

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**LORENA SOUZA CASTRO**

**POTENCIAL OVICIDA DE *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 (ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) SOBRE MASSAS OVÍGERAS DE *Pseudosuccinea columella* (MOLLUSCA: GASTROPODA) E OVOS DE *Fasciola hepatica* (TREMATODA: FASCIOLIDAE) COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE BIOLÓGICO**

**ALEGRE - ES**

**2018**

LORENA SOUZA CASTRO

**POTENCIAL OVICIDA DE *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 (ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) SOBRE MASSAS OVÍGERAS DE *Pseudosuccinea columella* (MOLLUSCA: GASTROPODA) E OVOS DE *Fasciola hepatica* (TREMATODA: FASCIOLIDAE) COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Orientadora: Profa. Dra. : Isabella Vilhena Freire Martins

Coorientador: Prof. Dr. Victor Menezes Tunholi Alves

**ALEGRE-ES**

**2018**

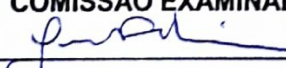
**LORENA SOUZA CASTRO**

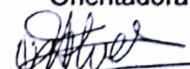
**POTENCIAL OVICIDA DE *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 (ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) SOBRE MASSAS OVÍGERAS DE *Pseudosuccinea columella* (MOLLUSCA: GASTROPODA) E OVOS DE *Fasciola hepatica* (TREMATODA: FASCIOLIDAE) COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE BIOLÓGICO**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

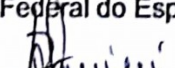
Aprovado em 31 de Julho de 2018.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Isabella Vilhena Freire Martins  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Victor Menezes Tunholi Alves  
Faculdade Multivix  
Coorientador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Mariana Drummond Costa Ignacchiti  
Universidade Federal do Espírito Santo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Santos Zanini  
Universidade Federal do Espírito Santo

## AGRADECIMENTOS

Graças dou a Deus pelo dom da vida, sem Ele nada seria possível. É incomensurável seu amor por todos nós, por nos suster e pela capacidade que temos de poder desfrutar do infinito horizonte de conhecimento e pessoas com detalhes próprios que fazem do pouco, muito, na vida de cada um. Sendo esse agradecimento apenas uma parte do que sou eternamente grata.

Aos meus pais, Jefferson e Christiane, dos quais foram essenciais em minhas escolhas e personalidade. À minha querida avó Dalva que sempre esteve me ouvindo em vários períodos da minha vida e me ajudado tanto em oração quanto emocionalmente. Assim também como minhas irmãs carinhosas, Bárbara e Júlia.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo por todo suporte, apoio técnico, financeiro, estrutural e aos professores que contribuem para que várias pesquisas aconteçam.

Agradeço imensamente a minha querida e melhor orientadora, Dra. Isabella Vilhena Freire Martins, do qual tive a sorte e oportunidade de conhecer desde a época do Museu de História Natural do Sul do Estado do Espírito Santo (MUSES), que desde então, tem me ajudado e me dado toda orientação além do que precisava, sempre tentando fazer as coisas darem certo.

Ao meu coorientador, Dr. Victor Menezes Tunholi Alves, pela imensa paciência e valiosos ensinamentos, decisões que culminaram em ótimos resultados e que me ajudaram em vários assuntos nas realizações dos experimentos.

Ao professor Dr. Fábio Ramos Alves do curso de agronomia pela confiança e auxílio na área de microbiologia, disponibilizando o laboratório e seus recursos para que meu projeto se realizasse.

As empresas especializadas e aos funcionários dos matadouros-frigo que contribuíram para a coleta do material biológico.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Medicina Veterinária e aos professores Jackson Vieira de Araújo, Leandro Licursi de Oliveira do Departamento de Biologia Geral, pelo carinho, acompanhamento, ensinamentos,

confiança na utilização de laboratórios, recursos, aos técnicos, alunos envolvidos na coleta de material e processamento.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) por todo serviço prestado nas micrografias do meu trabalho e procedimentos experimentais, em especial ao Jairo, Flávio e Gabriel.

Aos técnicos de laboratório de bioquímica e análises clínicas da UFES, em especial Jerusa, Márcia e Pablo.

Ao meu amigo agrônomo, Luís Moreira, pelo imenso conhecimento, contribuição nas análises estatísticas e toda paciência em mediar essas informações.

As meninas da república Miriam e Poliana, das quais me diverti bastante. Aos amigos próximos, Matheus e Lucas, por todo companheirismo e amizade durante meus estudos regados a café.

Aos amigos e amigas do laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário - HOVET, em especial Fernanda Roldi, uma amiga-irmã, presente de Deus e grande amizade que espero levar para vida toda. Agradeço também a Samira, ao Ygor, pela dedicação com o moluscário, ensinamentos e empenho nas pesquisas. À Larissa, Camila e demais estagiários envolvidos, dos quais aprendi muitas coisas, graças a vocês.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelos recursos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa.

Enfim, sou muito grata a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram em qualquer aspecto do meu experimento e percurso durante o mestrado.

*“Tudo posso naquele que me fortalece”.*

Filipenses, cap. 4, v.13

## RESUMO

CASTRO, LORENA SOUZA. **POTENCIAL OVICIDA DE *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 (ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) SOBRE MASSAS OVÍGERAS DE *Pseudosuccinea columella* (MOLLUSCA: GASTROPODA) E OVOS DE *Fasciola hepatica* (TREMATODA: FASCIOLIDAE) COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE BIOLÓGICO**. 2018. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

Moluscos pertencentes à espécie *Pseudosuccinea columella* apresentam comportamento aquático e habitam coleções hídricas dulcícolas situadas especialmente em regiões neotropicais. São caramujos hermafroditas, possuindo alta capacidade reprodutiva e com massas ovígeras postas em substratos submersos nas margens dos criadouros expostas ao ressecamento e a patógenos como fungos. Trematódeos do gênero *Fasciola* são parasitos dos ductos biliares e causam grandes perdas econômicas. Os caramujos, são os primeiros hospedeiros intermediários do espécime *Fasciola hepatica* e seu controle é umas das ferramentas para o controle da fasciolose. Praticamente nada é sabido sobre a susceptibilidade de massas ovígeras a fungos. Pela primeira vez, a susceptibilidade de massas ovígeras de *P. columella* ao fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10) foi demonstrada sob condições laboratoriais. Para isto, dois grupos experimentais foram edificados: o grupo controle, na qual não verificou a exposição ao fungo, e o grupo tratado, caracterizado pela exposição das massas ovígeras ao isolado fúngico (Pc-10) durante 25 dias. Todo o experimento foi conduzido em duplicata constando de cinco réplicas para cada repetição, utilizando um total de quarenta massas ovígeras. Semanalmente, ao longo de todo o experimento, as massas ovígeras de ambos os grupos experimentais (controle e tratado) foram analisadas sob auxílio de microscópio estereoscópico para a contabilização de moluscos eclodidos. Em paralelo a este estudo, avaliou-se o potencial ovicida do extrato fúngico de *P. chlamydosporia* da cepa (Pc-10) em 900 ovos de *F. hepatica*. Para isto, os ovos foram previamente embrionados em B.O.D e posteriormente para estimular a eclosão miracidial, foram expostos à luz artificial e temperatura controlada, do qual foi inoculado no meio contendo os ovos e o extrato do fungo em

diferentes concentrações. Os resultados revelaram que o processo de embriogênese foi inibido pelo ascomiceto em questão, sugerindo sua aplicabilidade em programas de controle biológico deste limneídeo. Em adição, a ultraestrutura revelou ocorrência de diferentes tipos de interações estabelecidas entre as massas ovíferas do molusco com os micélios de *P. chlamydosporia*, as quais resultaram em importantes modificações estruturais nestas, comprometendo, por conseguinte, a viabilidade dos ovos. Em relação ao extrato fúngico enzimático, ambos interferiram significativamente na viabilidade dos ovos, sendo o micélio dependente de dias para crescimento e estabelecimento do fungo em massas ovíferas e o extrato sendo eficiente avaliado em um período de 60 minutos, sobre concentrações nas quais, as menores dosagens, houve colapso do ovo e em maiores, o desintegramento parcial da estrutura externa e rompimento.

Palavras-chave: Fasciolose. Fungo. Moluscos. Ovos



## ABSTRACT

CASTRO, LORENA SOUZA. **POTENTIAL OF *Pochonia chlamydosporia* Pc-10 (ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) ON OVIGERAL MASSES OF *Pseudosuccinea columella* (MOLLUSCA: GASTROPODA) AND EGGS OF *Fasciola hepatica* (TREMATODA: FASCIOLIDAE) AS A BIOLOGICAL CONTROL ALTERNATIVE.** 2018. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

Molluscs belonging to the species *Pseudosuccinea columella* show aquatic behavior and inhabit sweet water collections located especially in neotropical regions. They are hermaphrodite snails, having high reproductive capacity and with ovigerous masses placed in substrates submerged in the borders of the breeding places exposed to the dryness and pathogens like fungi. Trematodes of the genus *Fasciola* are parasites of the bile ducts and cause great economic losses. Snails, are the first intermediate hosts of the specimen *Fasciola hepatica* and its control is one of the tools for the control of fasciolose. Virtually nothing is known about the susceptibility of ovigerous masses to fungi. For the first time, the susceptibility of *P. columella* ovigerous masses to the fungus *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10 isolate) was demonstrated under laboratory conditions. For this, two experimental groups were constructed: the control group, in which it did not verify the exposure to the fungus, and the treated group, characterized by the exposure of the ovigerous masses to the fungal isolate (Pc-10) during 25 days. The entire experiment was conducted in duplicate consisting of five replicates for each replicate, using a total of forty ovigerous masses. Weekly, throughout the experiment, the ovigerous masses of both experimental groups (control and treated) were analyzed under the aid of a stereoscopic microscope for the accounting of hatched molluscs. In parallel to this study, the ovicidal potential of the *P. chlamydosporia* fungal extract of the strain (Pc-10) in 900 eggs of *F. hepatica* was evaluated. For this, the eggs were previously embryonated in B.O.D and later to stimulate the miracidial hatching, were exposed to artificial light and controlled temperature, from which it was inoculated in the medium containing the eggs and the fungus extract in different concentrations. The results revealed that the embryogenesis process was inhibited by the ascomycete in question, suggesting its applicability in biological control programs of this limneid. In

addition, the ultrastructure revealed the occurrence of different types of interactions established between the ovigerous masses of the mollusc with the mycelia of *P. chlamydosporia*, which resulted in important structural modifications in these, compromising, therefore, the viability of the eggs. In relation to the enzymatic fungal extract, both interfered significantly in the viability of the eggs, the mycelium being dependent on days for growth and establishment of the fungus in ovigerous masses and the extract being efficient evaluated in a period of 60 minutes, on concentrations in which the smaller dosages, there was egg collabiation and in larger, partial disintegration of the external structure and rupture.

Key words: Eggs. Fasciolosis. Fungus. Molluscs

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 –	Desenvolvimento embrionário de <i>F. hepatica</i> . A – zigoto na capsula: opérculo (op), ovo fertilizado ou zigoto (of), células embrionárias (ce) e tegumento externo (te); B – estágio celular: células de propagação (cp) e células somáticas (cs); C – estágio multicelular: embrião (em); D – fase miracidial: protonefrídio (pn), olhos (o), terebratorium (t), células germinativas rudimentares (cgr) e cílios (c). .....	24
Figura 2 –	Ovos de <i>Fasciola hepatica</i> .....	25
Figura 3 –	Concha de <i>Pseudosuccinea columella</i> .....	29
Figura 4 –	Anatomia do sistema reprodutivo de <i>Pseudosuccinea columella</i> . Ovoteste (ot), tubo renal (tr) e ureter (u); estruturas masculinas: pênis (p), prepúcio (pp), vaso deferente (vd) e bainha do pênis (bp); estruturas femininas: oviduto (o), espermateca (e), glândula nidificante (gn), glândula do albúmen (ga) e vagina (v).....	30
Figura 5 –	Massa ovígera com ovos embrionados de <i>Pseudosuccinea columella</i> , visto em microscópio ótico.....	31

## Capítulo 1

- Figura 1 – Taxa percentual (%) da eclodibilidade dos embriões de *Pseudosuccinea columella* expostos e não expostos (tratado) a propágulos (controle) do fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10)..... 62
- Figura 2 – Ensaio experimental in vitro, evidenciando o grupo tratado (A) após 25 dias a não eclodibilidade dos ovos de *P. columella* comparado com o grupo controle (B) com total eclosão dos embriões..... 63
- Figura 3 – Microscopia eletrônica de transmissão de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em massa ovígera de *Pseudosuccinea columella*. A) Início do processo de germinação hifal a partir do clamidósporo (c) em meio a substância coloidal (sc) que compõe a massa ovígera. B) Padrão hifal de Spitzenkörper (ps) apresentando sistema de fibrilas e demais estruturas internas, tais como, retículo alongado(r), septo (s). C e D) Corpo hifal (h) demonstrando sistema de fibrilas (f) em contato com a substância coloidal e com a membrana do ovo (m) do gástrópode, observado da parede celular do fungo, caracterizando efeitos do tipo 1 (contato) e 2 (modificações estruturais), processo decorrente ao longo de 25 dias, que resultaram na inviabilidade dos ovos. E e F) Visualização da hifa (h) e sistema de fibrilas (f) evidenciando uma degeneração de membranas do ovo do embrião (e) e colonizando a a massa ovígera..... 65

- Figura 4 – Microscopia eletrônica de transmissão do grupo controle não exposto ao fungo *Pochonia chlamydosporia*. A) Massa ovígera contendo embrião (e) não eclodido. B e C) Estrutura e visualização do aspecto da massa ovígera (mo). D) Embrião (e) gastrópode de *Pseudosuccinea columella*..... 66
- Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle de massa ovígera de *Pseudosuccinea columella* após 25 dias. A e B) Aspecto rugoso e com sulcos menores, decorrentes da nutrição do embrião. C e D) Rompimento da substância coloidal promovido pela saída dos embriões..... 67
- Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e massa ovígera de *Pseudosuccinea columella*. A e B) Massa ovígera (M) sob micélio (F) de *P. chlamydosporia*. C e D) Alterações estruturais no tegumento do ovo induzidas pelo fungo E) Protoconcha de *P. columella* danificada provavelmente pela atividade enzimática de corpos hifais em expansão (→). F) Asca prototunicada denominada clamidósporo (c) e sistema de hifas de *P. chlamydosporia* recobrimdo superfície externa da massa ovígera..... 68
- Figura 7 – Processo de melanização (→) e degradação da massa ovígera estabelecido entre o fungo (f) e os ovos do hospedeiro *P. columella*..... 69

## Capítulo 2

- Figura 1 – Perfil de inviabilidade dos ovos de *Fasciola hepatica* em concentrações de 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL do extrato enzimático de *P. chlamydosporia* e H<sub>2</sub>O. A) Número de eclosão dos miracídios exposto à luz durante 60 minutos. B) Número de miracídios não eclodidos quando expostos à luz durante 60 minutos..... 88
- Figura 2 – Perfil de inviabilidade dos ovos de *Fasciola hepatica* em concentrações de 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL do extrato enzimático de *P. chlamydosporia* e H<sub>2</sub>O. C) Número de ovos rompidos. D) Número de ovos colabados... 89
- Figura 3 – Gráfico de análise cromatográfica (CLAE) do extrato enzimático de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10). Densidade optica 280 nm (DO) ..... 90
- Figura 4 – Fotodocumentação de gel SDS-PAGE (corado com nitrato de prata) com extratos brutos proteicos de (*P. chlamydosporia* – Pc-10) de fração solúvel em DBB após a purificação de banda de interesse por eluição direta do gel de poliacrilamida. Marcador molecular (Mm) e tamanho da proteína (Pc-10) indicado pela seta (→)..... 91
- Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Fasciola hepatica* após 60 minutos em extrato enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia*. A) Ovo controle (H<sub>2</sub>O) com abertura do opérculo (o) e o sem dano ao tegumento. B e C) Ovos colabados e sem abertura do opérculo na dosagem de 200 µL e 300 µL D, E, F) Ovos colabados e com a

integridade interna, afetando as células do miracídio (c) e externa do tegumento rompidos nas dosagens de 300 µL, 400 µL e 500 µL..... 92

Figura 6 – Microscopia eletrônica de transmissão dos ovos de *Fasciola hepatica* após 60 minutos em extrato fúngico enzimático da espécie *Pochonia chlamydosporia*. A, B e C) Ovo controle (H<sub>2</sub>O) e visualização do miracídio (m) e opérculo (o) do tegumento sem dano. D, E e F) Ovos nas dosagem de 500 µL, com os tegumentos rompidos (→) e observação de terebratorium (t) indicados pela →..... 93

## LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

AA2% – Ágar Água 2%

ANOVA – Análise de variância

BDA – Batata Dextrose Ágar

B.O.D – Demanda Bioquímica de Oxigênio

CCAIE – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DBB – Tampão desnaturante

DO – Densidade óptica

kDa – quilo Daltons

μl – Microlitro

μm – Micrometro

mL – Mililitro

pH – Potencia hidrogeniônico

PAGE – Eletroforese de gel em policrilamida

Pc -10 – *Pochonia chlamydosporia* 10

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

LUCCAR – Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

HOVET – Hospital Veterinário

RPM – Rotação por minuto

UFV – Universidade Federal de Viçosa

UV – Ultravioleta

SDS – Dodecilsulfato de sódio



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1 <i>Fasciola hepatica</i> (Linnaeus, 1761) .....	23
2.2 Fasciolose e medidas de controle.....	26
2.3 <i>Pseudosuccinea columella</i> (Say, 1817) .....	28
2.4. Medidas de controle do caramujo <i>P. columella</i> (Say, 1817).....	32
2.4.1 Controle físico.....	32
2.4.2 Controle químico.....	32
2.4.3 Controle biológico .....	33
2.5 Aplicabilidade de fungos helmintófagos .....	34
2.5.1 Taxonomia e evolução.....	35
2.5.2 Aspectos comportamentais e bioquímicos de fungos como agentes de controle biológico de helmintos.....	37
2.5.3 Diversidades de estruturas de infecção-organismo .....	38
2.5.4 Serino-proteases de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e processo de melanização .....	39
2.5.5 Mecanismos de reconhecimento, especificidade e infecção do hospedeiro .....	40
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>CAPÍTULO 1. POTENCIAL OVICIDA DE <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pc-10 (ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) SOBRE MASSAS OVÍGERAS DE <i>Pseudosuccinea columella</i> (MOLLUSCA: GASTROPODA)</b> .....	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT .....	57
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	58

