, o mais comum era durante a manhã. Apresentavam sensibilidade à luz, e não se mostravam boas nadadoras, passando por freqüentes fases de descanso, quando seus corpos ficavam curvados, atingindo a característica de forma de pipa, concordando com o estudo de Coimbra (2003), que teve suas cercárias da mesma forma identificadas. Os movimentos de mergulho eram observados, e na ausência do segundo hospedeiro intermediário, as cercárias viviam entre 36-48 horas.

Concordando com Veitenheimer-Mendes (1989), cercárias imaturas vivas

² Doutorado em Parasitologia - University Of Nebraska, Lincoln (1979), Professora titular do Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

foram encontradas em vários graus de desenvolvimento, e a cor escura de algumas dificultou a perfeita visualização das estruturas internas. Observou-se que, quanto mais imaturas, menor a quantidade de pigmentação, característica das cercárias maduras, juntamente com a presença de ocelos. O corpo das cercárias maduras apresentava-se, portanto de cor marrom escura em virtude da pigmentação e do grande número de células cistogênicas.

5.7 Frequência de Parasitismo

A presença de trematódeos (fases de rédias, cercárias e metacercárias) nos moluscos dissecados durante o estudo foi verificada com frequência média de 6,24%, superando os resultados de 4% de parasitismo em *Heleobia* spp. registrado por Gonçalves et al., (2009) e também por Gonçalves et al., (2010), que registrou a presença dos trematódeos em 1,2% dos caracóis analisados. Os gastrópodes utilizados eram provenientes do mesmo local de coleta. Uma frequência de 3,5% de positividade de caramujos do gênero *Juga* para o DNA da *N. risticii* foi averiguada por Barlough et al., (1998).

O resultado indica que houve um aumento na frequência de emissão de trematódeos por *Heleobia* spp. em área considerada endêmica à Ehrlichiose Monocítica Equina, em propriedade rural de Arroio Grande, as margens da Lagoa Mirim, cujas características geográficas são compatíveis aquelas necessárias ao desenvolvimento da EME.

6 Conclusões

O presente estudo permite afirmar que:

- Moluscos da espécie *Heleobia piscium* são encontrados na região de Arroio Grande, em área endêmica à Ehrlichiose Monocítica Equina;
- Quando analisados através da dissecação quanto à infestação parasitária, 6,24% dos gastrópodes mostrou-se portador de trematódeos;
- Quando submetidos à variação controlada de salinidade, os moluscos emitiram cercárias até a concentração de 12‰ de NaCl.
- A reprodução dos moluscos ocorreu durante o experimento da salinidade, entre 5‰ e 12‰, apontando parcialmente a adaptabilidade da espécie a ambientes estuarinos;
- Devido à alta especificidade da técnica da inoculação em membrana corioalantóide em ovos de galinha embrionados, o parasita estudado, que ainda não possui descrição de sua forma adulta, apenas irá se desenvolver em meios específicos à sua espécie. O tempo e temperatura de incubação dos trematódeos em membrana corioalantóide, possivelmente não foram adequados ao trematódeo analisado.

Portanto, o estudo da influência da salinidade sobre *H. piscium* deve ser aprofundado, buscando avaliar seus efeitos sobre o crescimento dessa espécie, de modo a determinar o potencial do seu cultivo em ambientes de salinidade variável. Com uma maior quantidade de repetições, assim como o teste de outras técnicas, provavelmente será possível obter-se a forma adulta do trematódeo, quando inoculado em membrana corioalantóide de ovos de galinha. Esta pesquisa serviu para estimular o desenvolvimento de procedimentos que abordem, simultaneamente, o estudo do parasito e seu hospedeiro (experimental ou natural) tanto em sistemas “*in vitro*” quanto “*in vivo*”.

7 Referências

AGÊNCIA DA LAGOA MIRIM (ALM). **Bacia da Lagoa Mirim**. Universidade Federal de Pelotas. Disponível em: <http://alm.bolsacontinental.com>. Acesso em: 17 jan. 2012.

AGUIRRE, L.; FARINATI, E. A. **Aspectos sistematicos, de distribuicion y paleoambientales de *Littoridina australis* (D'Orbigny, 1835) (Mesogastropoda) en el Cuaternario marino de Argentina (Sudamerica)**. Geobios 33:569-597, 2000.

ALBERTONI, E. F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F. A. **Natural diet of three species of shrimp in a tropical coastal lagoon**. Braz. Arch. Biol. Technol., v. 46, p. 395-403, 2003.

ALMEIDA, J. L.; MEINERZ, A. L.; CURCIO, B. R.; MOLLER, G.; COIMBRA, H. S.; SCHUCH, L. F. D.; MEIRELES, M. **Erliquiose monocítica eqüina na região norte do Rio Grande do Sul**. In: CIC, 10., Laboratório de Pesquisa, 9., Encontro do Pós graduação, 3., Pelotas, RS, 2001. Resumo 1648, 2001.