<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	59
2.1 Obtenção do fungo <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10).....	59
2.2 Obtenção das massas ovígeras de <i>Pseudosuccinea columella</i> .....	59
2.3 Exposição experimental das massas ovígeras de <i>Pseudosuccinea columella</i> ao fungo <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Pc-10) .....	59
2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) de massa ovígera de <i>Pseudosuccinea columella</i> (grupo controle) e exposto ao micélio do fungo <i>Pochonia chlamydosporia</i> (grupo tratado) in vitro após 25 dias de exposição. .....	60
2.5 Análises estatísticas.....	61
<b>3. RESULTADOS</b> .....	62
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	73
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>CAPÍTULO 2. EFEITO DO EXTRATO FÚNGICO ENZIMÁTICO DE <i>Pochonia chlamydosporia</i> Pc-10 (ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) NA VIABILIDADE DOS OVOS DE <i>Fasciola hepatica</i> (TREMATODA: FASCIOLIDAE)</b> .....	79
RESUMO.....	80
ABSTRACT .....	81
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	82
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	84
2.1 Obtenções dos ovos de <i>F. hepatica</i> .....	84
2.2 Eletroforese SDS-PAGE do extrato fúngico de <i>P. chlamydosporia</i> .....	84
2.2 CLAE da atividade enzimática de <i>Pochonia chlamydosporia</i> .....	85
2.3 Aquisição do extrato fúngico enzimático de <i>P. chlamydosporia</i> (Pc-10) em ovos de <i>F. hepatica</i> .....	85
2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) de ovos de <i>Fasciola hepatica</i> tratados e não tratados com o extrato enzimático.....	86

2.5 Análises estatísticas.....	87
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>88</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A fasciolose, também conhecida como distomatose hepática, é uma doença infecto-parasitária de grande relevância em medicina veterinária, responsável por significativos prejuízos econômicos, sobretudo na bovinocultura e ovinocultura (BERNARDO et al., 2011; HOWELL et al., 2015). Para Molento et al. (2018), as perdas econômicas relacionadas a esta parasitose no Brasil chegam aproximadamente US\$ 210 milhões/ano. Tal patologia apresenta como agente etiológico os trematódeos *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*, que demonstram ampla distribuição mundial (MATTOS et al., 1997). Além da importância médico-veterinária, a fasciolose é reconhecida como uma zoonose emergente. Nesse contexto, humanos configuram-se como hospedeiros ocasionais e se infectam mediante ingestão de água ou verduras contaminadas com metacercárias do parasito (ROBINSON; DALTON, 2009).

Estudos epidemiológicos têm revelado aumento da prevalência da fasciolose no Brasil (ALEIXO et al., 2015). Vários fatores acabam por contribuir para a edificação deste cenário, tais como, fatores climáticos, que favorecem a formação de áreas alagadas ou com inundações periódicas, a presença de moluscos que atuam como hospedeiros intermediários, bem como de hospedeiros definitivos parasitados, além da não adoção de medidas de controle para este parasito (MOLENTO et al., 2018).

No Brasil, moluscos limneídeos pertencentes às espécies *Lymnaea columella* (atual *Pseudosuccinea columella*), *Galba viatrix* e *Galba cubensis* atuam como hospedeiros intermediários de *Fasciola* spp., sendo imprescindíveis para a manutenção e dispersão da parasitose em uma determinada região (BENNEMA et al., 2014). Segundo Medeiros et al. (2014), tais gastrópodes estabelecem em águas estagnadas ou de cursos lênticos presentes em áreas neotropicais. Em períodos onde as condições climáticas mostram-se desfavoráveis os moluscos estivam, enterrando na lama ou barro, induzindo processos de anidrobiose, permanecendo assim vivos por vários meses (SERRA-FREIRE, 1995). Dessa maneira, para o controle da fasciolose faz-se necessário não apenas o tratamento químico dos animais parasitados, bem como dos ovos por eles eliminados, mais também o controle da densidade populacional de moluscos hospedeiros (WHO, 1983; PAHO, 2003).

Infelizmente, muitos programas de controle de moluscos hospedeiros de parasitos de importância médica e médico-veterinária, não tem logrado êxito. Esta condição pode em parte ser justificada, pois por muitos anos, o controle de tais organismos têm sido baseados a partir da utilização indiscriminada de formulações químicas a base de niclosamida, uma etanolamina de 2', 5-dicloro-4'-nitrosalicilanida cuja eficácia tem sido previamente estabelecida (GONNERT, 1961; MACHADO, 1982). No entanto, por apresentar elevada ecotoxicidade (ANDREWS et al., 1983), baixa seletividade, elevado custo (PIERI, 1995) e em virtude aos indícios crescentes de desenvolvimento de resistência de populações de moluscos a tal composto moluscicida (SARQUIS et al., 1998), seu uso torna-se cada vez mais limitado e indesejado. Esta condição tem incentivado pesquisadores a desenvolverem métodos alternativos que visam o controle da densidade populacional destes hospedeiros, e, por conseguinte, das parasitoses por eles veiculadas. Dentre tais medidas destaca-se à utilização de microrganismos patogênicos, como agentes de controle biológico, possibilitando à substituição ou redução de resíduos gerados pelos moluscicidas químicos sintéticos, responsáveis por causarem impactos ao meio ambiente e a saúde humana e animal (TUNHOLI et al., 2017a, 2017b).

Evidências iniciais sobre a susceptibilidade de *Biomphalaria glabrata* a fungos patogênicos aquáticos e terrestres tem sido registrada por autores (ROCHA et al., 2009; BARON et al., 2013). Em estudo recente, Duarte et al. (2015) avaliaram a vulnerabilidade de massas ovíferas de *B. glabrata* a infecção por *Metarhizium anisopliae* sob condições laboratoriais. A viabilidade dos ovos, bem como, a maturação das massas ovíferas do molusco hospedeiro diminuíram significativamente após exposição aos conídios e corpos hifais do fungo, sugerindo, portanto, sua utilização em programas de controle biológico de *B. glabrata*. Para os autores, estes resultados caracterizam a primeira descrição patogênica exercida pelo fungo *M. anisopliae* em invertebrado não-artrópode. Apesar destes estudos, a susceptibilidade de massas ovíferas de *Pseudosuccinea columella* ao fungo *Pochonia chlamydosporia* ainda não foi caracterizada.

Estudos sobre a interação do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Fasciola hepatica*, foram verificados por Dias et al. (2013) com destruição destes após sete dias de interação em sistema gastrointestinal, do qual promoveu resultados positivos no controle dos ovos, sugerindo sua ação como agente de controle biológico.

O ascomiceto *P. chlamydosporia* possui características aplicáveis a biotecnologia, do qual a utilização do extrato fúngico ainda também não foram relatados sobre os ovos de *F. hepatica*.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar pela primeira vez sob condições laboratoriais, a viabilidade de massas ovíferas de *P. columella* ao fungo *P. chlamydosporia* (Pc-10), bem como a ação de diferentes concentrações do extrato fúngico enzimático obtidos deste mesmo isolado fúngico em ovos de *F. hepatica*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1761)

O trematódeo *Fasciola hepatica* [*fasciola* (latim) = tira ou bandagem; *hepatica* (grego) = fígado] é um espécime de aspecto foliáceo e deprimido dorsoventralmente. Taxonomicamente encontra-se locado na ordem Echinostomida, por apresentar duas ventosas, a oral (situada na extremidade do cone cefálico) e acetabular (ventral) (TAYLOR, COOP, WALL, 2015). Tal helminto caracteriza por apresentar um ciclo de vida heteroxênico com formas jovens/adultas estabelecidas no parênquima hepático e ductos biliares de hospedeiros definitivos.

Com a ingestão das metacercárias pelo hospedeiro definitivo, estas se desencistam no lúmen intestinal, liberando as formas jovens das quais migram em direção ao parênquima hepático via cavidade peritoneal, onde se alimentam de fluidos do tecido em questão culminando na destruição dos hepatócitos. As formas jovens do trematódeo poderão permanecer por até quatro meses no parênquima hepático, como forma de obtenção dos nutrientes necessários para a manutenção de suas funções vitais, migrando em seguida para os ductos biliares, onde ocorrerá o amadurecimento e liberação dos ovos em seis a oito semanas de infecção (MARTINS, 2007; BOWMAN, 2014).

Os ovos de *F. hepatica* são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo para o meio ambiente e ao alcançarem uma coleção hídrica iniciarão etapa de embriogênese, propiciando a formação e a eclosão do miracídio que infectará através da massa cefalopédica no corpo do molusco hospedeiro (MARTINS, 2007).

O trematódeo, além de possuir grande capacidade de dispersão, pois é capaz de se adaptar a novos hospedeiros e ao meio, cada espécime no ducto biliar é capaz de ovipor até 20 mil ovos por dia (MAS-COMA; BARGUES; VALERO, 2005; DIAS et al., 2013).

De modo geral, estes ovos apresentam amarelo-acastanhados e aspecto elíptico, com dimensões que variam de 70-90 µm de largura a 130-145 µm de

comprimento, portando em uma de suas extremidades um opérculo. Dentro do ovo se desenvolve uma forma ciliada denominada miracídio. Este mede aproximadamente o mesmo comprimento dos ovos (130  $\mu\text{m}$ ), demonstrando aspecto piriforme e com tegumento recoberto por cílios (Figuras 1A-D e 2). As formas subsequentes (esporocistos, rédias, cercarias e metacercárias) somente se desenvolverão se o miracídio conseguir infectar seu hospedeiro intermediário (OLIVEIRA, 2008).

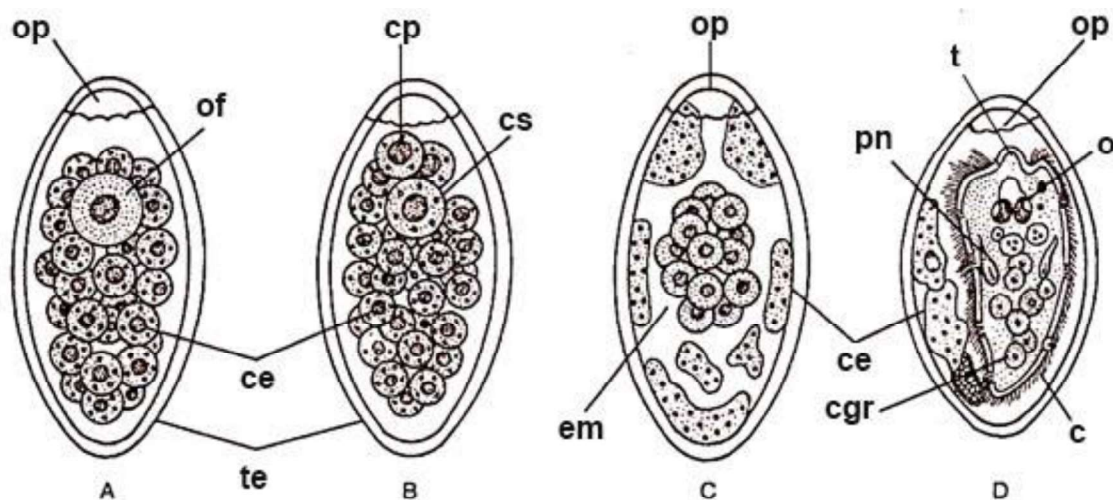


Figura 1 – Desenvolvimento embrionário de *F. hepatica*. A – zigoto na capsula: opérculo (op), ovo fertilizado ou zigoto (of), células embrionárias (ce) e tegumento externo (te); B – estágio celular: células de propagação (cp) e células somáticas (cs); C – estágio multicelular: embrião (em); D – fase miracidial: protonefrídio (pn), olhos (o), terebratorium (t), células germinativas rudimentares (cgr) e cílios (c). Fonte: Adaptado de BIOLOGY DISCUSSION.

Em estudos *in vitro* com ovos de *F. hepatica* (Figura 2), Strauch (1987) demonstrou que o pH 9,0 destrói determinados microrganismos bacterianos, sem contudo interferir na estrutura miracidial, favorecendo à eclosão da larva. Quanto à sobrevivência, Burger e Stoyer (1978) observaram que os ovos de *F. hepatica* mantiveram-se resistentes e viáveis ao longo de 42 dias, condição está justificada



pela composição química da casca do ovo, que mostra constituída de quitina e outros complexos proteicos (STEPHENSON, 1947).

Para Toner et al. (2011), as cascas de ovos maduros de *F. hepatica* são notavelmente resistentes à ação de ácidos clorídrico, nítrico ou sulfúrico. Há apenas três tipos conhecidos de membranas animais cuja resistência é de alguma maneira comparável à acima; estes são quitina, queratina e esclerotina.

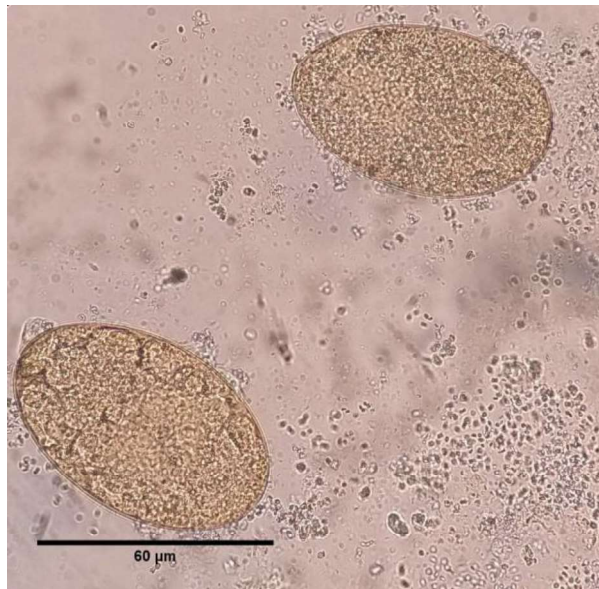


Figura 2 – Ovos de *Fasciola hepatica*. Fonte: arquivo pessoal (2018).

## 2.2 Fasciolose e medidas de controle

A patogenia da fasciolose está relacionada com a quantidade de metacercárias ingeridas e o tempo que o parasito se mantém no organismo do hospedeiro (DE SOUSA, MARTINS, NUNES, 2013). Os parasitos jovens durante migração pelo parênquima hepático acabam por induzir intensas reações inflamatórias, sendo estas caracterizadas por hemorragias e necrose, bem como por áreas de fibrosamento, culminando por vezes na disfunção do órgão. Em seguida, estabelecem nos ductos biliares, ocasionando extensas áreas de erosão e necrose na mucosa ductal, associado a fenômenos obstrutivos que comprometem o escoamento da bilirrubina para o lúmen duodenal, favorecendo quadros de icterícia pós-hepática (SILVA et al., 1980; BECK, 1993; BERNE, 1994).

A fasciolose aguda caracteriza pela ocorrência de quadros de diarreia, febre, anemia, mucosas pálidas, dispneia, hepatomegalia, dor abdominal associado à palpação e ascite (SOULSBY, 1987; URQUHART et al., 1998), sendo raramente observada em bovinos e comumente em ovinos (RADOSTITS et al., 2000). Quando os animais ingerem poucas metacercárias durante um longo período de tempo, ocorre a fasciolose crônica, considerada a forma da doença mais comum caracterizada pelo estabelecimento de fibrose hepática (OAKLEY; OWEN; KNAPP, 1979). Enquanto algumas metacercárias atingem os ductos biliares induzindo nestes processos de colangites e de fibrosamento ductal, outras migram pelo parênquima provocando inflamação e edema (URQUHART et al., 1998). Os sintomas geralmente associados são anemia, perda de peso, queda na produção, infertilidade e condenação do fígado ao abate (CHARLIER et al., 2009; FOREYT, 2005; PRITCHARD et al., 2005).

Dentre os métodos de diagnóstico utiliza-se comumente o coproparasitológico, pelo qual é possível detectar a presença dos ovos de *Fasciola* spp. (LUQUE, 2014). Ademais, métodos de detecção de anticorpos séricos como ELISA (RADOSTITS et al., 2002; LUQUE, 2014) mostram-se também eficiente, uma vez que consegue detectar a presença do parasito de duas a seis semanas após a infecção (LUQUE, 2014). Com relação ao diagnóstico *post mortem* a presença de trematódeos, sendo esses jovens ou adultos, é suficiente para o fechamento do diagnóstico (RADOSTITS et al., 2002).

Atualmente recomendam-se estratégias de medidas de manejo animal e ambiental associadas ao tratamento dos indivíduos infectados em programas de controle da fasciolose. Dessa maneira o controle dos hospedeiros intermediários (uso de moluscidas e predadores naturais) à melhoria das condições ambientais e o uso de antiparasitários nos animais acometidos pela fasciolose. No entanto, sabe-se que os moluscidas, em sua grande maioria, acarretam prejuízos ao meio ambiente e não inviabilizam a possibilidade de recolonização das áreas afetadas pelos moluscos, tornando o processo de aplicação de difícil execução. Por estas razões, medidas alternativas de controle vêm sendo desenvolvidas, e algumas são baseadas na possibilidade do uso de plantas ou de seus derivados como agentes moluscidas (SILVA, MULLER, MATTOS, 1997).

A atividade das plantas quanto à sua ação moluscida se deve principalmente a presença de metabólitos secundários como taninos, saponinas, terpenoides, esteroides e flavonoides, dentre outros. A ação do composto no molusco provoca intoxicação e consequente desequilíbrio osmótico levando o indivíduo a morte por retração ou projeção da massa cefalopodal (CHIFUNDERA et al., 1993).