ANDERSON, A. **Intertidal activity breeding and the floating habit of *Hydrobia ulvae* in the Ythan Estuary**. J. mar. biol. Assoc. U. K., v. 51, p. 423-437, 1971.

ARAD, Z. **Water relations and resistance to dessiccation in three Israeli desert land snails, *Eremina desertorum*, *Euchondrus desertorum* and *Euchondrus albulus***. J. Arid Environm. 24: 387-395, 1993.

ATWILL, E. R.; MOHAMMED, H. O.; DUBOVI, E.; LOPES, J. **Retrospective evaluation of factors associated with the risk of seropositivity to *Ehrlichia risticii* in horses in New York state**. Am. J. Vet. Res. 53 (10):1931-1934, 1992.

ATWILL, E. R.; MOHAMMED, H. O.; RUA-DOMENECH, R. **Geographical variation of seropositivity to *Ehrlichia risticii* (Equine monocytic ehrlichiosis) of horses in New York State**. Equine Vet. J. 26 (2):143-147, 1994.

BAPTISTA, J. R. **Flutuações diárias e horárias dos elementos dissolvidos, material em suspensão e características físicas da água na parte sul do estuário da Lagoa dos Patos e praia do Cassino**. Tese de Mestrado, Univ Rio Grande, Brasil, 1984.

BARLOUGH, J. E.; REUBEL, G. H.; MADIGAN, J. E.; VREDEVOE, L. K.; MILLER, P. E.; RIKIHISA, Y. **Detection of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse**

Fever, in Freshwater Stream Snails (Pleuroceridae: Juga spp) from Northern California. Applied and Environmental Microbiology, v.64, p.2888-2893, 1998.

BARREIRA, C. A. R.; ARAÚJO, M. L. R. **Ciclo Reprodutivo de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil.** Boletim do Instituto de Pesca, 31 (1):9-20, 2005.

BASTOS, E. O.; PERAZZOLO, M.; BAPTISTA, J. M. R. **Variação do número de estômatos e micropêlos em *Paspalum vaginatum* Sw. em relação às condições abióticas numa marisma do estuário da Lagoa dos Patos, RS-Brasil.** Acta Bot Brasil (S Paulo) 6(2):105-117, 1993.

BAUMGARTEN, M. G. Z.; NIENCHESKI, L. F. **O estuário da Laguna dos Patos: variações de alguns parâmetros físico-químicos da água e metais associados ao material em suspensão.** Ciência e Cultura, SP, v.42, n.5/6, p.390-396, 1990.

BEMVENUTI, C. E.; NETTO, S. A. **Distribution and seasonal patterns of the sublittoral benthic macrofauna of Patos Lagoon (South Brazil).** Revista Brasileira de Biologia 58(9) (no prelo), 1998.

BEMVENUTI, C. E.; CAPÍTOLI, R. R.; GIANUCA, N.M. **Estudos de ecologia bentônica na região estuarial da Lagoa dos Patos. II. Distribuição quantitativa do macrobentos infralitoral.** Atlântica, Rio Grande. 3: 23-32, 1978.

BEMVENUTI C. E.; CATTANEO, S. A.; NETTO, S. A. **Características estruturais da macrofauna bentônica em dois pontos da região estuarial da Lagoa dos Patos, RS - Brasil.** Atlântica. Rio Grande. 14: 5-28, 1992.

BEMVENUTI, C. E.. **In: Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil.** Editado por Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P. Rio Grande: Ecoscienza – 341 p., 1998.

BELTRAME, L. F. S.; TUCCI, C. E. M. **Estudo para a avaliação e gerenciamento da disponibilidade hídrica da bacia da Lagoa Mirim.** Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Univ Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Vol 1, 128p,1998.

BEZERRA, J. C. B.; KEMPER, A.; BECKER, W. **Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (6): 779-784, 1999.

BONILHA, L. E.; ASMUS, M. L. **Modelo ecológico do fitoplâncton e zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos, RS.** Publ Acad Ciências Est (S Paulo) 87(1):347-362, 1994.

BOUCHET, P.; GARGOMUNY, O. **Action plan formulation for molluscan conservation: getting the facts together for a global perspective.** In: **Moluscan Conservation: A strategy for the 21 century.** Journal of Conchology (Special Publ.), v.2: p. 45-49, 1998.