O controle da fasciolose por meio de tratamento químico demonstra ser eficiente em vários países quando este fator é associado a dados epidemiológicos. Ao administrar um antiparasitário dois objetivos são buscados: a eliminação do agente ou, o que é mais comum, manutenção de uma carga parasitária a níveis toleráveis pelo hospedeiro. Historicamente no Brasil a resistência parasitária de helmintos em bovinos já está estabelecida. A resistência ao triclabendazole tem sido documentada continuamente, e por isso, novas estratégias no tratamento da fasciolose têm-se feito necessárias (DUTHALER et al., 2010).

Vale ainda ressaltar a utilização de populações de organismos para o controle biológico de *F. hepatica*. Dentre as principais características desses antagonistas naturais, se devem a sua especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais. Para ser empregado comercialmente como um controlador biológico de parasitos de ruminantes o agente antagonista deve ter a capacidade de produção em escala industrial, baixo custo de produção, ter alta competitividade com as drogas tradicionais estabelecidas no mercado e tempo de sobrevivência no organismo do hospedeiro em formulações comerciais. Ademais

deve-se atentar para que as formulações ofereçam segurança para produtores, consumidores, animais tratados, ao meio ambiente e finalmente, que seja efetivo no controle do organismo alvo (GRONVOLD et al., 1996).

Embora a ciência e a indústria tenham somado esforços para prevenção e redução dos casos de fasciolose no Brasil e no mundo, esta enfermidade ainda gera graves problemas a saúde humana e animal, ocasionando grandes perdas à pecuária mundial (BERNARDO et al., 2011).

### **2.3 *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817)**

O caramujo *Pseudosuccinea columella* é um molusco gastrópode sendo a única espécie descrita e incluída no gênero *Pseudosuccinea*. São hermafroditas, reproduzindo predominantemente por fecundação cruzada. Taxonomicamente, encontra-se locado na ordem Basommathopora, demonstrando grande importância veterinária por atuar como hospedeiro intermediário no ciclo de vida de *F. hepatica* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Estes espécimes reproduzem em alta velocidade e conseguem ser facilmente levados por córregos e coleções de água, estabelecendo em bebedouros que são então abastecidos por tais recursos e quando em demasia de água, acabam por ficar em frestas ou ambientes úmidos dos quais podem permanecer em anidrobiose. (TRIPATHY; MUKHOPADHAYAY, 2015).

Segundo Paraense (1983, 1994) e Carvalho et al. (2005) a espécie *P. columella* apresenta em sua morfologia concha cônica, helicoidal, dextrógira, com espira pontiaguda e pequena, portando de quatro a cinco giros, suturas rasas, abertura medindo até  $2/3$  do comprimento total com cerca de 8 milímetros (mm) de largura e 17 mm de comprimento, além de ser frágil e translúcida. Tais organismos não possuem opérculo de fechamento da concha, seu corpo é curto e largo, sendo facilmente identificados pela sua antena curta e abertura da concha dextrógira, apresentando geralmente cor âmbar (Figura 3).



Figura 3 – Concha de *Pseudosuccinea columella*. Fonte: arquivo pessoal (2018).

O corpo possui coloração amarelo acinzentada contendo pequenas manchas brancas na borda interna dos tentáculos. O sistema reprodutor (Figura 4) apresenta vagina curta sem protuberância bulbar; a bolsa do oviduto pode ser vista perfeitamente à direita do oviduto, a espermateca mostra-se alongada e globóide; por sua vez, o prepúcio apresenta-se cilíndrico medindo 2 a 6 vezes o comprimento e o dobro da largura da bainha do pênis; já a rádula possui o primeiro dente lateral tricúspide (PARAENSE, 1983, 1994; CARVALHO et al., 2005; OHLWEILER et al., 2010).

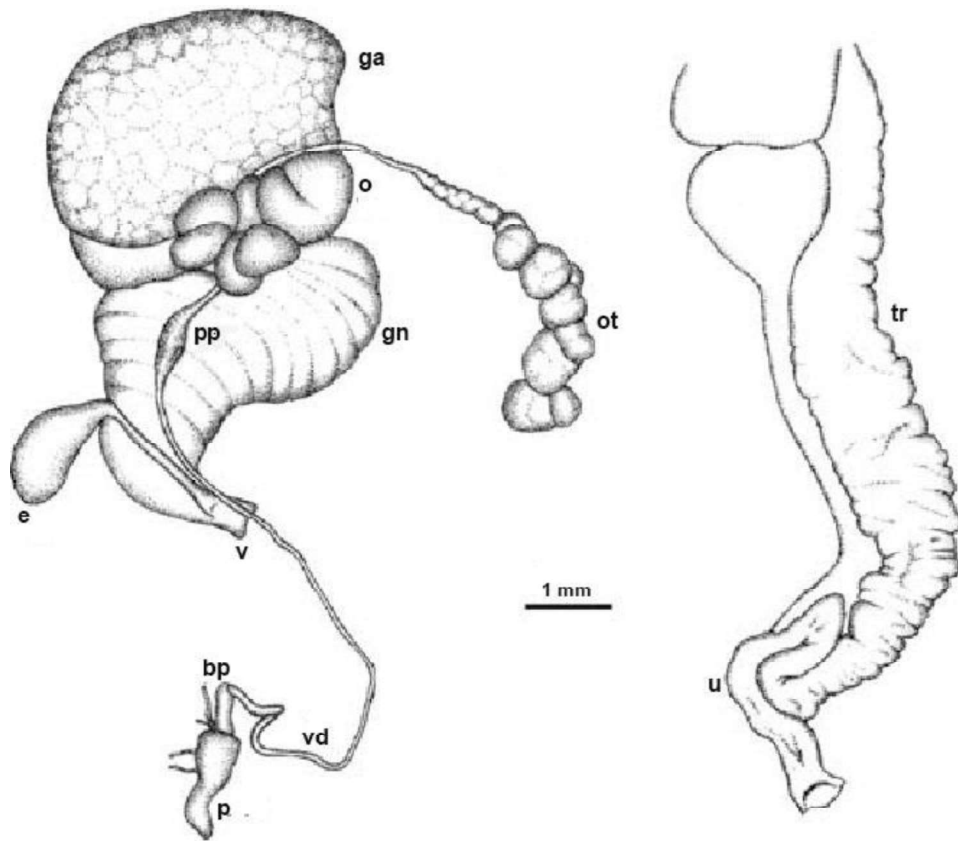


Figura 4 – Anatomia do sistema reprodutivo de *Pseudosuccinea columella*. Ovoteste (ot), tubo renal (tr) e ureter (u); estruturas masculinas: pênis (p), prepúcio (pp), vaso deferente (vd) e bainha do pênis (bp); estruturas femininas: oviduto (o), espermateca (e), glândula nidificante (gn), glândula do albúmen (ga) e vagina (v). Fonte: Adaptado de POINTIER et al., 2007.

Em gastrópodes, os carboidratos estão estocados em moléculas de glicogênio e galactogênio, que por sua vez, estão localizados em dois tipos principais de células do tecido conjuntivo: as células granulares e as do tecido conectivo vesicular (TUNHOLI-ALVES et al., 2013). Esses moluscos ovipõem massas ovígeras (Figura 5), contendo substância coloidal, ricas em galactogênio. O tamanho da massa é proporcional ao tamanho do caramujo e depende de condições fisiológicas. O galactogênio está restrito à glândula de albúmen, situada na porção feminina do trato reprodutivo dos adultos pulmonados. A sua síntese é destinada aos ovos, sendo a reserva mais nutritiva para os embriões. Esta fonte energética também pode ser requisitada como um recurso de emergência, as reservas de glicogênio estejam esgotadas. A glândula de albúmen é responsável pela produção do fluido perivitelínico, rico em galactogênio e proteínas (GOUDSMIT, 1972, 1973).

A secreção do galactogênio é do tipo apócrina, de acordo com Nieland e Goudsmit, (1969). O fluido perivitelínico envolve cada ovo, conforme ele passa ao longo do ducto hermafrodita formando uma camada perivitelínica que também é absorvida pelas células do embrião (GOUDSMIT, 1972, 1973).

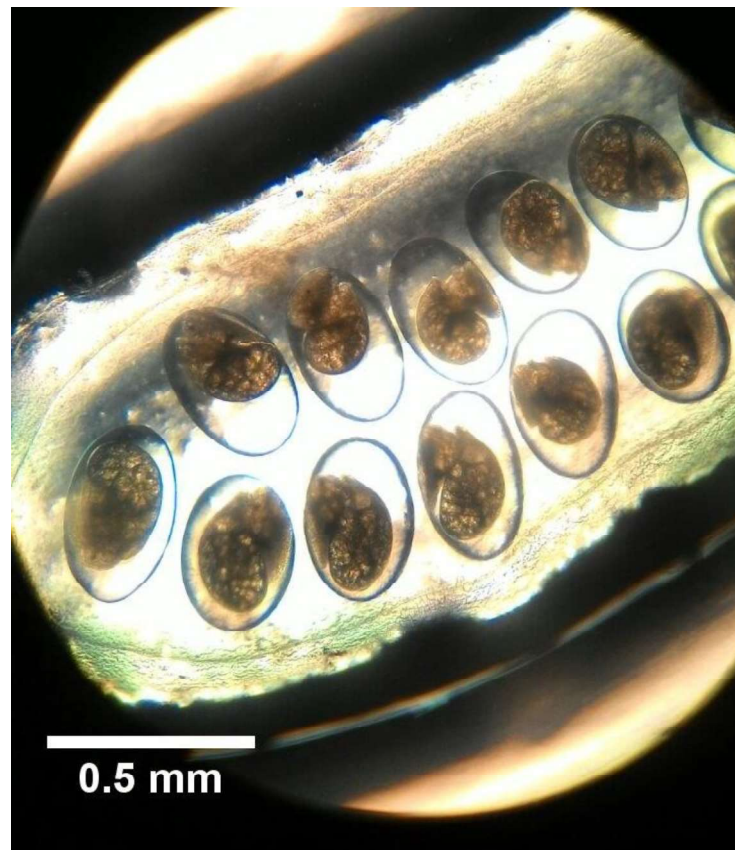


Figura 5 – Massa ovígera com ovos embrionados de *P. columella*, visto em microscópio ótico. Fonte: arquivo pessoal (2018)

Segundo estudos epidemiológicos, tal espécie apresenta ampla distribuição geográfica no país, sendo encontrada naturalmente infectada por *F. hepatica* em diversos estados como Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná (OHLWEILER et al., 2010; MEDEIROS et al., 2014).

## **2.4. Medidas de controle do caramujo *P. columella* (Say, 1817)**

### **2.4.1 Controle físico**

Segundo Knubben-Schweizer et al. (2010) a utilização do pastejo dos animais em áreas com a presença de caramujos apenas por um período de oito semanas, que está relacionado ao período pré-patente do parasito, poderá reduzir as chances de infecção, desde que antes, como medida de prevenção, os animais acometidos sejam tratados com anti-helmínticos. O benefício de um manejo estratégico de pastagem está na redução da contaminação do pasto por ovos de *F. hepatica* que conseqüentemente possam contribuir para parasitar seus hospedeiros intermediários.

A identificação e o mapeamento dos habitats dos caramujos podem subsidiar a elaboração de planos de pastoreio que evitem a utilização das áreas de alto risco de infecção (RADOSTITS et al., 2000).

Uma prática extremamente importante que pode ser utilizada é o emprego da drenagem de regiões alagadas e a manutenção de valas e bebedouros (ROBERTS; SUHARDONO, 1996; RADOSTITS et al., 2000). Acha e Szyfres (2003) citam que a remoção da vegetação marginal de cursos de rios previne a formação de habitats favoráveis ao desenvolvimento dos moluscos. Em adição, a limpeza de bebedouros ou tanques de água para o gado se faz necessário, por contribuir na remoção dos moluscos advindos de abastecimento de afluentes.

### **2.4.2 Controle químico**

As substâncias químicas moluscidas são utilizadas para a diminuição ou extermínio da população malacológica em que se pretende atuar, sendo estas classificadas em dois subtipos: os sintéticos e os naturais. Os fármacos sintéticos



são os mais utilizados e destes estima-se que existam mais de 7.000 produtos que já foram testados para esta finalidade, dentre os quais destacam o sulfato de cobre, hidróxido de cálcio, N-tritilmorfolina, Niclosamida e Gramoxone (REY, 2001).

Silva et al. (2008) destacaram o desenvolvimento de resistência dos caramujos a algumas substâncias químicas com ação moluscicida, favorecida provavelmente em decorrência ao uso indiscriminado destas formulações, bem como devido à baixa seletividade com que se apresentam no ambiente. Tais aspectos incentivam a procura por moluscicidas biodegradáveis, elaborados a partir de extratos vegetais, contribuindo para redução da contaminação ambiental, maior controle de doenças em animais de produção, e melhor retorno econômico com consequente redução de resíduos contaminantes nos produtos de origem animal.

### 2.4.3 Controle biológico

Alternativas como a utilização de nematoides entomopatogênicos e fungos configuram como medidas eficientes no controle da densidade populacional de moluscos hospedeiros (ARAUJO et al., 2009; DUARTE et al., 2015).

Os fungos e nematoides entomopatogênicos são agentes parasitários facultativos encontrados naturalmente em solos, que sabidamente demonstram potencial moluscicida (TUNHOLI et al., 2011; TUNHOLI et al., 2017 a,b).

Tendo em vista a aplicabilidade de fungos no controle de parasitos e hospedeiros intermediários, estudos sobre a susceptibilidade de massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* foi relatada por Duarte et al. (2015).

Braga et al. (2007) e Dias et al. (2013) avaliaram em estudo in vitro a ação anti-helmíntica das espécies de fungos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia* e seu efeito lítico que sobre ovos de *F. hepatica* e *Schistosoma mansoni*. Segundos tais autores, apenas *P. chlamydosporia* apresentou todos os efeitos desejados, dos quais resultam na inviabilidade dos

organismos, principalmente em ovos. Visando assim estudos em helmintos e demonstrando ser um potencial candidato a controlador biológico destes parasitos.

## **2.5 Aplicabilidade de fungos helmintófagos**

Segundo Garrard, Ross e Taylor, (2016), o controle biológico é um sistema de manejo de pragas ou doenças que utiliza um organismo para controlar outro.

A utilização de anti-helmínticos tem se mostrado como uma maneira eficaz de controlar o parasitismo. Entretanto, seu uso indiscriminado propiciou o surgimento de helmintos resistentes a diferentes classes de fármacos. Esta problemática tem incentivado inúmeros pesquisadores a desenvolverem medidas alternativas de controle de parasitos de relevância médica e médico-veterinária. Uma destas medidas é a utilização de microrganismos como agentes de controle biológico, tais como vírus, bactérias e fungos nematófagos (BRAGA; DE ARAÚJO, 2014).

Como principais decompositores, os fungos acabam por desempenhar um papel importante na degradação da matéria orgânica a moléculas inorgânicas na maioria dos ecossistemas. De maneira geral, grande parte dos fungos é considerada saprofítico ou simbiótico (incluindo parasitas). No entanto, uma pequena parcela (menos do que 0,5%) é considerada carnívora e possui a capacidade de capturar e digerir larvas de nematoides mediante o desenvolvimento de armadilhas especializados (LIU; XIANG; CHE, 2009; YANG et al., 2012).

Pesquisas quanto à ecologia de fungos nematófagos sugerem que este grupo possui distribuição mundial, sendo isolados nos mais diversos tipos de clima e habitats examinados (GRAY, 1987). Neste contexto, pode ser relativamente fácil isolar fungos nematófagos, particularmente de solos ricos de matéria orgânica em decomposição (LI; HYDE; ZHANG, 2014)

Três grupos de fungos atuam de diferentes formas sobre helmintos: (i) os endoparasitos, que se alimentam das porções internas dos helmintos e apresentam a desvantagem de dependerem destes para se propagarem; (ii) os fungos predadores, que predam as larvas de helmintos no meio e as capturam através da formação de um sistema diverso de armadilhas e; (iii) os fungos ovicidas ou

oportunistas, que apresentam atividade sobre ovos de helmintos parasitos de animais interferindo em sua embriogênese. Os dois últimos grupos são constituídos por representantes que produzem formas de resistência e de propagação, os clamidósporos (DIAS et al., 2013)

### **2.5.1 Taxonomia e evolução**

Os fungos nematófagos são encontrados em todos os grupos do reino Fungi, desde os fungos inferiores (Oomycetes, Chytridiomycetes e Zigomicetos) até os superiores (Ascomycota e Basidomycota). A maioria dos fungos nematófagos, incluindo as espécies predadoras e endoparasitas, é classificada como ascomycotas (BIRGIT; HANS-BÖRJE; ANDERS, 2006).

Estudos sugerem que o hábito parasitário apresentado por fungos predadores evoluiu entre os fungos celulolíticos ou lignolíticos como resposta as deficiências de carbono e nitrogênio encontradas em determinados habitats (BARRON, 1992). Em ambientes (como solos) com baixa concentração de carbono e nitrogênio, os nematoides ali presentes representam importante fonte de nitrogênio e carboidratos, que é requerido durante o crescimento fúngico. Muitos fungos conidiais predadores são realmente bons saprófitos e podem utilizar celulose e outros polissacarídeos como fontes de carbono. Notavelmente, a capacidade saprofítica varia em conformidade a atividade parasitária e predadora dos fungos em questão. As espécies com alta atividade parasitária crescem mais devagar e possuem requisitos nutricionais especiais do que as espécies com baixa atividade parasitária (WOOD et al., 2007). Assim, parece que sobre tempo evolutivo, as espécies parasitas mais especializadas perderam parte da atividade das enzimas envolvidas em metabolismo saprofítico. O fato de que várias espécies identificadas como teleomorfos são classificadas como ascomicetos de captura de larvas de nematoides, bem como saprófitos, suportando a hipótese de que os fungos predadores evoluíram a partir de células celulolíticas ou fungos lignolíticos (BIRGIT; HANS-BÖRJE; ANDERS, 2006)

Em parte, o carnivorismo é algo raro entre os fungos. Entretanto, os pesquisadores têm especulado que este comportamento aparentemente incomum evoluiu no decorrer de vários anos. Em ambientes pobres em nitrogênio, a captura deste elemento por fungos carnívoros ficaria limitada a predação de pequenos animais, uma vantagem competitiva em relação aos fungos saprófitos (BARRON, 2003). Mesmo com esta evidência, fungos carnívoros não são abundantes em nichos ambientais que apresentam presas de pequenos animais prontamente acessíveis. Na maioria dos ambientes em que os fungos saprófitos germinam a despesa de nutrientes e energia para a produção de dispositivos de captura de larvas de nematoides reduz a competitividade entre os fungos carnívoros, uma vez que a produção de armadilhas requereria gasto energético adicional (SCHOCH et al., 2009). Um problema com esta hipótese é que, ao contrário dos fungos simbióticos, que evoluíram independentemente de fungos saprófitos, parece que fungos carnívoros evidentemente evoluíram de fungos saprófitos, conforme indicado em estudos filogenéticos. Além disso, a degeneração da capacidade carnívora parece caracterizar a evolução desses fungos (KOZIAK et al., 2007).

Pesquisas sobre novas alternativas capazes de controlar os helmintos gastrointestinais em pequenos ruminantes têm sido amplamente encorajadas. Nesse sentido, o uso de fungos nematófagos mostrou-se promissor em várias experiências em todo o mundo. Após a passagem pelo trato gastrointestinal, os fungos são eliminados junto com as fezes no ambiente, onde colonizam o esterco e entram em contato com as larvas eclodidas. Os fungos produzem armadilhas que levam à morte das larvas, diminuindo assim o número de estágios infectantes na pastagem e evitando a reinfecção animal. Segundo Dias et al. (2013) dentre as espécies de fungos nematófagos destacam-se *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium*, respectivamente larvicida e ovicida, por serem as mais estudadas e apresentarem maior potencial de comercialização. Ambas as espécies produzem clamidósporos que são altamente resistentes e capazes de passar pelo trato gastrointestinal de animais em matrizes de alginato de sódio. No entanto, pode haver diferenças na ação de diferentes isolados dessas espécies, como já foi mencionado em várias investigações em diferentes regiões (VILELA et al., 2016)

### **2.5.2 Aspectos comportamentais e bioquímicos de fungos como agentes de controle biológico de helmintos**

Os nematoides e fungos endoparasíticos são encontrados nos mais diversos tipos de ambientes e solos onde sobrevivem principalmente como saprófitos. A capacidade de utilizar larvas de nematoides como fonte de nutrientes adicional, confere a este grupo aplicabilidade em programas de controle biológico de parasitos. Os fungos desenvolvem sua fase parasitária quando alteram a sua morfologia levando a formação de armadilhas ou esporos maduros (BIRGIT; HANS-BÖRJE; ANDERS, 2006).

Segundo Degenkolb e Vilcinskas (2016), a ecologia química de fungos nematófagos está ainda longe de ser entendida. No momento, poucas pesquisas têm sido realizadas a fim de caracterizar quimicamente metabólitos oriundos de fungos nematófagos com potencial nematicida. Sabendo dos impactos que vários agentes químicos causam, especialmente ao ambiente e a saúde humana e de animais, a utilização de espécimes antagonistas para controle biológico, tem sido uma grande saída para vários pesquisados e uso na sociedade.

A maioria das espécies dos fungos nematófagos está inserida no grupo dos predadores de nematoides. Estes fungos produzem um extenso sistema de hifas, ao longo das quais formam armadilhas (com produção de enzimas hidrolíticas, especialmente proteases), que capturam e retém as larvas de nematoides (BRAGA et al., 2014; SOARES et al., 2015). O aprisionamento por armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematoide, e logo depois pelo crescimento hifal em direção a cavidade pseudocelomática do nematoide onde verifica a digestão dos conteúdos internos. As hifas vegetativas são diferenciadas em seis estruturas de captura (armadilhas): hifas adesivas não diferenciadas, sendo estas as mais encontradas; ramificações de hifas que sofrem anastomoses, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas, onde em algumas vezes podem se unir formando redes adesivas simples bidimensionais; nódulos adesivos; anéis constritores e anéis não constritores (LELIS et al., 2014).

Já os fungos ovícidias parasitam ovos, cistos, helmintos e fêmeas de fitonematóides. Eles penetram nos ovos através de hifas vegetativas, e mediante ação mecânica, associada ou não à liberação de exoenzimas, como quitinase e protease, comprometem o tegumento ovular, interferindo diretamente no processo de embriogênese (GALVANO; FORCHIASSIN, 2010; LELIS et al., 2014; ESCUDERO et al., 2016)

A ação desses fungos é baseada na formação de hifas que penetram na casca do ovo através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade do tegumento ovular contribuindo para a expansão de seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada adjacente quitínica e lipídica. Como resultado desse processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina torna-se vacuolizada e a camada de lipídios apresenta-se dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior. Neste grupo, destaca-se a espécie *Verticillium chlamyosporium*, atualmente denominada *Pochonia chlamyosporia* devido às observações e análises filogenéticas das subunidades do rRNA e por apresentar a capacidade de produzir clamidósporos (DE CARVALHO et al., 2014; LELIS et al., 2014)

### **2.5.3 Diversidades de estruturas de infecção-organismo**

Os fungos nematófagos apresentam uma grande diversidade não apenas no que se refere à classificação taxonômica, mas também em relação às estruturas de captura formadas. O tipo das estruturas de captura de nematoides formadas depende da espécie ou mesmo da estirpe relacionada, bem como das condições bióticas e abióticas. O mais importante fator biótico são as larvas de nematoides vivos, que não só induzem a formação de estruturas de captura ao tocar o micélio, mas também servem como fonte de alimento para os fungos (BIRGIT; HANS-BÖRJE; ANDERS, 2006).

Os fungos que parasitam ovos de helmintos parasitos utilizam de uma estratégia diferente. Por exemplo, as hifas de *P. chlamydosporia* e outros fungos crescem em direção aos ovos e o apressório é formado nas pontas de hifas que penetram através do tegumento ovular. Os fungos então digerem o conteúdo do ovo, tanto imaturos quanto maduros (contendo juvenis). O desenvolvimento das estruturas de infecção pode ser observado por microscopia de contraste de luz, vídeo e por microscopia eletrônica de varredura e transmissão (MEV e MET). A MET revelou uma característica comum observada em todas as atividades formadoras de armadilhas: a presença de numerosos grânulos citossólicos, os chamados corpos densos que são formados diretamente no início da armadilha. As hifas normais (vegetativas) invariavelmente carecem de corpos densos. Tais estruturas desenvolvem-se a partir de regiões especializadas do retículo e exibem atividades de catalase e de aminoácidos oxidase imprescindíveis no processo de penetração e digestão da larva do nematoide. Em contraste com as armadilhas, os conídios de fungos endoparasíticos não contêm corpos densos (BIRGIT; HANS-BÖRJE; ANDERS, 2006).

#### **2.5.4 Serino-proteases de *Pochonia chlamydosporia* e processo de melanização**

A serino-protease alcalina, VCP1, secretada por *P. chlamydosporia*, é imprescindível na etapa de infecção do fungo aos ovos e larvas de nematoides. Esse processo faz com que a membrana vitelínica e cutícula sejam removidas das estruturas helmínticas (ZARE; GAMS; EVANS, 2001).

A diversidade de virulência verificada em diferentes cepas de *P. chlamydosporia* é em parte conferida pela capacidade destas em produzir melanina e urease. A melanina contribui para virulência por conferir resistência às células fúngicas contra o ataque das células imunológicas efectoras (GUSTAVO et al., 2014). Gomes et al., (2010) relatam que a atividade da urease tem sido implicada como fator primário na patogênese da doença e sua atividade pode ser espécie e/ou sítio de infecção específica. O interesse em aspectos fenotípicos, tais como diâmetro de

cápsula, hidrólise de ureia, atividade fenoloxidase, vem aumentando por constituírem a virulência do fungo (BUCHANAN; MURPHY, 1998).

O papel principal de fenoloxidase na melanogênese é converter fenóis para quinonas, que posteriormente se polimerizam a melanina. O processo de melanização mais comumente descrito é verificado contra ovos de parasitoides em moscas da fruta (CARTON; NAPPI, 2001). A melanina é formada a partir do aminoácido fenilalanina, que inicialmente é hidroxilada a tirosina por fenilalanina hidroxilase. Em seguida, a tirosina é então hidroxilada por fenoloxidase ativo produzindo DOPA (Dihidroxifenilalanina). DOPA é oxidado para dopaquinona, a qual imediatamente é convertida em dopacromo espontaneamente através de reações não enzimáticas. Um rearranjo estrutural não enzimático de dopacromo, seguida por uma descarboxilação gera 5-6 dihidroxindol (DHI). Dihidroxindol é então oxidado por fenoloxidase para formar indolquinonas, as quais finalmente são polimerizadas a eumelanina (NAPPI; CHRISTENSEN, 2005).

A melanina é um pigmento hidrofóbico e negativamente carregado, sintetizado por polimerização oxidativa de compostos fenólicos (LANGFELDER et al., 2003). A digestão intracelular dos triacilgliceróis dos corpos lipídicos armazenados disponibiliza os ácidos graxos, utilizados nos processos bioquímicos de transformação de energia e na formação de substratos para atividades de síntese (RUCH et al., 1991), e produz o glicerol. Este se acumula no apressório e é responsável pela pressão de turgor necessária para o processo de penetração, (THINES et al., 2000). Está estabelecido na literatura que para que a pressão de turgor aconteça, é necessário que o apressório esteja melanizado (LANGFELDER et al., 2003). Acredita-se que a melanina diminui a permeabilidade do apressório e aumenta a resistência mecânica, facilitando a acumulação das moléculas geradoras da pressão de turgor dentro do mesmo, como o glicerol (THINES et al., 2000).

### **2.5.5 Mecanismos de reconhecimento, especificidade e infecção do hospedeiro**

A questão de como os fungos nematófagos reconhecem a presa é complexa. Nenhuma especificidade simples no hospedeiro foi encontrada em qualquer das



espécies predadoras, enquanto as experiências com fungos endoparasitos como *Drechmeria coniospora* revelaram um pouco maior especificidade do hospedeiro. No entanto, autores têm demonstrado a ocorrência de eventos de reconhecimento químico-celular estabelecida em várias etapas da interação entre fungos e nematoides. Nematoides são atraídos pelos micélios dos fungos induzindo a formação de armadilhas e esporos. Isto é seguido por um 'curto alcance' ou comunicação contato dependente: adesão. Esta etapa edifica-se mediante interação estabelecida entre hidrato de carbono (lecitina) no fungo e receptor de carboidrato situado na cutícula do nematoide. O reconhecimento do hospedeiro mostra-se importante para os passos subsequentes da infecção, incluindo a etapa de penetração da cutícula do nematoide (ROSÉN et al., 1996).

Os helmintos são atraídos por compostos liberados do micélio e armadilhas de fungos predadores, bem como de esporos de fungos endoparasitos. Tanto a morfologia quanto a consequente capacidade saprófita/parasitária influencia fortemente a atratividade dos fungos. Fungos que detém maior atividade parasitária parecem apresentar atração mais forte para com as larvas de nematoides quando comparado com as espécies saprófitas (BIRGIT; HANS-BÖRJE; ANDERS, 2006).

O contato e a aderência de helmintos às armadilhas e esporos de fungos nematófagos podem ser observados ao microscópio eletrônico. Em *Arthobothrys oligospora*, as redes são cercadas por uma camada de fibrilas extracelulares mesmo antes da interação com os nematoides. Após o contato, estas fibrilas se dirigem perpendicularmente à superfície do hospedeiro, provavelmente para facilitar a ancoragem e invasão fúngica do nematoide. A composição química da superfície destas fibrilas não é conhecida em detalhe, mas sabe-se da existência tanto de proteínas quanto de polímeros de carboidratos (BIRGIT; HANS-BÖRJE; ANDERS, 2006).

A adesão das armadilhas ao nematoide resulta numa diferenciação dos fungos. Em *A. oligospora*, verifica a formação de um tubo de penetração denominado apressório que perfura a cutícula do helminto. Este passo envolve provavelmente tanto a atividade de enzimas hidrolíticas que solubilizam as macromoléculas da cutícula como a atividade de uma pressão mecânica gerada pelo fungo durante etapa de crescimento. Vários tipos de proteases foram isoladas de fungos nematófagos capazes de hidrolisar proteínas estruturais presentes na

cutícula de larvas de helmintos. Em fungos endoparasitas, como *D. coniospora*, uma protease semelhante à quimiotripsina foi caracterizada e responsabilizada pelo processo de penetração hifal. Estudos mais detalhados da subtilisina PII produzida por *A. oligospora* indicaram que este tipo de protease pode ter um número de funções variadas (AHMAN et al., 1996; BONANTS et al., 1995). Assim, além de estar envolvida diretamente na etapa de penetração e digestão da cutícula e dos tecidos de nematoides infectados, a PII parece ter uma atividade nematotóxica

Quando há a penetração das hifas do fungo nas larvas dos helmintos, estas digerem o organismo, através de secreções enzimáticas. Uma vez dentro do corpo, espécime como *A. oligospora* incham sobre o hospedeiro, formando uma bolha de infecção. O desenvolvimento do bulbo e o trofismo dessas hifas ocorre em paralelo com mudanças nas organelas envolvidas na fisiologia do fungo (HUANG et al., 2004). Essas organelas geralmente contêm retículos endoplasmáticos bem desenvolvidos e estão envolvidos nas células de armadilha ou formas de aprisionamento de hospedeiros. Dentre essas organelas, também chamados de corpos densos, podem haver gotículas de lipídios, que se acumulam nas hifas tróficas e que provavelmente estão envolvidas na assimilação e armazenamento de nutrientes obtidos do nematoide infectado (NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLIND, 2006).

Dentre os processos de digestão e captura, existem ainda os anéis constritores dos fungos, embora os padrões de infecção dos nematódeos pelos fungos predatórios, sejam através de camadas adesivas (redes, hifas ou bulbos/bolhas), que ainda pouco são estudadas (NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLIND, 2006).

Estudos em microscopia eletrônica, evidenciaram que durante a expansão da célula anelar, a célula externa da parede das células do anel é rompida ao longo de uma linha definida na superfície do anel. Isso foi sugerido que esta libertação de pressão na parede conduzirá a uma rápida absorção de água, seguido por uma dilatação da elástica parede interna das células do anel. A via de transdução de sinal envolvida na inflação das células do anel tem sido examinada em *Arthrobotrys dactyloides* (CHEN et al., 2001). Nisso, o fungo evidencia a pressão exercida por um nematoide, que no anel ativa as proteínas G dessas células hifais. Dessa ativação,

leva a um aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, ativando a calmodulina e, finalmente, a abertura da água pelos canais (NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLIND, 2006).

### 3. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. **Pan American Health Org**, 2003.

ÅHMAN, J. et al. Sequence analysis and regulation of a gene encoding a cuticle-degrading serine protease from the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Microbiology**, v. 142, n. 7, p. 1605-1616, 1996.

ALEIXO, M. A. et al. *Fasciola hepatica*: Epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 36, n. 3, p. 1451–1465, 2015.

ANDREWS, P.; THYSSEN, J.; LORKE, D. The biology and toxicology of the molluscicide, Bayluscide. **Pharmacology & Therapeutics**, v.19, p.245-295, 1983.

ARAUJO, J. M et al. Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 86-89, 2009.

AZIZ, N. A. et al. Distribution of *Angiostrongylus vasorum* and its gastropod intermediate hosts along the rural–urban gradient in two cities in the United Kingdom, using real time PCR. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 56, 2016.

BARRON, G. L. Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**, v. 9, p. 311-326, 1992.

BARRON, G. L. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. **Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 3-9, 2003.

BECK, A.A.H. Fasciolose. **A Hora Veterinária**, v. 13, n.75, p.65-70, 1993.

BENKENDORFF, K.; DAVIS, A. R.; BREMNER, J. B. Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: an assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 78, n. 2, p. 109-118, 2001.

BENNEMA, S. C. et al. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 35-41, 2014.

BERNARDO, C. C et al. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 49-53, 2011.

BERNE, M. E. A. Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de *Fasciola hepatica* através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnóstico. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, 168p., 1994.

BIRGIT, N.; HANS-BÖRJE, J.; ANDERS, T. Nematophagous fungi. **Encyclopedia of life sciences**, v. 10, 2006.

BOWMAN, D. D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 10th Revis ed. St Louis: Elsevier - Health Sciences Division, 2014.

BRAGA, F. R. et al. Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 356-358, 2007.

BRAGA, F. R. et al. Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 264-268, 2010.

BRAGA, F. R. et al. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 116–118, fev. 2011.

BRAGA, F. R. et al. Zoonotic neglected tropical diseases: New approaches to combat old enemies. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

BRAGA, F. R.; DE ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 71-82, 2014.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.

BONANTS, P. J. M et al. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology**, v. 141, n. 4, p. 775-784, 1995.

BURGER, H. J.; STOYE, M. Parasitological problems associated with recycling of animal excretions. KELLY, WR Animal and human hazards associated with the utilization of animal effluents. **Office for the Official Publications of the European Communities**, Luxembourg, p. 24-84, 1978.

CARTON, Y.; NAPPI, A. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. **Immunogenetics**, v. 52, n. 3-4, p. 157-164, 2001.

CARVALHO, O. S.; PASSOS, L. K. J.; MENDONÇA, C. L. F. G.; CARDOSO, P. C. M.; CALDEIRA, R. L. Moluscos de Importância Médica no Brasil. Belo Horizonte: **Fio Cruz/ Centro de Pesquisas René Rachou**, 2005, 51p.

CHARLIER, J. et al. Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters. **Veterinary Parasitology**, 2009.