- BREIDER, M. A.; HENTON, J. E. **Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac Horse Fever)**. Equine Practice, v.9, p.20-24, 1987.
- BYONG-SEOL, S. **Comparative growth and development of the metacercariae of *Fibricola seoulensis* (Trematoda: Diplostomidae) in vitro, in vivo and on the chick chorioallantois**. Department of Parasitology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea. The Korean Journal of Parasitology, vol. 27 (4): p. 231-248, 1989.
- CASTELLO, J. P.; MOLLER, O. O. **On the relationship between rainfall and shrimp production in the estuary of the Patos Lagoon (Rio Grande do Sul, Brazil)**. Atlântica, Rio Grande, v.3, p.67-74, 1978.
- CATALDO, D.; COLOMBRO, J. C.; BOLTOVSKOY, D.; BILOS, C.; LANDONI, P. **Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles**. Environmental Pollution, v.112: p.379-389, 2001.
- CAZZANIGA, N. J. **Estudios bioecológicos de gasterópodos dulciacuícolas relacionados con la invasión de canales por malezas acuáticas**. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. [Tesis Doctoral, N° 393], 169 p. 1981.
- CHAPPELL, L. H. **Physiology of Parasites**. 3rd ed. Glasgow and London, UK. Blackie, 220 p, 1980.
- CHOMENKO, L. A.; SCHAFER, A. **Interpretação biogeográfica da distribuição do gênero *Littoridina* (Hydrobiidae) nas lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil**. Amazoniana (Kiel) 9(1):127-146 In: Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Editado por Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P. Rio Grande: Ecoscientia – 341 p., 1998.
- COIMBRA, H. S.; SCHUCH, L. F.; RIET-CORREA, F.; CURCIO, B. R.; RAFFI, M. B.; DELLAGOSTIN, O.; MELLO, D. F. M.; HAAG, R. **Diarréia em eqüinos causada por *Ehrlichia risticii* no Sul do Brasil**. Anais XIV Congresso Estadual de Medicina Veterinária, II Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, Gramado, RS, vol.1, p.200, 1999.
- COIMBRA, H. S. **Erliquiose monocítica eqüina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 49p., 2003.
- COIMBRA, H. S.; SCHUCH, L. F. D.; VEITENHEIMER-MENDES, I. L.; MEIRELES, M. C. A. ***Neorickettsia (ehrlichia) risticii* no sul do brasil: *Heleobia* spp. (mollusca: Hydrobilidae) e *Parapleurolophocecous cercariae* (trematoda: digenea) como possíveis vetores**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.3, p.325-329, jul./set., 2005.

COIMBRA, H. S.; FERNANDES, C.; SOARES, M. P.; MEIRELES, M. C. A.; RADAMES, R.; SCHUCH, L. F. D. **Erliquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: Aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 26, n. 2, p. 97-101, 2006.

COLLING, L. A.; BEMVENUTI, C. E.; GANDRA, M. S. **Seasonal variability on the structure of sublittoral macrozoobenthic association in the Patos Lagoon estuary, southern Brazil**. Iheringia, Ser. Zool., Porto Alegre, 97(3): 1-6, 2007.

CORDES, D. O.; PERRY, B. D.; RIKIHISA, Y.; CHICKERING, W. R. **Enterocolitis caused by *Ehrlichia* sp. in the horse (Potomac horse fever)**. Vet. Pathol. 23:471-477, 1986.

COMBRINCK, C.; VAN EEDEN, J. A. **The influence of the substratum on population increase and habitat selection by *Lymnaea natalensis* KRS. and *Bulinus (B.) tropicus* (KRS) (Mollusca: Basommatophora)**. Natuurwetenskappe 24:3 12-320, 1975.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução N^o 357 do CONAMA**. Brasília, 2005.

DARRIGRAN, G. A. **Distribución de tres especies del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Gastropoda, Hydrobiidae) en el litoral argentino del Río de la Plata y arroyos afluentes**. Porto Alegre. Iheringia, Sér. Zool., v. 78: p. 3-8, 1995.

DAVIS, G. M.; MAZURKIEWICAZN, M.; MANDRACCHIA, D. M. **Spurwinkia: Morphology, systematics, and ecology of a new genus of North American marshland Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda)**. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 134:143-177, 1982.

D'INCAO, F.; RUFFINO, M. L.; SILVA, K. G.; BRAGA, A. C. **Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda:Grapsidae) to salt marsh environmental variations**. J Exp Mar Biol Ecol 161:179-188, 1992.

DE FRANCESCO, C. G.; ISLA, F. I. **Distribution and Abundance of Hydrobiid Snails in a Mixed Estuary and a Coastal Lagoon, Argentina** Estuaries v. 26 (3): p. 790-797, 2003.

DE FRANCESCO, C. G.; ISLA, F. I. **Reproductive period and growth rate of the freshwater snail *Heleobia piscium* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda: Rissoidea) in a shallow brackish habitat (Buenos Aires province, Argentina)**. Malac, vol. 45 (2): p. 443-450, 2004.

DE LEON, G. P. **The diversity of digeneans (Platyhelminthes: cercomeria: Trematoda) in vertebrates in Mexico**. Comp. Parasitol, v.68: p. 1-8, 2001.

DILLON, R. T. **The Ecology of Freshwater Molluscs**. Cambridge University Press, 2000.

- DIMITRIEVA, E. F. **The influence of temperature and moisture of the upper soil layer on the hatching intensity of the slug *Deroceras reticulatum* Müller.** Malacol. Rev. 10: 32-45, 1975.
- DREYFUSS, G.; ABROUS, M.; VIGNOLES, P.; RONDELAUD, D. **Fasciola hepatica and *Paramphistomum daubneyi*: vertical distribution of metacercariae on plants under natural conditions.** Parasitol Res. v.94: 70–73, 2004.
- DUTRA, A. V. **Aspectos da ecologia e da reprodução de *Leptillaria ullilamellata* (Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae).** Revta bras. Zool. 5 (4): 581 -591, 1988.
- DUTRA, F.; SCHUCH, L. F. D.; DELUCCHI, E.; CURCIO, B. R.; COIMBRA, H. S.; RAFFI, M. B.; DELLAGOSTIN, O. e RIET-CORREA, F. **Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil.** J. Vet. Diagn. Invest. 13:433-437, 2001.
- EMBERTON, K. C. **Morphology and aestivation behaviour in some madagascan acavid land snails.** Biol. J. Linn. Soc. 53: 175-187, 1994.
- FERRAZ, J. **O escargot: criação e comercialização.** São Paulo: Ícone, 176p. 1999.
- FISH, J. D.; FISH, S. **The breeding cycle and growth of *Hydrobia ulvae* in Dovey estuary.** J. mar. biol. Assoc. U. K., v. 54, p. 685-697, 1974.
- FRIED, B. **Growth of *Philophthalmus* sp. (Trematoda) on the chorioallantois of the chick.** J Parasitology, v.48: p. 545-550, 1962.
- FRIED, B. **Transplantation of a monogenetic trematode, *Polystomoides* sp., to the chick chorioallantois.** J Parasitology, v. 51: p.983-986, 1965.
- FRIED, B.; HUFFMAN, J. E. **Excystation and development in the chick and on the chick chorioallantois of the metacercaria of *Sphaeridiotrema globulus* (Trematoda).** Int J Parasitology, v.12:p. 427-431, 1984.
- FRIED, B.; GROMAN, G. M. **Cultivation of the cercaria of *Hastula quissetensis* (Trematoda) on the chick chorioallantois.** Int J Parasitol 15 : 219-223, 1985.
- FRIED, B. **Chemical Communication in hermaphroditic digenetic trematodes.** Journal of Chemical Ecology, v.12 (8), 1986.
- FRIED, B. **Cultivation of helminths in chick embryos.** Adv Parasitol; v.30: p. 107-165, 1991.
- FRIED, B. **Metacercarial excystment of trematodes.** Adv Parasitol 33:91–144, 1994.
- FRIED, B. **An overview of the biology of trematodes.** In: Fried B, Graczyk TK

(eds) *Advances in trematode biology*. CRC, Boca Raton, p 12-13, 1997.

FURTADO, M. C. V. **Caracterização histológica do ovotestis de *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) em diferentes fases de desenvolvimento, mantida isolada e agrupada, sob condições de laboratório**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. 50p, 2002.

GAILLARD, C. **Las formas ecológicas de *Littoridina piscium* (D'Orbigny, 1835) (Mollusca, Hydrobiidae)**. La Plata. Neotr, v.19 (60): p. 147-151, 1973.

GAILLARD, C.; CASTELLANOS, Z. **Mollusca Gasteropoda Hydrobiidae**. In: RINGUELET, RA. (Ed.). *Fauna de Agua Dulce de la República Argentina*. Buenos Aires. FECIC, v.15 (2): p. 40, 1976.

GALAKTIONOV, K. V. **Two species of cyathocotylid cercariae from the fresh water mollusk *melanopsis praemorsa***. *Parasitology*, v.14 (4): p. 299-307, 1980.

GARCIA, C. A. E. In: **Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil**. Editado por Seeliger, U.; Odebrecht, C.; Castello, J. P. Rio Grande: *Ecocientia* – 341 p., 1998.

GARCIA, A. M.; VIEIRA, J. P.; WINEMILLER, K. O. **Dynamics of the shallow-water fish assemblage of the Patos Lagoon estuary (Brazil) during cold and warm ENSO episodes**. *J. Fish Biol.* 59: 1218-1238, 2001.

GHOSE, K. C. **The early stages of development in *Achatina fulica* Bowdich (Mollusca: Gastropoda)**. *Journal of the Bombay Natural History Society, Bombay*, 60:228-232, 1963.

GOETZ, T. E.; HOLLAND, J. C.; DAWSON, J. E.; RISTIC, M.; SKIBBE, K.; KEEGAN, K.G.; JOHNSON, P.J.; SCHAEFFER, D. J.; BAKER, G. J. **Monthly prevalence (in 1986) of antibody titers against equine monocytic ehrlichiosis in apparently healthy horses in Illinois**. *Am. J. Vet. Res.* 50 (11):1936-1939, 1989.