CHEN, Junji et al. Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. **Journal of molecular biology**, v. 314, n. 4, p. 683-694, 2001.

CHIFUNDERA, K.; BALUKU, B.; MASHIMANGO, B. Phytochemical screening and molluscicidal potency of some Zairean medicinal plants. **Pharmacological research**, v. 28, n. 4, p. 333-340, 1993.

DE CARVALHO, L. M. et al. Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. S1, p. 109-114, 2014.

DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 3799–3812, 29 dez. 2016.

DIAS, A. S. et al. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. **Parasitology research**, v. 112, n. 6, p. 2131-2136, 2013.

DE OLIVEIRA, E. L. Prevalência e fatores associados à distribuição da *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em bovinos dos municípios de Careacú e Itajubá, região da Bacia do Rio Sapucaí, Minas Gerais. **Embrapa Caprinos e Ovinos - Dissertação (ALICE)**, 100f. 2008.

DE SOUSA, D. R., MARTINS, I. V. F., NUNES, de. C. L. Capítulo 11- Mecanismos de fibrogênese hepática em bovinos com fasciolose crônica. **Tópicos especiais em Ciência Animal II**, p. 110, 2013.

DUARTE, G. F. et al. New insights into the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. **Journal of invertebrate pathology**, v. 125, p. 31-36, 2015

DUTHALER, Urs et al. *Fasciola hepatica*: comparison of the sedimentation and FLOTAC techniques for the detection and quantification of faecal egg counts in rats. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 2, p. 161-166, 2010.

ESCUADERO, N. et al. Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Fungal biology**, v. 120, n. 4, p. 572-585, 2016.

ESTEVEZ, I. et al. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, v. 113, n. 8, p. 867-876, 2009.

FRASSY, L. N. et al. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 102-104, 2010.

FOREYT, W. J. **Parasitologia Veterinária - Manual de Referência**. 5ª ed. Roca, p. 240 2005.

GALVAGNO, A. M; FORCHIASSIN, F. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. 2ed. Educs. p.638, 2010.

GARRARD, T. A.; ROSS, K. E.; TAYLOR, M. J. Biocontrol for environmental control of the human parasite, *Strongyloides stercoralis*: A necessary next step. **Biological control**, v. 100, p. 25-28, 2016.

GOMES, F. S. et al. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 43–49, dez. 2010.

GÓMEZ, B. L. et al. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infection and Immunity**, 2001.

GONNERT, R. Results of laboratory and field trials with the molluscicide Bayer 73.

**Bull WHO**, v.25, p.483-501, 1961.

GOUDSMIT, E.M. Carbohydrate and carbohydrate metabolism in molluscs, **Chemical Zoology, Mollusca**, v. 7, p. 219-243, 2014.

GRAY, F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 245–304, 1987.

GRØNVOLD, J. et al. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v. 70, n. 4, p. 291-297, 1996.

GOUDSMIT, E.M. Carbohydrate and carbohydrate metabolism in molluscs, p. 219-243. In: FLORKIN, M.; SCHEER, B.T. (ed). **Chemical Zoology**, Mollusca, v. 7. Academic Press, New York, 567 p. 1972.

GOUDSMIT, E.M. The role of galactogen in pulmonate snails. **Malacology**, v. 6, p. 58-59, 1973.

GUSTAVO, F.C.K. et al. Macrophage autophagy in immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Paracoccidioides* spp. **Mycoses**, v. 57, p. 82-83, 2014.

HOFSTÄTTER, B. D. M. et al. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* eggs. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 1, p. 28-31, 2017.

HOWELL, A. et al. Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, n. 1-2, p. 41-48, 2015.

HUANG, X.W.; ZHAO, N.H.; ZHANG, K.Q. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Research Microbiology**, v. 155, p. 811–816, 2004.

KNUBBEN-SCHWEIZER, G. et al. Bovine fasciolosis in Switzerland: relevance and control. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 152, p. 223-229, 2010.

KOZIAK, A. T. E. et al. Phylogenetic analyses of *Nematoctonus* and *Hohenbuehelia* (Pleurotaceae). **Botany**, v. 85, n. 8, p. 762-773, 2007.

LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 2, p. 143-158, 2003.



LELIS, R. T. et al. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Acta tropica**, v. 139, p. 88-92, 2014.

LI, J.; HYDE, K. D.; ZHANG, K. Q. Methodology for studying nematophagous fungi. **Nematode-Trapping Fungi**. Springer, Dordrecht, p. 13-40, 2014.

LIMA, W. dos S. et al. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 27-30, 2009.

LIU, X.; XIANG, M.; CHE, Y. The living strategy of nematophagous fungi. **Mycoscience**, v. 50, n. 1, p. 20-25, 2009.

LOKER, E. S. Gastropod immunobiology. **Invertebrate immunity**. Springer, Boston, MA, p. 17-43, 2010.

LUQUE, J. L. Classe Trematoda. In: MONTEIRO, S. G. (Org.). **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2. ed. Roca, v. 1, cap. 19, p. 181-190., 2014.

LÝSEK, H.; STĚRBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Folia Parasitologica**, v. 38, p. 255-259, 1991.

MACHADO, P.A., 1982. The brazilian program for schistosomiasis control. **American journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 31, 76–86.

MANZANILLA-LOPEZ, R. H. et al. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, n. 1, p. 1, 2013.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M. et al. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 282, 2013.

MARTINS, I. V. F. **Cadernos de Parasitologia Veterinária**. 1. ed. Alegre: Edufes, 2007.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1255-1278, 2005.

MATTOS, M.J.T de et al. Ocorrência estacional e bioecologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Lymnaeidae) em habitat natural no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, p. 248-52, 1997.

MAURE, E. A. P. et al. Dinâmica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 00–00, 1998.

MEDEIROS, C. et al. Spatial distribution of lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 235-252, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica**: Diretrizes Técnicas: Programa de Vigilância e Controle de Esquistossomose (PCE). 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008, 178p.

MOLENTO, M. B. et al. Bovine fascioliasis in Brazil: Economic impact and forecasting. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 12, p. 1-3, 2018.

MORRIS-JONES, R. et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4026-4033, 2003.

NAPPI, A. J.; CHRISTENSEN, B. M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 443–459, 2005.

NIELAND, M.L; GOUDSMIT, E.M. Ultrastructural observations on galactogen formation and secretion in the albumin gland of *Helix pomatia*. **Journal of Investigation of dermatology**, v. 52, p. 392, 1969.

OAKLEY, G. A.; OWEN, B.; KNAPP, N. H. Production effects of subclinical liver fluke infection in growing dairy heifers. **The Veterinary record**, v. 104, n. 22, p. 503-507, 1979.

OHLWEILER, F. P.; TAKAHASHI, F. Y.; GUIMARÃES, M. C. de A.; GOMES, S. R.; KAWANO, T. Manual de Gastrópodes Límnicos e Terrestres do estado de São Paulo associados ás Helmintoses. Porto Alegre: Rede Editora, p.25-31, 2010.

PARAENSE, W. L. *Lymnaea columella* in northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, n.4, p.477-482, 1983.

PARAENSE, W. L. *Lymnaea peregrina* Clessin, 1882, synonym of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Gastropoda: Lymnaeidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p.373-384, 1994.

PIERI, O. S.; BARBOSA, F. S. Perspectivas no controle ambiental dos moluscos vetores da esquistossomose. **Tópicos em malacologia médica**, p. 239-252, 1995.

PRITCHARD, G. C. et al. Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. **Veterinary Record**, v. 157, n. 19, p. 578-582, 2005.

RADOSTITS, O. M. et al. Coliform mastitis caused by *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Enterobacter aerogenes*. **Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses**, v. 9, p. 639-650, 2000.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, L. G. J.; HOUSTON, D. M. Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 166-174, 2002.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA. 2001.

ROBERTS, J. A. et al. Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8-9, p. 971-981, 1996.

ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2763-2776, 2009.

ROCHA, L.F.N.; TAI, M.H.H.; SANTOS, A.H.; ALBERNAZ, D.A.S.; HUMBER, R.A.; LUZ, C. Occurrence of invertebrate-pathogenic fungi in a Cerrado ecosystem in Central Brazil. **Biocontrol Science Technology**, v.19, p.547–553, 2009.

ROSÉN, S. et al. Molecular characterization of a saline-soluble lectin from a parasitic fungus: Extensive sequence similarities between fungal lectins. **European journal of biochemistry**, v. 238, n. 3, p. 822-829, 1996.

RUCH, D. G.; BURTON, K. W.; INGRAM, L. An occurrence of the glyoxylate cycle in basidiospores of homobasidiomycetes. **Mycologia**, v. 83, p. 821-825, 1991.

SARQUIS, O. et al. Effect of Bayluscide WP 70® on the kinetic behaviour of

*Biomphalaria straminea* in laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. suppl 1, p. 239–241, 1998.

SCHOCH, C. L. et al. The ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. **Systematic Biology**, v. 58, n. 2, p. 224-239, 2009

SERRA-FREIRE, N.M. et al. Reinvestigação sobre *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**, Ed. Extra, n. 1, p. 19-21, 1995.

SIDDIQUI, I. A.; ATKINS, S. D.; KERRY, B. R. Relationship between saprotrophic growth in soil of different biotypes of *Pochonia chlamydosporia* and the infection of nematode eggs. **Annals of Applied Biology**, v. 155, n. 1, p. 131-141, 2009.

SILVA, I.C da C. et al. Fasciolose. I. Incidência e importancia na bovino e ovinocultura do RS. **Lavoura arrozeira**, 1980.

SILVA, N. F. S. et al. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 11, p. 179-181, 2008.

SOARES, F. E. DE F. et al. Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 337-344, 2015.

SOULSBY, E. J. L. Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals. 7 ed. **Lea and Febiger**: Filadelfia, 1982.

STEPHENSON, W. Physiological and histochemical observations on the adult liver fluke, *Fasciola hepatica* L. I. survival in vitro. **Parasitology, Parasitology**, v. 38, n. 3, p. 116-122, 1947.

STRAUCH, D. Animal production and environmental health Science. (World Animal Science B6). Amsterdam: **Elsevier Science Publishers BV**, 1987. 324p.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary Parasitology**. 4. ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2016. 1032 p. v. 1.

THINES, E.; WEBER, R. W. S.; TALBOT, N. J. MAP kinase and protein kinase A - Dependent mobilization during of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1703-1718, 2000.

TONER, E. et al. Disruption of egg formation by *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with triclabendazole in the sheep host. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 79-89, 2011.

TRIPATHY, B.; MUKHOPADHAYAY, A. Freshwater molluscs of India: an insight of into their diversity, distribution and conservation. Aquatic Ecosystem: Biodiversity, Ecology and Conservation. **Springer**, New Delhi, 2015. p. 163-195.

TUNHOLI, V. et al. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Journal of invertebrate pathology**, v. 106, n. 2, p. 192-195, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V. M. et al. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the lipid metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2111-2116, 2013.

TUNHOLI, V. M. et al. Molluscicidal potential of *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, on *Lymnaea columella* (Gastropoda: Pulmonata): An alternative for biological control of fasciolosis. **Acta Tropica**, v. 173, p. 23-29, 2017a.

TUNHOLI, V. M. et al. Biological, biochemical and histological features of *Bradybaena similaris* (Gastropoda: Pulmonata) infected by *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1. **Experimental Parasitology**, v. 179, p. 28-35, 2017b.

VILELA, V. L. R. et al. Coadministration of nematophagous fungi for biological control over gastrointestinal helminths in sheep in the semiarid region of northeastern Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 221, p. 139-143, 2016.

UENO, H. et al. Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 11, n. 2-3, p. 185-191, 1982.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; et al. **Parasitologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

YANG, E. et al. Origin and evolution of carnivorism in the Ascomycota (fungi). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 27, p. 10960-10965, 2012.

ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H. C. A revision of *Verticillium section Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. **Nova Hedwigia**, v. 73, n. 1/2, p. 51-86, 2001.

WOOD, C. L. et al. Parasites alter community structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9335-9339, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Report of the Scientific working Group on plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides. **Bull World Health Organ Geneva**: TDR/SC, 1983.

**CAPÍTULO 1. POTENCIAL OVICIDA DE *Pochonia chlamydosporia* Pc-10  
(ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) SOBRE MASSAS OVÍGERAS DE  
*Pseudosuccinea columella* (MOLLUSCA: GASTROPODA)**

## RESUMO

Fungos são importantes organismos eucarióticos envolvidos na biodegradação de matéria orgânica. Dentre os fungos de importância médico-veterinária relacionados ao controle de helmintoses e suas fases, a espécie *Pochonia chlamydosporia*, tem se destacado pela sua característica oportunista em ovos de helmintos. Pela primeira vez, a susceptibilidade de massas ovíferas de *Pseudosuccinea columella* a propágulos do fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10) foi demonstrada sob condições laboratoriais. Para isto, dois grupos experimentais foram edificados: o grupo controle, na qual não verificou a exposição ao fungo, e o grupo tratado, caracterizado pela exposição das massas ovíferas ao isolado fúngico (Pc-10) durante 15 e 25 dias. Todo o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo duplicata, constando cinco réplicas para o grupo tratado e controle, totalizando 40 massas ovíferas. Semanalmente, ao longo de todo o experimento, as massas ovíferas de ambos os grupos experimentais (controle e tratado) foram analisadas sob auxílio de microscópio estereoscópico para a contabilização de moluscos eclodidos. Em adição, a ultraestrutura revelou ocorrência de diferentes tipos de interações de infecção estabelecidas entre as massas ovíferas do molusco com os micélios de *P. chlamydosporia*, as quais resultaram em modificações estruturais nestas, comprometendo e por conseguinte, inviabilizando os ovos em até 96,92%, sendo um recurso eficiente no controle desses caramujos.

Palavras-chave: Controle biológico. Hospedeiro intermediário. Fungo. Ovos



## ABSTRACT

Fungi are important eukaryotic organisms involved in the biodegradation of organic matter. Among the fungi of medical and veterinary importance related to the control of helminthes and their phases, the species *Pochonia chlamydosporia*, has been distinguished by its opportunistic characteristic in helminth eggs. For the first time, the susceptibility of ovigerous masses of *Pseudosuccinea columella* to propagules of the fungus *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10 isolate) was demonstrated under laboratory conditions. For this, two experimental groups were constructed: the control group, in which it did not verify the exposure to the fungus, and the treated group, characterized by exposure of the ovigerous masses to the fungal isolate (Pc-10) for 15 and 25 days. The whole experiment was conducted in a completely randomized design, being duplicate, consisting of five replicates for the treated and control group, totalizing 40 ovigerous masses. Weekly, throughout the experiment, the ovigerous masses of both experimental groups (control and treated) were analyzed under the aid of a stereoscopic microscope for the accounting of hatched molluscs. In addition, the ultrastructure revealed the occurrence of different types of infection interactions established between the ovigerous masses of the mollusk with the mycelia of *P. chlamydosporia*, which resulted in structural modifications in these, compromising and therefore making the eggs unviable up to 96.92 %, being an efficient resource in the control of these snails.

Keywords: Biological control. Fungus. Eggs. Intermediate host

## 1. INTRODUÇÃO

*Pochonia chlamydosporia* é um fungo Ascomycota que possui distribuição mundial sendo isolado a partir de solos ricos em matéria orgânica (ZARE; GAMS; EVANS, 2001; MANZANILLA-LOPEZ et al., 2013). Este ascomiceto é tido como um parasito facultativo de nematoides, ovos de moluscos e helmintos, bem como um hiperparasito de outros fungos, e por isso extensivamente utilizados no controle de verminoses (ZARE; GAMS; EVANS, 2001).

Vários fatores contribuem para direcionar este fungo para o biocontrole de nematoides, incluindo a fácil manutenção laboratorial, acesso a cepas (de coleções de fungos) e eficácia no controle de nematoides (MANZANILLA-LOPEZ et al., 2013).

Moluscos da família Lymnaeidae por serem caramujos hermafroditas, têm uma distribuição cosmopolita, e no Brasil o gênero *Galba* (anteriormente *Lymnaea*) e principalmente *Pseudosuccinea columella*, são reconhecidos como hospedeiros intermediários do trematódeo *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1761), agente etiológico da fasciolíase bovina (MAURE et al., 1998). Tais gastrópodes apresentam distribuição geográfica ampla, no Brasil, tal aspecto epidemiológico que favorece a manutenção da endemidade da doença nestas regiões, afetando produções de rebanhos e com casos de infecção em humanos. Desta maneira, torna-se necessário o desenvolvimento e implementação de medidas sustentáveis que controlem efetivamente tal afecção e que sejam de baixa toxicidade ao meio ambiente (MEDEIROS et al., 2014).

Visto que o fungo *P. chlamydosporia* tem sido relatado com êxito em controle biológico de helmintíases em decorrência de seu potencial ovicida, o presente estudo visou avaliar a ação in vitro de *P. chlamydosporia* (isolado Pc-10) sobre as massas ovígeras de *P. columella*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10)

Para os ensaios laboratoriais realizados neste estudo, foi utilizado o isolado fúngico (Pc-10) liofilizado de *P. chlamydosporia*. Este isolado foi obtido a partir da empresa Rizoflora situada na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### 2.2 Obtenção das massas ovíferas de *Pseudosuccinea columella*

Os espécimes de *P. columella* foram coletados a partir de bebedouros de gado bovino, localizados no município de Alegre, Espírito Santo, Brasil. No laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), os moluscos foram mantidos em temperatura média de 24°C e acondicionados em aquários de vidro contendo previamente água decolorada com aeração artificial contínua. Tais organismos foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*) *ad libitum*. Semanalmente, os aquários eram higienizados e as folhas de alface renovadas em dias alternados evitando sua fermentação. Placas de poliestireno ( $\pm 5 \text{ cm}^2$ ) foram colocadas no interior dos aquários para servirem como substratos para oviposição e obtenção das massas ovíferas.