GOMES, P. A. C.; NUERNBERG, S.; NETO, M. P.; OLIVEIRA, G. P.; REZENDE, H. E. B.; ARAÚJO, J. L. B.; MELLO, R. P. **Biologia da *Lymnaea columella* Say, 1817**. *Arq. Mus. Nac., Rio de Janeiro*, 55: 67-70, 1975.

GOMES, R. S. **Sistemática, morfologia e distribuição da família Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) nas regiões biogeográficas australiana e oriental**. (Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul: Porto Alegre), 2002.

GONÇALVES, C. L.; COIMBRA, H. S.; SCHUCH, L. F. D.; MOTA, F. V.; SCHUBERT, R. N.; ALMEIDA, D. B.; OYARZABAL, M. E.; PRESTES, L. S.; MEIRELES, M. C. A. **Diagnóstico de Ehrlichiose Monocítica Equina no Brasil**. In: XVIII CIC, XI ENPOS, I Mostra científica 2009.

GONÇALVES, C. L.; SILVA, J. G.; MOTA, F. V.; GRUPPELLI, A. P. **Vetores e**

ocorrência de *Neorickettsia risticii* em equinos no Estado do Rio Grande do Sul. In: XIX CIC XII ENPOS II Mostra Científica 2010.

GONCALVES JR, J. F.; FONSECA, J. J. I.; CALLISTO, M. F. P. **Population dynamic of *Heleobia australis* (Gastropoda) in a coastal lagoon (Rio de Janeiro, Brazil).** Verhandlungen Internationale Vereinigen Limnologie v.26: p. 2056-2057, 1998.

GONZÁLES-ORTEGÓN, E.; PASCUAL, E.; CUESTA, J. A.; DRAKE, P. **Field distribution and osmoregulation capacity of shrimps in a temperate European estuary (SW Spain).** Estuarine, Coastal and Shelf Science, 67:293-302, 2005.

HAUT, S. K.; GHOSE, K. C. Growth rate of the garden snail *Macrochlamys indica* Godwin-Austen. **Proceedings of Zoological Society**, Calcuta, **35**:85-88. 1986.

HOLLAND, C. J.; RISTIC, M.; COLE, A. I.; JOHNSON, P.; BAKER, G.; GOETZ, T. **Isolation, Experimental transmission, and characterization of Causative Agent of Potomac Horse Fever.** Science, v.227, p.522-524, 1985.

HYMAN, L. H. The Invertebrates. Mollusca I. London, McGraw Hill. v.6, 792p. 1967.

IRWIN, S. W. B.; SAVILLE, D. H. **Cultivation and development of *Microphallus pygmaeus* (Trematoda: Microphallidae) in fertile chick eggs.** Department of Biological and Biomedical Sciences, University of Ulster at Jordanstown. Parasitology Research, v.74: p. 396-398, 1988.

IRWIN, S. W. B. **Excystation and cultivation of trematodes.** In: Fried, B.; Gracyk, T. Eds, Advances in Trematode Biology. 2nd ed. Boca Raton, Florida, USA. CRC Press., p. 57-86, 1997.

ISMAIL, N. S. **Two new furcocercariae from melanopsis praemorsa in Jordan.** Helminthologia, v.261: p. 15-20, 1989.

ITAGAKI, H; CHINONE, S. **Histories of rumen flukes and pancreas of ruminants.** In: JAPAN-BRASIL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND TECHNOLOGY, 3., 1982, Tokyo. *Proceeding...* Tokyo: Agency of Industrial Science and Technology., out. p.25-27, 1982.

KABAT, A. R.; HERSHLER, R. **The prosobranch snail family Hydrobiidae (Gastropoda: Rissooidea): review of classification and supraspecific taxa.** Smithson. Contrib. Zool., v. 547, p. 1-94, 1993.

KANTER, M.; MOTT, J., OHASHI, N.; FRIED, B.; REED, S.; LIN, Y.C.; RIKIHISA, Y. **Analysis of 16S rRNA and 51-Kilodalton antigen gene and transmission in mice of *Ehrlichia risticii* in virgulate trematodes from *Elimia livescens* snails in Ohio.** J. Clin. Microbiol. 38 (9):3349-3358, 2000.

KJERFVE, B. (1986). **Comparative oceanography of coastal lagoons.** In: Wolfe

- DA (ed.) Estuarine variability.** Academic Press, New York, pp. 63-81. in: O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações / Edição de U. Seeliger, C. Odebrecht. Rio Grande: FURG, – 180p., 2010.
- KOPPEL, E. M.; LEUNG, T. L. F.; POULIN, R. **The marine limpet *Notoacmea scapha* acts as a transmission sink for intertidal cercariae in Otago Harbour, New Zealand.** Journal of Helminthology, v.85: p. 160-163, 2011.
- KORNFELD, M. E.; ELMÔR, R. A.; CARRER, C. C. **Avestruzes no Brasil (incubação e criação de filhotes).** Brasil Ostrich, 2001.
- KOTZIAN, H. B.; MARQUES, D. M. **Lagoa Mirim e a convenção Ramsar: um modelo para ação trans-fronteiriça na conservação de recursos hídricos.** Rega - Revista de Gestão de Água da América Latina, Santiago, v.1(2): p 101 – 111, 2004.
- KRAILAS, D.; DECHRUKSA, W.; UKONG, S.; JANECHARUT, T. **Cercarial infection in *Paludomus petrosus*, freshwater snail in Pa La-U waterfall.** Southeast Asian J Trop Med Public Health. 34: 286-40, 2003.
- LEAHY, W. M. **Comportamento e características anatomofuncionais da reprodução em *Bradybaena similaris* (Molusco Pulmonado).** Ci. Cult., São Paulo, 36 (8): 1389-1392, 1984.
- LIMA, M. A.; SOARES, M. O. ; PAIVA, A. C. C. ; OSÓRIO, F. M. ; PORFÍRIO, A. F. ; MATTEWS-CASCON, H. **Osmorregulação em moluscos: o caso do bivalve estuarino tropical *anomalocardia brasiliana* (Mollusca: Bivalvia).** Conexões, Ciência e Tecnologia, v.3 (1), 2010.
- LIU, H. P.; HERSHLER, R.; THOMPSON, F. G. **Phylogenetic relationships of the Cochliopinae (Rissooidea: Hydrobiidae): an enigmatic group of aquatic gastropods.** Molecular Phylogenetics and Evolution, v.21: p. 17-25, 2001.
- LONG, M. T.; GOETZ, T. E.; KALOMA, I. et al: **Evaluation of fetal infection and abortion in pregnant ponies experimentally infected with *Ehrlichia risticii*.** Am. J. Vet. Res., v.56, p.1307-1316, 1995.
- LOVETT, D. L.; TANNER, C. A.; GLOMSKI, K.; RICART, T. M.; BORST, D. W. **The effect of seawater composition and osmolality on hemolymph levels of methyl farnesoate in the green crab *Carcinus maenas*.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 143:67-77, 2006.
- LUTZ, A. **Outro grupo de trematódeos nascendo de *Dicranocercárias* e outro caso de espécies com coecos abrindo para fora.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, [S.l.], v.29, p. 229-238, 1934.
- LWAMBO, N. J.; UPATHAM, E. S.; KRUAETRACHUE, M.; VIYANANT, V. **The host-parasite relationship between the Saudi Arabian *Schistosoma mansoni* and its intermediate and definitive hosts. *S. mansoni* and its local snail host *Biomphalaria arabica*.** Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, 1987.

MACHADO, G. **Demanda e disponibilidade hídrica no Sistema Lagoa Mirim - São Gonçalo – Rio Grande do Sul.** Revista Discente Expressões Geográficas. Florianópolis–SC, n. 03, p. 61-82, Maio de 2007.

MANSUR, M. C. D.; DOS SANTOS, C. P.; RICHINITTI, L. M. Z.; PEREIRA, D.; BATISTA, C. B.; DA SILVEIRA, M. B.; ALBERTO, R. M. F. ; DA SILVA, M. C. P. **Ocorrência de moluscos límnicos e crustáceo em macroaglomerados do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) sobre sarandi no lago Guaíba (RS, Brasil).** Revista Biotemas, v.21(4): p. 179-182, 2008.

MARGALEF, R; **Ecologia.** Barcelona: Omega. 1040 p. 1984.

MAYR, A.; GUERREIRO, M. **Virologia Veterinária**, 2 ed., Ed. Sulina, 474 p, 1981.

MICHELSON, E. H. **The effects of temperature on growth and reproduction of *Australorbis glabratus* in the laboratory.** American Journal of Hygiene, Baltimore, 73: 66 – 74, 1961.

MÖLLER, O. O. JR.; PAIM, P. S. G.; SOARES, I. D. **Facteurs et mecanismes de la circulation des eaux dans l'estuarie de la Lagune dos Patos (RS, Bresil).** Bull Inst Geol Basin Aquitaine (Bordeaux) 49:15-21, 1991.

ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C.; MÖLLER, O. O.; NIENCHESKI, L. F.; PROENÇA, L. A.; TORGAN, L. C. **Drought effects on pelagic properties in the shallow and turbid Patos Lagoon, Brazil.** Estuaries. 28(5): 675-685, 2005.

OLIVEIRA, S. M.; SPÓSITO FILHA, E. **Fasciolose hepática.** Divulgação técnica. Instituto Biológico Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, v.71(1): p.5-7, 2009.