### 2.3 Exposição experimental das massas ovíferas de *Pseudosuccinea columella* ao fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10)

Após aquisição do isolado fúngico (Pc-10), este foi cultivado em meio contendo ágar dextrose batata (BDA), durante 7 dias em demanda bioquímica de oxigênio modelo EL111/4 (BOD) a 27°C e 80% de umidade relativa absoluta (URA). Foi utilizado um total de 40 massas ovíferas obtidas mediante posturas realizadas por *P.*

*columella* após 12, 24 e 72 horas, sob condições laboratoriais. Em seguida, as massas ovíferas foram lavadas três vezes em água destilada e conservadas em tubos cônicos de centrífuga estéril (50 mL) contendo água deionada estéril em temperatura ambiente até o início dos testes (no máximo 24 horas de incubação).

Para exposição experimental das massas ovíferas aos corpos hifais do fungo foram utilizadas placas de Petri (60 x 15mm) portando um filme de água permanente estabelecido em meio ágar-água 2% (AA 2%). Estas placas foram inseridas no centro de outras placas de Petri maiores, portando (80 x 15mm), preenchidas com 2 mL de água destilada afim de manter uma umidade e ambiente favorável para o embrionamento dos moluscos e crescimento do fungo. Posteriormente, as massas ovíferas em incubação foram colocadas sobre papel filtro para proceder à remoção do excesso de água e individualmente foram transferidas sobre o filme de água em meio AA 2% (DUARTE et al., 2015). Para o experimento foi utilizado duas massas ovíferas/placa.

Dois grupos experimentais foram edificados, o grupo controle, sem o fungo, e o grupo tratado, na qual evidenciou a exposição das massas ovíferas ao isolado fúngico (Pc-10). Todo o experimento foi conduzido em duplicata constando de cinco réplicas para cada repetição.

Micélios de *P. chlamydosporia* (Pc-10) foram coletados com auxílio de uma espátula, previamente esterilizada, a partir de culturas cultivadas em meio ágar dextrose-batata estabelecidas. Por fim, a placa maior foi vedada por Parafilm® favorecendo a manutenção de uma umidade relativa ideal. Antes do início de cada ensaio, a viabilidade dos conídios (>95%) foi verificada conforme metodologia descrita por Duarte et al. (2015). As placas foram então incubadas em uma câmara escura a  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 25 dias.

#### **2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) de massa ovífera de *Pseudosuccinea columella* (grupo controle) e exposto ao micélio do fungo *Pochonia chlamydosporia* (grupo tratado) in vitro após 25 dias de exposição.**

Após 25 dias, foram selecionadas quatro massas ovíferas de *P. columella* de ambos os grupos experimentais (controle e tratado) e foram fixados em microtubos

(1,5 mL) contendo solução de glutaraldeído 2,5%. O processamento das amostras foi conduzido no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Tanto para a MEV quanto para a MET procederam às etapas de fixação, desidratação, pós-fixação (tetróxido de ósmio 2%). A desidratação das amostras para a MEV foi realizada através das passagens seriadas em solução de álcool etílico em diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) durante 10 minutos para cada concentração. Em seguida, o ponto crítico de secagem com CO<sub>2</sub> foi estabelecido, seguido pela instalação do material seco sobre uma placa de metal submetida ao chapeamento de ouro durante 20 minutos antes da observação. O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JEM 6610 LV, Inc. USA).

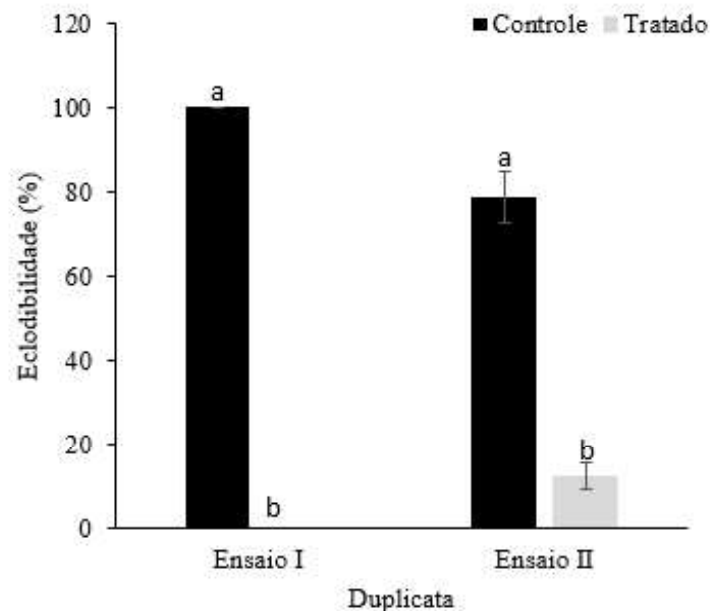
Para a MET, as amostras foram desidratadas mediante passagens em solução de acetona (50%, 70%, 90% e 100%), sendo posteriormente inclusas em resina epóxi EPON e levadas à estufa a 60°C até secar. Após a secagem da resina, os blocos contendo as amostras foram seccionados em cortes ultrafinos de 60nm de espessura no ultramicrotomo com faca de vidro. Em seguida, grades de cobre contrastadas em acetato de uracila e citrato de chumbo foram inseridas para visualização de estruturas biológicas. O material foi verificado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL-JEM 1400, Inc. USA).

## **2.5 Análises estatísticas**

Os resultados foram expressados como média±desvio-padrão pelo teste t de Student e submetidos aos testes de one-way ANOVA e Tukey–Kramer ( $p < 0.005$ ) para a comparação das médias (GraphPad Prism Inc. 6.01, R 3.4.1).

### 3. RESULTADOS

A exposição experimental aos corpos hifais de *P. chlamydosporia* (Pc-10) reduziu significativamente a taxa de eclodibilidade de *P. columella* ensaio I ( $0\pm 0$ )/ ensaio II ( $12,24\pm 3,23$ ) em relação ao grupo controle ensaio I ( $100\pm 0$ )/ ensaio II ( $78,76\pm 6,10$ ). Estes resultados denunciam que o isolado do fungo em questão comprometeu o processo de embriogênese do gastrópode em média de 96,92% (Figura 1).



Médias seguidas da mesma letra são estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ).

Figura 1 – Taxa percentual (%) da eclodibilidade dos embriões de *Pseudosuccinea columella* expostos e não expostos (tratado) a propágulos (controle) do fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10).

Os resultados obtidos a partir do ensaio I, demonstram 100% de inviabilidade dos ovos do molusco, sem haver eclosão dos embriões. Sendo significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo controle, onde ocorreu 100% de eclodibilidade, observadas ao 12º dia. Outra repetição (duplicata), posterior a essa (ensaio II),

revelou que o fungo reduziu 94,14% a eclodibilidade dos embriões, quando comparada com o grupo controle de eclosão dos embriões.

Também foi evidenciado o crescimento micelial (Figura 2 – A) e contagem de estruturas reprodutivas do fungo, após o 25º dia, avaliado em um fragmento coletado de cerca de 2 cm<sup>2</sup> do isolado fúngico, diluídos em água destilada e Tween 80 (0,1 % v/v) em Neubauer, resultando em  $72 \times 10^5$  clamidósporos/ mL.

A exposição ao fungo resultou em alterações estruturais significativas nas massas ovígeras, comprometendo o processo de embriogênese e, por conseguinte, a taxa de eclodibilidade dos embriões (Figura 2).

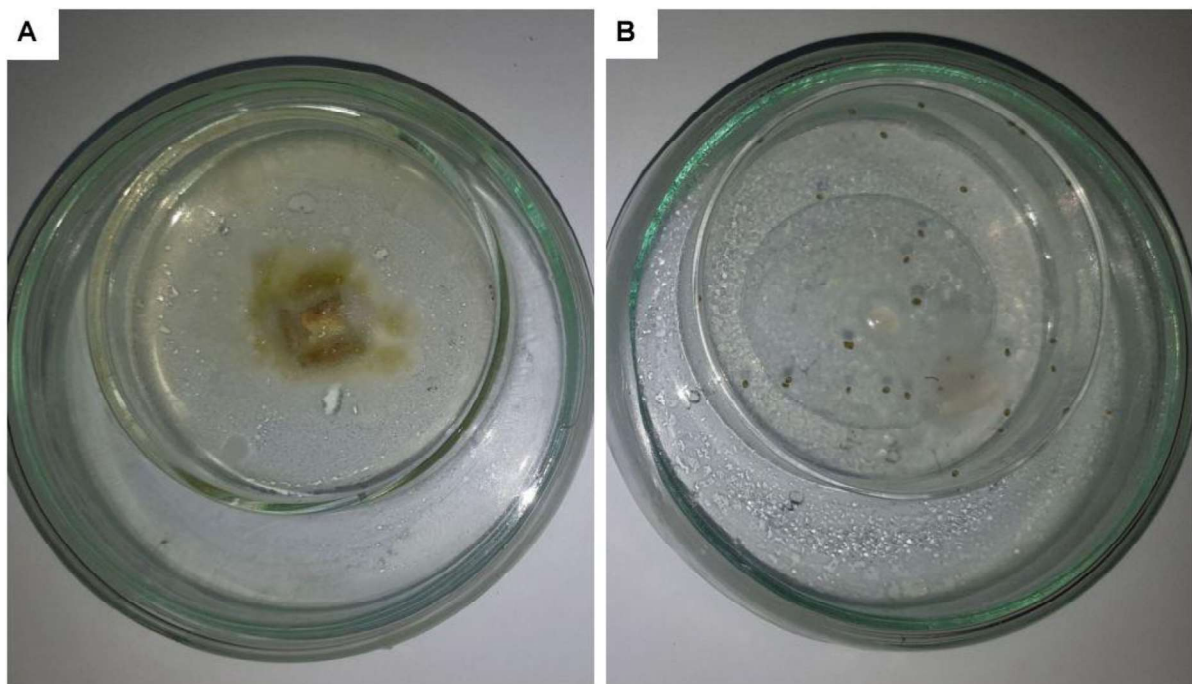


Figura 2 – Ensaio experimental in vitro, evidenciando o grupo tratado (A) após 25 dias a não eclodibilidade dos ovos de *P. columella* comparado com o grupo controle (B) com total eclosão dos embriões.

Desse modo, interações do tipo 1 (Figura 3 – A) foram demonstradas no presente estudo, sendo estas caracterizadas por um efeito lítico sem

comprometimento morfológico das massas ovíferas. Observa-se nesse contexto desenvolvimento hifal (apressório) a partir do clamidósporo sobre a superfície do micélio. Ainda sobre aspectos de estabelecimento da hifa, observa-se estruturas fisiológicas do fungo, envolvidas no crescimento hifal, denominada padrão de Spitzkörper (Figura 3 – B). Em adição, o efeito tipo 2 foi também demonstrado. Segundo autores, tal efeito caracteriza por um processo lítico desenvolvido pelo fungo que culminou com alterações estruturais das massas ovíferas, dos ovos nelas contidas e dos embriões em desenvolvimento, sem haver penetração hifal (Figura 3 – B e C); além da interação do tipo 3, elucidada mediante a um efeito lítico associado a prejuízos morfológicos do embrião e do tegumento dos ovos, em decorrência da penetração de hifas (Figura 3 – D, E e F) e colonização interna do ambiente ovular pelo fungo (LYSEK; STERBA, 1991). Adicionalmente a Figura 3 – D, é notável a presença de pequenas vesículas dentro do corpo hifal, relatados por Galvagno e Forchiassin (2010), o que possivelmente seriam os quitossomos, que contêm e transportam a enzima quitino sintetase até o ápice hifal em crescimento, que quando incubados com o substrato desta enzima, pode-se observar a síntese de microfibrilas de quitina (polímero constituinte da parede fúngica) em distintos estados de desenvolvimento, que são visíveis ao microscópio eletrônico de transmissão (MET). Tais achados demonstram e sugerem o efeito ovicida de *P. chlamydosporia* (Pc-10) sobre as massas ovíferas de *P. columella*.



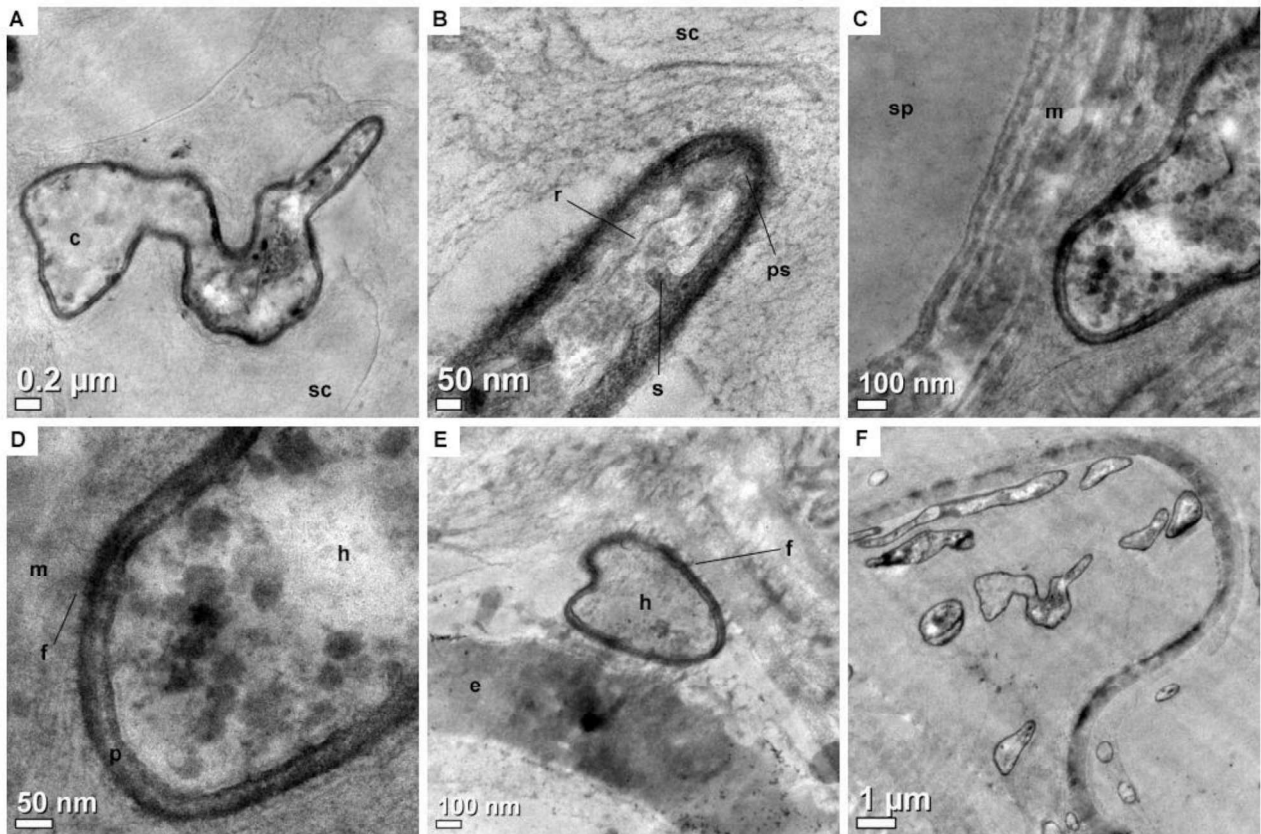


Figura 3 – Microscopia eletrônica de transmissão de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) em massa ovígera de *Pseudosuccinea columella*. A) Início do processo de germinação hifal a partir do clamidósporo (c) em meio a substância coloidal (sc) que compõe a massa ovígera. B) Padrão hifal de Spitzenkörper (ps) apresentando sistema de fibrilas e demais estruturas internas, tais como, retículo alongado(r), septo (s). C e D) Corpo hifal (h) demonstrando sistema de fibrilas (f) em contato com a substância coloidal e com a membrana do ovo (m) do gástrópode, observado da parede celular do fungo, caracterizando efeitos do tipo 1 (contato) e 2 (modificações estruturais), processo decorrente ao longo de 25 dias, que resultaram na inviabilidade dos ovos. E e F) Visualização da hifa (h) e sistema de fibrilas (f) evidenciando uma degeneração de membranas do ovo do embrião (e) e colonizando a a massa ovígera.

O grupo controle, foi observado nenhuma evidencia de estruturas fúngicas, além de dobras na substância coloidal (sc) e embrião (e) não eclodido.

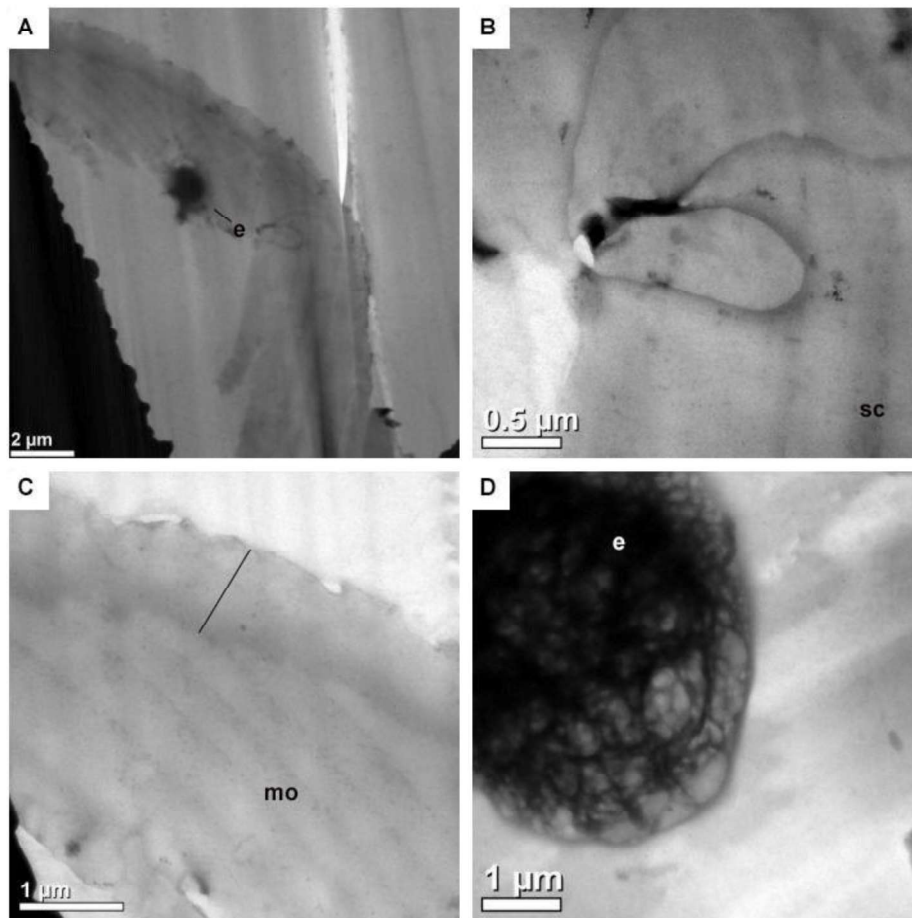


Figura 4 – Microscopia eletrônica de transmissão do grupo controle não exposto ao fungo *Pochonia chlamydosporia*. A) Massa ovígera contendo embrião (e) não eclodido. B e C) Estrutura e visualização do aspecto da massa ovígera (mo). D) Embrião (e) gastrópode de *Pseudosuccinea columella*.

Evidências do comportamento de *Pochonia chlamydosporia*, ainda foram observados em microscopia eletrônica de varredura (Figura 5).

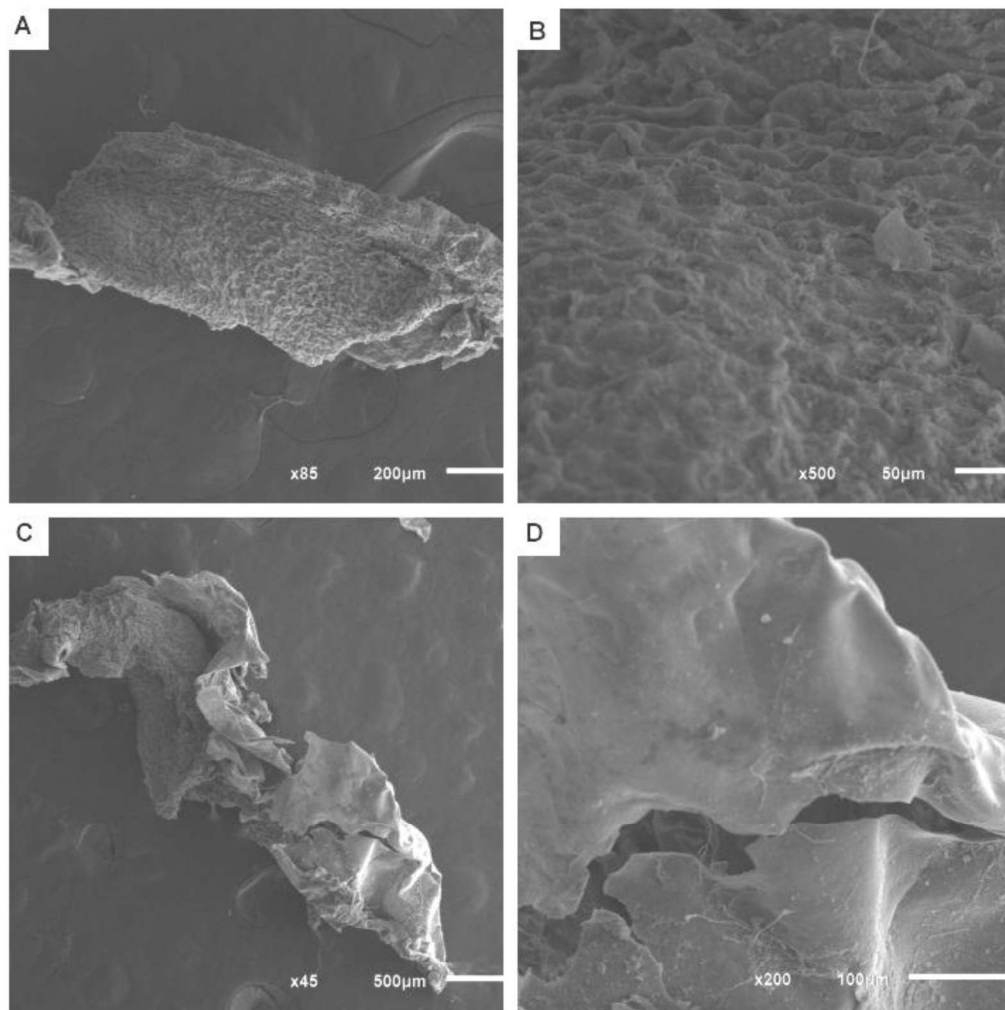


Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle de massa ovígera de *Pseudosuccinea columella* após 25 dias. A e B) Aspecto rugoso e com sulcos menores, decorrentes da nutrição do embrião. C e D) Rompimento da substância coloidal promovido pela saída dos embriões.

As análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram dados tridimensionais da estrutura da massa ovígera do grupo controle (Figura 5) e tratado (Figura 6) após 25 dias, com o micélio do fungo sobre a estrutura gelatinosa, já com aspecto seco e com sulcos profundos sob a massa, promovido provavelmente pela nutrição do ascomiceto em questão (Figura 6 – A). Em decorrência do crescimento do micélio, houve ruptura da camada vitelínica dos embriões e tegumento dos ovos (Figura 6 – B e C), além de resultar no aumento da concentração de clamidósporos sobre a superfície dos ovos (Figura 6 – D e E).

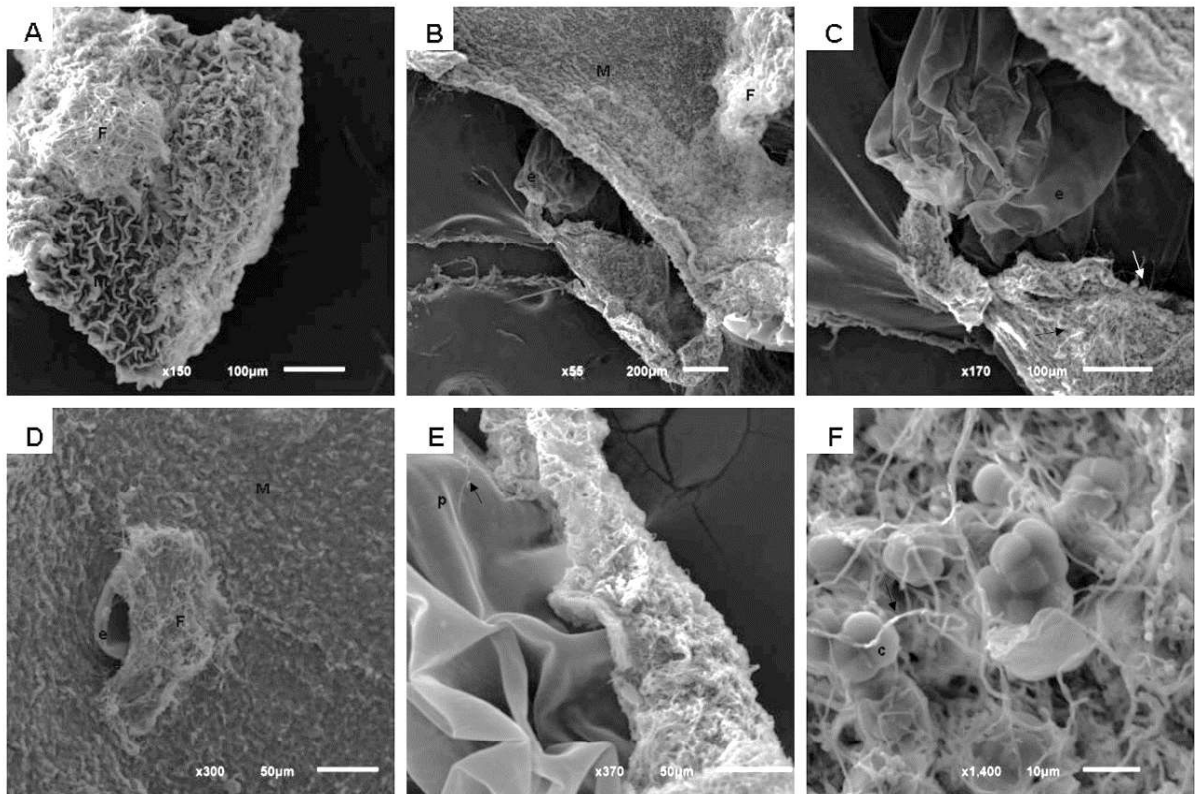


Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) e massa ovígera de *Pseudosuccinea columella* após 25 dias de tratamento. A e B) Massa ovígera (M) sob micélio (F) de *P. chlamydosporia*. C e D) Alterações estruturais no tegumento do ovo induzidas pelo fungo E) Protoconcha (p) de *P. columella* danificada provavelmente pela atividade enzimática de corpos hifais em expansão (→). F) Asca prototunicada denominada clamidósporo (c) e sistema de hifas de *P. chlamydosporia* recobrendo superfície externa da massa ovígera.

Ademais, alterações relacionadas ao processo de melanização das massas ovígeras expostas aos propágulos do fungo foram constatadas, contrapondo com os achados de Duarte et al. (2015). A melanização (Figura 7) constitui uma resposta imune não específica desenvolvida por insetos e outros invertebrados quando expostos a patógenos (GONZÁLES-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2012).

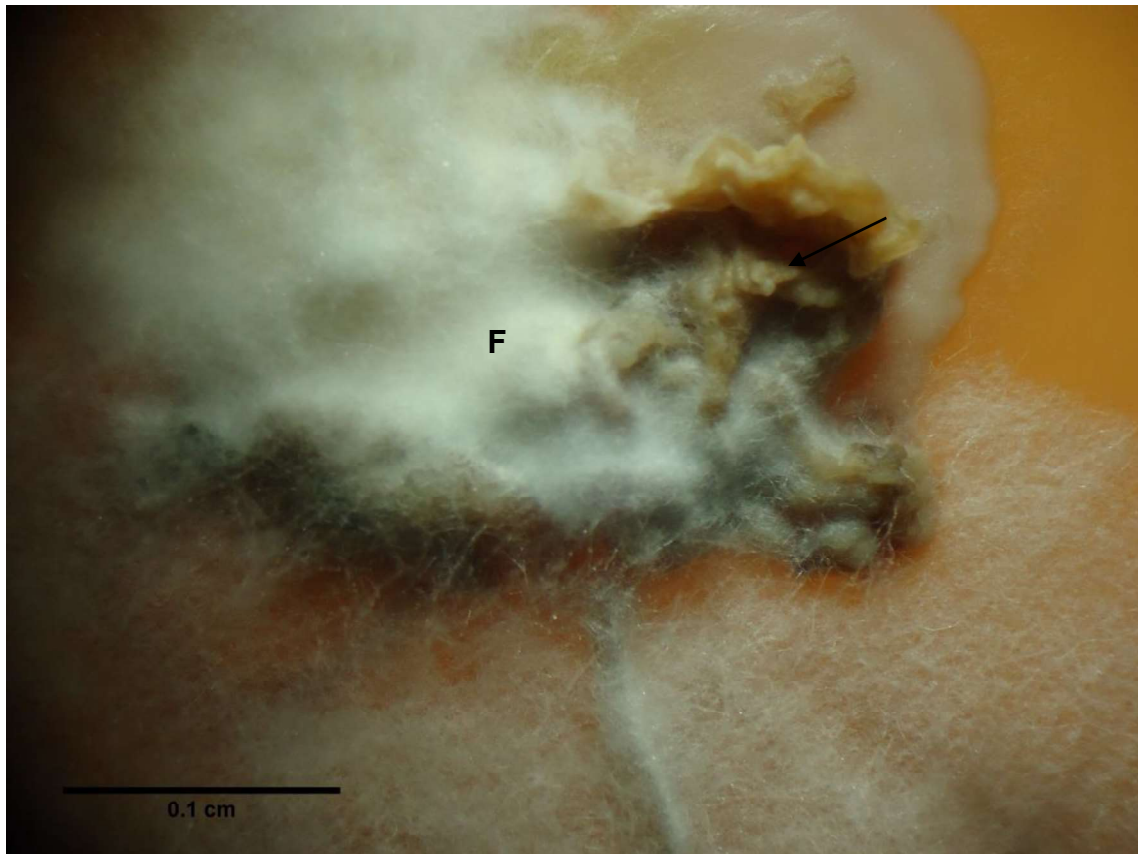


Figura 7 – Processo de melanização (→) e degradação da massa ovígera estabelecido entre o fungo (f) e os ovos do hospedeiro *P. columella*. Fonte: Arquivo pessoal

#### 4. DISCUSSÃO

Fungos nematófagos ovícidas têm sido extensivamente utilizados como agentes antagonistas para uma ampla variedade de helmintos de importância médica (BRAGA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010) e médico-veterinária (FRASSY et al., 2010; BRAGA et al., 2011; BRAGA; ARAÚJO, 2014), enquadrando como ferramentas bastante promissoras no controle das principais helmintíases que afetam a saúde humana e animal. Entretanto, estudos avaliando a patogenicidade destes microrganismos em massas ovígeras ou ovos de moluscos gastrópodes ainda são bastante raros (TERVET; ESSLEMONT, 1938; DUARTE et al., 2015). Desse modo, o presente estudo elucidou pela primeira vez, sob condições laboratoriais, a susceptibilidade de massas ovígeras de *P. columella* a infecção por *P. chlamydosporia* (Pc-10).

Efeitos de interação do fungo em ovos de nematoides tem sido relatados por vários autores (BRAGA et al., 2010; DE CARVALHO et al., 2014; FRASSY et al., 2010; LÝSEK; STĚRBA, 1991) e classificados em três formas de interação (efeito I, efeito fisiológico e bioquímico, sem danos a morfologia para o ovo; efeito II, alteração morfológica no ovo e embrionamento, sem penetração através do tegumento; efeito III, efeito lítico com mudanças na ovo e no embrião, penetrando e colonizando o ovo). Embora existem autores que considerem apenas o efeito tipo III como ovícida (LÝSEK, 1991; FRASSY et al., 2010), no presente estudo, os efeitos I e II foram considerados ovícidas, por também comprometer a eclosão do embrião, considerando aqui o efeito inibidor do fungo.

Tais achados mostram-se relevantes e sugerem a utilização de *P. chlamydosporia* (Pc-10) como uma alternativa viável a ser empregada em programas de controle biológico deste hospedeiro intermediário.

O fungo *P. chlamydosporia* é tido como um parasito facultativo de ovos e fêmeas de nematoides e foi considerado o principal responsável pelo declínio da população de *Heterodera avenae* em cultivares suscetíveis de cereais, em sistema de monocultivo na Inglaterra (KERRY et al., 1982). Este ascomiceto apresenta inúmeras características relevantes que o qualifica como agente de controle biológico, dentre as quais: capacidade em produzir grande número de

clamidósporos, estruturas de resistência, que facilitam a sua sobrevivência e estabelecimento em diferentes tipos de ambientes; de não ser patogênico a seres humanos e demais animais; e de ser facilmente reproduzido *in vitro*, se destacam (KERRY; BOURNE, 2002).

De forma similar ao observado por FRASSY et al. (2010), estudando a interação entre ovos de *Toxocara canis* e *P. chlamydosporia*, foi possível caracterizar pela primeira vez por meio de microscopia eletrônica, interações que o isolado Pc-10 estabeleceu sobre as massas ovígeras de *P. columella*.

De acordo com Araújo et al. (2004) e a ação ovícida de *P. chlamydosporia* sobre ovos de helmintos resulta inicialmente de uma ação mecânica imposta pelos corpos hifais do fungo durante etapa de germinação, os quais penetrariam e colonizariam o interior dos ovos. Como consequência, alterações na permeabilidade do tegumento dos ovos são observadas, contribuindo para a perda de água (BIRGIT; HANS-BÖRJE; ANDERS, 2006), aminoácidos livres e alguns eletrólitos essenciais à embriogênese. Condições similares podem estar ocorrendo no presente estudo contribuindo para a diminuição na taxa de eclodibilidade de *P. columella*. Ademais, os micélios em contato com a superfície das massas ovígeras poderiam ter secretado metabólitos com potencial embriotóxico que se difundiram pelas massas ovígeras e atingiram os embriões, comprometendo o seu desenvolvimento (Duarte et al., 2015).

Przeslawski, Davis e Benkendorff (2005) ainda relata que a depleção de oxigênio no interior de massas ovígeras de moluscos gastrópodes é um fator limitante a manutenção da sua viabilidade. Assim, em virtude das atividades do microrganismo em questão, sugere-se que a diminuição no teor de oxigênio pode ter sido interferida significativamente da eclosão do limnéideo.

Os fungos são organismos heterótrofos e se alimentam de substâncias orgânicas disponíveis no meio onde vivem (JESUS et al., 2013). Para isto, as hifas secretam através de sua parede celular enzimas necessárias à degradação de diferentes substratos, tais como carboidratos e proteínas, atendendo desta maneira suas demandas energéticas. Autores tem comprovado a habilidade de *P. chlamydosporia* de assimilar uma ampla variedade de fontes de carbono, tais como glicose, imprescindível a manutenção de seus intensos processos metabólicos (DOS SANTOS et al., 2013). Assim, o aumento na taxa de inviabilidade das massas ovígeras de *P. columella* expostas ao fungo *P. chlamydosporia* (Pc-10) poderiam

ainda resultar da diminuição nas concentrações de galactogênio que integra o fluido perivitelínico. O galactogênio é considerado um isômero do glicogênio constituído por monômeros de galactose e que representa a principal reserva polissacarídica utilizada pelos embriões durante etapa de desenvolvimento (FARO et al., 2013; TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

Bayne (1966) tem caracterizado por meio de métodos cromatográficos e eletroforéticos a composição química das camadas que integram as cascas dos ovos de moluscos gastrópodes. Como principais resultados, o autor verificou que além de carbonato de cálcio, o tegumento ovular seria constituído por proteínas e carboidratos. Adicionalmente, a membrana perivitelínica que circunda e protege o embrião mostra-se formada por proteínas, galactogênio, glicoproteínas e água (GOUDSMIT, 2014). Nesse contexto, a manutenção da integridade destas camadas é imprescindível para garantir a completa evolução embrionária. Recentemente, Braga et al., (2011) tem caracterizado a capacidade de *P. chlamydosporia* em produzir uma série de proteases, dentre as quais destaca-se VCP1, uma serino-alcalina protease implicada como um dos elementos envolvidos na destruição dos ovos de nematoides. Esses efeitos bioquímicos e fisiológicos são promovidos quando a VCP1 promove a permeabilidade de membrana, induzindo a produção de espécie de oxigênio reativa, do qual está envolvida no desenvolvimento do apressório hifal e aumento das enzimas de degradação e patogenicidade de VCP1 e SCP1 na deposição de compostos glicídicos do embrião e reserva nutricional (LOPEZ-MOYA et al., 2015; RYDER et al., 2013; ZOU et al., 2010).