PALMER, J. E.; WHITLOCK, R. H.; BENSON, C. E. **Equine ehrlichial colitis (Potomac horse fever): Recognition of the disease in Pennsylvania, New Jersey, New York, Ohio, Idaho and Connecticut.** J Am. Vet. Med. Assoc. 189:197-199, 1986.

PEKKARINEN, M. **Chick chorioallantoic membrane as an experimental medium for rearing two gymnophallid trematodes to maturity.** Department of Zoology, Division of Physiology, P.O. Box 17, SF-00014 University of Helsinki, Finland. 1993.

PÉQUEUX, A. **Osmotic regulation in crustaceans.** Journal of Crustacean Biology. 15: 1-60, 1995.

PEREIRA, D.; VEITENHEIMER-MENDES, I. L.; MANSUR, M. C. D.; SILVA, M. C. P. **Malacofauna límnic do sistema de irrigação do arroio Capivara e áreas adjacentes, Triunfo, RS, Brasil.** Biociências, 8 (1): 137-157, 2000.

PEREIRA, D.; CONSONI, J. M.; INDA, L. A.; KONRAD, H. G. **Composição e abundância de espécies de moluscos do bentos marginal da microbacia do arroio Capivara, Triunfo, RS, Brasil.** Biociências, 9 (1): 3-20, 2001.

PEREIRA, D.; MANSUR, M. C .D.; VOLKMER-RIBEIRO, C.; DE OLIVEIRA, M. D.; DOS SANTOS, C. P.; BERGONCI, P. E. A. **Colonização de substrato artificial por macroinvertebrados límnicos, no delta do rio Jacuí (RS, Brasil)**. Revista Biotemas, v.23 (1): p. 101-110, 2010.

PIERI, O.; JURBERG, P. **Aspectos etológicos na sobrevivência dos caramujos vetores da xistosomose ao tratamento com moluscidas**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 76 (1): 47-55, 1981.

PUSTERLA, N.; MADIGAN, J. E.; CHAE, J. S.; DEROCK, E.; JOHNSON, E.; PUSTERLA, J. B. **Helminthic transmission and isolation of *Ehrlichia risticii*, the causative agent of Potomac horse fever, by using trematode stages from freshwater stream snails**. J. Clin. Microbiol. 38(3):1293-1297, 2000.

RAMOS-VASCONCELOS, G. R.; HERMES-LIMA, M.. **Hypometabolism, antioxidant defense free-radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa***. J. Exp. Biol. 206: 675-685, 2003.

RAUT, S. K.; GHOSE, K.C. **Factors influencing gestation length in two land snails, *Achatina fulica* e *Macrochlamys indica***. Malacol. Rev. 13: 33-36, 1980.

RAUT, S.K., M.S. RAHMAN & S.K. SAMANTA. **Influence of temperature on survival, growth and fecundity of the freshwater snail *Indoplanorbis exustus* (Deshayes)**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87 (1): 15-19, 1992.

RICHARDOT, M. **Ecological factors inducing estivation in the freshwater limpet *Ferissia waltieri* (Basomatophora: Ancyliidae). I. Oxygen content, organic matter content and pH of the water**. Malacol. Rev. 10 (1-2):159-170, 1977.

RIKIHISA, Y. **Rickettsial diseases**, p.112-123. In: Ibid. (ed.) Equine Internal Medicine. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1998.

RIKIHISA, Y.; PERRY, B. D. **Causative Ehrlichial Organisms in Potomac Horse Fever**. Infection and Immunity, Washington, v. 49, n. 3, p. 513-519, 1985.

ROBINEAU, B. **Caracterisation des peuplements macrozoobenthiques de l'estuaire de la Loire / Characterization of the Loire estuary macrozoobenthic assemblages**. Vie Milieu, 37: 67-76, 1987.

RONDELAUD, D.; FOUSI, M.; VIGNOLES, P.; MONCEF, M.; DEYFUSS, G. **Optimization of metacercarial production for three digenean species by the use of petri dishes for raising lettuce-fed *Galba truncatula***. Parasitol Res, v.100: p. 861–865, 2007.

ROQUETE PINTO, C. L., CAÇONIA. A e SOUZA, M. M. **Utilization of water hyacinth for removal and recovery of silver from industrial wastewater**. Water Science Technology, 19 (10), 89-101. 1987.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ed.

São Paulo: Roca, 1996.

SAAD, A. I. **The life cycle of *Centrocestus unequiorchalis* n. Sp. (heterophyidae: centrocestiinae).** Journal of Islamic Academy of Sciences v.7 (3): p. 193-198, 1994.

SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MOTA, D. L.; BITTENCOURT, A. M. **Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*.** Journal of Fish Biology, v. 49, n. 3, p. 545-548, 1996.

SALÁNKI, J.; FARKAS, A.; KAMARDINA, T.; RÓZSA, K. S. **Molluscs in biological monitoring of water quality.** Toxicology Letters, v.140-141: p. 403-410, 2003.

SAMPAIO, L. A.; TESSER, M. B.; BURKERT, D. **Tolerância de Juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* (Teleostei, Carangidae) ao choque agudo de salinidade em laboratório.** Ciência Rural, Santa Maria, v.33, n.4, p.757-761, jul-ago 2003.

SANTOS, S. B.; MONTEIRO, D. P. **Composição de gastrópodes terrestres em duas áreas do Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentado (CEADS), Vila Dois Rios, Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil – um estudo-piloto.** Revista Brasileira de Zoologia, 18 (Supl. 1): p. 181-190, 2001.

SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA CIVIL. Disponível em: www.defesacivil.gov.br/situacao/2011/estado/rs.asp, portaria número 147, 2011. Acesso em: 17 jan. 2012.

SEY, O. **Life-cycle and geographical distribution of *Paramphistomum daubneyi* Dinnik (Trematoda, Paramphistomata).** Acta Vet Acad Sci Hung; v.27(1-2): p. 115-130, 1977-1979.

SIEFKER, C. C.; CARTHER, J. N.; BLANKESPOOR, H.D. **Tolerance of *Biomphalaria glabrata* to continuous thermal stress.** Malacol. Rev. 11:1-25, 1977.

SILVA, D.; DEBACHER, N. A.; DE CASTILHOS JUNIOR, A. B.; ROHERS, F. **Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes de cultivos da região litorânea da Ilha de Santa Catarina.** Quim. Nova, v.33 (5): p. 1053-1058, 2010.

SIMONE, L. R. L. **Land and Freshwater Molluscs of Brazil.** EGB, Fapesp. São Paulo, 390pp, p91, 2006.

STIGLINGH, I.; VAN EEDEN, J. A. **Population fluctuations and ecology of *Bulinus tropicus* (Mollusca; Basommatophora).** Natuurwetenskappe 87:145-156, 1977.

STOREY, K. B. **Life in slow lane: molecular mechanisms of estivation.** Comp. Biochem. Physiol. Part A 133: 733-754, 2002.

STRAYER, D. L. **Freshwater mollusks and water quality.** Journal of the North American Benthological Society, v.18: p 1, 1999.

TANG, Z.; TANG, C. **The biology and epidemiology of *Eurytrema coelomaticum* (GIARD; BILLET, 1892) and *Eurytrema pancreaticum* (JANSON, 1889) in cattle and sheep in China.** Acta Zoologica, Stockholm, v.23, p.267- 282, 1977.

THIENGO, S. C.; AMARAL, R. S.; PIERI, O. S.; FERNANDEZ, M. A. **Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE).** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2ª Edição, Editora MS, Brasília – DF, 2007.

TIMMERMANN A.; OBERHUBER, J.; BACHER, A.; ESCH, M.; LATIF, M. ROECKNER, E. **Increased *El Niño* frequency in a climate model forced by future greenhouse warming.** Nature 398: 694-697, 1999.
TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L., **Microbiologia**, 6 edição, Artmed, Porto Alegre, 2000.

TRAVASSOS, L. **Introdução ao Estudo da Helminologia**, Revista Brasileira de Biologia - Brazilian Journal of Biology, cap.8, p.87-108, 1950.

VALERO, M. A.; MAS-COMA, S. **Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region.** Folia Parasitol (Praha), v.47: p.17–22, 2000.

VALERO, M. A.; DARCE, N. A.; PANOVA, M.; MAS-COMA, S. **Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region.** Vet Parasitol., v.102: p. 85–100, 2001.

VAN DER SCHALIE, H.; BERRY, E. G. **The effects of temperature on growth and reproduction in aquatic snails.** Malacol. Rev. 6 (12): p. 60, 1973.

VEITENHEIMER, M. ***Drepanotrema kermatoides* (D'Orbigny, 1835) (Mollusca, Planorbidae), hospedeiro de um paranfistomídeo (Trematoda), no Rio Grande do Sul, Brasil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.84(1): p. 107-111, 1989.

WASIELESKY, W. **Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos de parâmetros ambientais e manejo de cultivo.** Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, FURG, 2000.

WOODRUFF, A. M.; GOODPASTURE, E. W. Amer. Jour. Path., 7, 209, 1931.

WU, R. S. S.; WOO, N. Y. S. **Tolerance of hypo-osmotic salinities in thirteen species of adult marine fish: implications for estuarine fish culture.**

Aquaculture, Amsterdam, v.32, p.175-181, 1983.

ZIEMER, L. E.; WHITLOCK, R.H.; PALMER, J. E.; SPENCER, P. A. **Clinical and hematological variables in ponies with experimental induced equine ehrlichial colitis (Potomac horse fever)**. Am. J. Vet. Res. 48:63-67, 1987.