Para tais pesquisadores, esta protease atua na degradação da camada proteica que constitui a membrana externa dos ovos de nematoides, possibilitando desempenhar seu efeito ovicida. Assim, mecanismo equivalente pode ter sido demonstrado por *P. chlamydosporia* (Pc-10) em massas ovíferas de *P. columella*, repercutindo em alterações estruturais das membranas que revestem os embriões, afetando diretamente o processo de embriogênese do gastrópode.

As evidências realizadas por Bai et al. (1997) registraram a ocorrência deste fenômeno de coloração âmbar ou escuro, também em massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata*. Tal mecanismo é estabelecido mediante indução de fenoloxidasas que culminará na produção e deposição de melanina na superfície de antígenos invasores (LOKER, 2010), imprescindível para inibição e destruição destes.



## 5. CONCLUSÃO

O uso de fungos ovicidas, tal como *Pochonia chlamydosporia*, se mostrou eficiente em testes de viabilidade de massas ovíferas de *Pseudosuccinea columella*. O método proposto é executável e viável, por comprometer significativamente a taxa de eclodibilidade dos embriões desse gastrópode, implicado como hospedeiro intermediário de *F. hepatica*. Desta forma, o mecanismo biológico utilizado pelo fungo poderá ser considerado uma alternativa interessante no controle da fasciolose.

## 6. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 165-169, 2004.

ARAUJO, J. M et al. Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. **Veterinary parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 86-89, 2009.

ARAÚJO, J. M. et al. The ovicidal activity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Taenia saginata* eggs in laboratory trial. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 2, p. 165-169, 2010.

BAI, G et al. Isolation and characterization of phenoloxidase from egg masses of the gastropod mollusc, *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 2, p. 463-469, 1997.

BAYNE, C. J. Observations on the composition of the layers of the egg of *Agriolimax reticulatus*, the grey field slug (Pulmonata, Stylomatophora). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 19, n. 2, p. 317-338, 1966.

BIRGIT, N.; HANS-BÖRJE, J.; ANDERS, T. Nematophagous fungi. **Encyclopedia of life sciences**, v. 10, 2006.

BENKENDORFF, K.; DAVIS, A. R.; BREMNER, J. B. Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: an assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 78, n. 2, p. 109-118, 2001.

BENNEMA, S. C. et al. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 35-41, 2014.

BRAGA, F. R. et al. Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 356-358, 2007.

BRAGA, F. R. et al. Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 264-268, 2010.

BRAGA, F. R. et al. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 116–118, fev. 2011.

BRAGA, F. R. et al. Zoonotic neglected tropical diseases: New approaches to combat old enemies. **BioMed Research International**, v. 2, 2014.

BRAGA, F. R.; DE ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 71-82, 2014.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.

DE CARVALHO, L. M. et al. Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. S1, p. 109-114, 2014.

DIAS, A. S. et al. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. **Parasitology research**, v. 112, n. 6, p. 2131-2136, 2013.

DUARTE, G. F. et al. New insights into the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. **Journal of invertebrate pathology**, v. 125, p. 31-36, 2015

DOS SANTOS, M. C. V et al. Biology, growth parameters and enzymatic activity of *Pochonia chlamydosporia* isolated from potato cyst and root-knot nematodes. **Nematology**, v. 15, n. 4, p. 493-504, 2013.

ESCUADERO, N. et al. Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Fungal biology**, v. 120, n. 4, p. 572-585, 2016.

ESTEVEZ, I. et al. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, v. 113, n. 8, p. 867-876, 2009.

FARO, M. J. et al. Biological, biochemical and histopathological features related to

parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 2, p. 228-234, 2013.

FRASSY, L. N. et al. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 102-104, 2010.

GALVAGNO, A. M; FORCHIASSIN, F. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. 2ed. Educs. p.638, 2010.

GONZÁLEZ-SANTOYO, I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 142, n. 1, p. 1-16, 2012.

GOUDSMIT, E.M. The role of galactogen in pulmonate snails. **Malacology**, v. 6, p. 58-59, 1973.

GOUDSMIT, E.M. Carbohydrate and carbohydrate metabolism in molluscs, **Chemical Zoology, Mollusca**, v. 7, p. 219-243, 2014.

JESUS, A. L. et al. Diversidade de organismos zoospóricos do córrego Pirarungaua, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil: novas citações. **Hoehnea**, v. 40, p. 167-180, 2013.

KERRY, B. R.; CRUMP, D. H.; MULLEN, L. A. Studies of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae* under continuous cereals, 1975–1978. II. Fungal parasitism of nematode females and eggs. **Annals of Applied Biology**, v. 100, n. 3, p. 489-499, 1982.

KERRY, B. R.; BOURNE, J. M. **A Manual for research on *Verticillium chlamydosporium*: a potential biological control agent for root-knot nematodes**. Gent, Belgium, 2002.

LOKER, E. S. Gastropod immunobiology. **Invertebrate immunity**. Springer, Boston, MA, p. 17-43, 2010.

LOPEZ-MOYA, F. et al. Carbon and nitrogen limitation increase chitosan antifungal activity in *Neurospora crassa* and fungal human pathogens. **Fungal biology**, v. 119, n. 2-3, p. 154-169, 2015.

LÝSEK, H.; STĚRBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Folia Parasitologica**, v. 38, p. 255-259,

1991.

MANZANILLA-LOPEZ, R. H. et al. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, n. 1, p. 1, 2013.

MAURE, E. A. P. et al. Dinâmica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 00–00, 1998.

MEDEIROS, C. et al. Spatial distribution of lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 235-252, 2014.

NIELAND, M.L; GOUDSMIT, E.M. Ultrastructural observations on galactogen formation and secretion in the albumin gland of *Helix pomatia*. **Journal of Investigation of dermatology**, v. 52, p. 392, 1969.

PRZESLAWSKI, R.; DAVIS, A. R.; BENKENDORFF, K. Synergistic effects associated with climate change and the development of rocky shore molluscs. **Global Change Biology**, v. 11, n. 3, p. 515-522, 2005.

RADOSTITS, O. M. et al. Coliform mastitis caused by *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Enterobacter aerogenes*. **Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses**, v. 9, p. 639-650, 2000.

RADOSTISTS, O. M.; MAYHEW, L. G. J.; HOUSTON, D. M. Exame Clínico e Diagnostico em Veterinária. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 166-174, 2002.

RYDER, L. S. et al. NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal remodeling during plant infection by the rice blast fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 8, p. 3179-3184, 2013.

TERVET, I. W.; ESSLEMONT, J. M. A fungous parasite of the eggs of the gray field slug. **The Journal of Queckett Microscopical Club**, v. 1, p. 1-3, 1938.

TUNHOLI-ALVES, Vinícius Menezes et al. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 108, n. 3, p. 220-223, 2011.

TUNHOLI-ALVES, V. M. et al. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the lipid metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2111-2116, 2013.

TUNHOLI, V. M. et al. Molluscicidal potential of *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, on *Lymnaea columella* (Gastropoda: Pulmonata): An alternative for biological control of fasciolosis. **Acta Tropica**, v. 173, p. 23-29, 2017.

TUNHOLI, V. M. et al. Biological, biochemical and histological features of *Bradybaena similaris* (Gastropoda: Pulmonata) infected by *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1. **Experimental Parasitology**, v. 179, p. 28-35, 2017.

ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H. C. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. **Nova Hedwigia**, v. 73, n. 1/2, p. 51-86, 2001.

ZOU, C. G. et al. Expression of a serine protease gene prC is up-regulated by oxidative stress in the fungus *Clonostachys rosea*: implications for fungal survival. **PloS one**, v. 5, n. 10, p. e13386, 2010.

**CAPÍTULO 2. EFEITO DO EXTRATO FÚNGICO ENZIMÁTICO DE *Pochonia  
chlamydosporia* Pc-10 (ASCOMYCOTA: SORDARIOMYCETES) NA  
VIABILIDADE DOS OVOS DE *Fasciola hepatica* (TREMATODA:  
FASCIOLIDAE)**

## RESUMO

A fasciolose hepática tem sido implicada como uma das mais importantes doenças parasitárias de animais, sendo um risco de infecções e perdas econômicas, especialmente em bovinos e ovinos. Hospedeiros definitivos parasitados são considerados importantes reservatórios do trematoda, contribuindo para a manutenção e estabelecimento da trematodíase em uma determinada região. Dessa forma, os ovos de *Fasciola hepatica* aferem chegar matrizes ambientais juntamente com as fezes destes hospedeiros, e em decorrência de fatores extrínsecos e intrínsecos podem permanecer no meio durante meses até encontrarem condições favoráveis para embriogênese. O uso de anti-helmínticos podem prejudicar o trematódeo, mas nem sempre afeta os ovos, de forma que após a eclosão do miracídio, este poderá infectar seus hospedeiros intermediários, favorecendo a manutenção do ciclo. O uso da biotecnologia para obtenção de produto enzimático a partir de fungos, pode se tornar uma estratégia para o controle biológico, enquadrando como uma ferramenta economicamente sustentável na prevenção de helmintíases. Em virtude disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade dos ovos de *Fasciola hepatica* expostos durante 60 minutos a concentrações diferentes do extrato enzimático de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10). Os ovos de *F. hepatica* foram coletados diretamente da vesícula biliar de bovinos naturalmente parasitados. Posteriormente, estes foram sedimentados e colocados em placas de 24 poços contendo previamente o extrato de *P. chlamydosporia* (Pc-10) em concentrações de 500 µL (10%), 400 µL (8%), 300 µL (5%), 200 µL (2%), 100 µL (1%) e água destilada. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando um total de 900 ovos. Após a exposição experimental ao extrato enzimático do fungo (Pc-10) comprometimento da viabilidade dos ovos foi observado, com uma redução de uma média de 81,77% (736/900) na taxa de eclodibilidade miracidial na concentração de 10%. A ultraestrutura evidenciou colabamento das paredes internas do ovo, interferindo na abertura do opérculo. Em adição, a ruptura do tegumento dos ovos foi evidenciada, condição que compromete a eclosão do miracídio.

Palavras-chave: Enzimas. Embriotoxicidade. Fungo.



## ABSTRACT

Hepatic fasciolosis has been implicated as one of the most important parasitic diseases of animals, being a risk of infections and economic losses, especially in cattle and sheep. Definitive hosts parasitized are considered important reservoirs of the trematoda, contributing to the maintenance and establishment of trematodiasis in a given region. Thus, *Fasciola hepatica* eggs can reach environmental matrices together with the faeces of these hosts, and as a result of extrinsic and intrinsic factors can remain in the environment for months until they find favorable conditions for embryogenesis. The use of anthelmintics may impair trematode, but does not always affect eggs, so that after miracidid hatching, it may infect its intermediate hosts, favoring the maintenance of the cycle. The use of biotechnology to obtain an enzymatic product from fungi can become a strategy for biological control, as an economically sustainable tool in the prevention of helminthiasis. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the viability of the eggs of *Fasciola hepatica* exposed during 60 minutes to different concentrations of the enzymatic extract of *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10). *F. hepatica* eggs were collected directly from the gallbladder of naturally parasitized cattle. Subsequently, these were sedimented and placed in 24 well plates previously containing *P. chlamydosporia* extract (Pc-10) in concentrations of 500  $\mu$ L (10%), 400  $\mu$ L (8%), 300  $\mu$ L (5%), 200  $\mu$ L (2%), 100  $\mu$ L (1%) and distilled water. The experiment was carried out in triplicate, using a total of 900 eggs. After the experimental exposure to the enzymatic extract of the fungus (Pc-10), egg viability was observed, with a reduction of a mean of 81,77% (736/900) at the 10% concentration of miracidial hatchability. The ultrastructure showed a collapse of the inner walls of the egg, interfering with the opening of the operculum. In addition, the tegument rupture of the eggs was evidenced, a condition that jeopardizes the hatching of the miracidium.

Keywords: Enzymes. Embryotoxicity. Fungus.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Fasciola hepatica* é um trematódeo que apresenta grande relevância em medicina veterinária e em saúde pública, por infectar animais de produção e ocasionalmente o homem, causando nestes sérias alterações clínico-patológicas. Durante seu desenvolvimento ontogênico, moluscos dulcícolas pertencentes a espécie *Pseudosuccinea columella* atuam como hospedeiros intermediários, sendo imprescindíveis para a propagação da verminose. Vários fatores, tais como condições climáticas e aumento de áreas alagadas e irrigadas tem contribuído para o aumento da prevalência da infecção em seus hospedeiros definitivos (MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013).

Métodos convencionais, como o uso indiscriminado de anti-helmínticos, têm favorecido o desenvolvimento de cepas de parasitos resistentes a diferentes bases farmacológicas. Em adição, registros de resistência a drogas por ovos de helmintos foi também documentada. Neste contexto, novas implementações e alternativas que visam o controle efetivo de parasitos são necessárias (TORRES-ACOSTA et al.; HOSTE, 2012).

Fungos helmintófagos tem sido amplamente utilizados no controle biológico em função da sua capacidade de capturar e digerir diferentes estágios parasitários (HOFSTÄTTER et al., 2017). Estudos sobre a ecologia de *P. chlamydosporia* no solo e suas interações com as plantas e nematoides foram fundamentais e importantes para a exploração bem sucedida desses microrganismos como um agente de biocontrole.

Dentre os tipos de fungos, destaca-se os oportunistas como a *Pochonia chlamydosporia*, que tem sido empregado com sucesso no controle in vitro e in vivo de ovos de parasitos nematoides de solo e trematódeos, como *F. hepatica* (DIAS et al., 2013; SIDDIQUI; ATKINS; KERRY, 2009). Autores relatam que os mecanismos de infecção desses fungos podem ser mecânicos, enzimáticos ou a combinação de ambos. No entanto, na última década, a identificação de inúmeras enzimas extracelulares acabam por influenciar os fatores de virulência relacionadas as diferentes cepas fúngicas (HOFSTÄTTER et al., 2017).

Não há trabalhos que avaliam a eficácia de enzimas de fungos em ovos de *F. hepatica*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar pela primeira vez a ação in vitro do extrato enzimático de *P. chlamydosporia* (Pc-10) em diferentes concentrações sobre ovos de *F. hepatica*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenções dos ovos de *F. hepatica*

Os ovos foram obtidos de empresas terceirizadas e regulamentadas com autorização prévia para experimentação concedido da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES – Processo 13/2016). Para coleta dos ovos, a bile foi retirada diretamente da vesícula biliar de bovinos naturalmente parasitados durante o abate e acondicionada em frasco de vidro limpo e seco a chegada ao laboratório de parasitologia (HOVET – UFES), onde foi realizada a sedimentação da bile, segundo técnica descrita por Foreyt (2005). Posteriormente os ovos sedimentados, foram transferidos para dois tubos cônicos de centrifuga (50 mL) e incubados em B.O.D para embrionamento, durante 14 dias, no escuro a temperatura de 37°C.

Anterior a inserção do extrato enzimático do fungo, os ovos após o período de embrionamento prévio, foram expostos a luz em placa de 24 poços, durante aproximadamente 120 minutos com suporte de lâmpadas incandescentes cristal (100w – 220v) em temperatura controlada para estimular a eclosão dos miracídios à 35 °C numa distância de 40 cm.

### 2.2 Eletroforese SDS-PAGE do extrato fúngico de *P. chlamydosporia*

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e  $\beta$ -mercaptoetanol. O gel de separação foi preparado a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30%, tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, persulfato de amônio 10% e N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). O gel de empilhamento (0,75 mm) foi utilizada a solução de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30%, tampão Tris/HCl 0,5 M, persulfato de amônio 10%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e, N,N,N,N-tetrametiletlenodiamino de sódio (TEMED).

As amostras fúngica submetidas à eletroforese foram adicionadas ao tampão de amostra desnaturante, aquecidas durante 5 minutos e aplicadas no gel, juntamente

com os padrões de pesos moleculares (70kDa, 45kDa, 23kDa). Sendo transcrito a corrida em gel de eletroforese à temperatura ambiente, a 100V. Posteriormente, as proteínas presentes no gel, foram reveladas com nitrato de prata, sendo tratado em solução reveladora de carbonato de sódio e formaldeído. Após o aparecimento das bandas a revelação foi interrompida com ácido acético a 5%.

## **2.2 CLAE da atividade enzimática de *Pochonia chlamydosporia***

A cromatografia líquida de alta eficiência foi feita em equipamento Akta® para determinação pelo método caseinolítico incubando-se 500 µL do substrato caseína (1%, pH 8), em 400 µL de solução tampão com 100 µL do extrato bruto do fungo por 10 minutos, a 50° C. Posteriormente a reação foi interrompida pela adição de 1 mL ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida o meio reacional foi submetido à centrifugação a 10.000 rpm durante cinco minutos e coletado o sobrenadante para determinação da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro.

## **2.3 Aquisição do extrato fúngico enzimático de *P. chlamydosporia* (Pc-10) em ovos de *F. hepatica***

O fungo liofilizado foi obtido da formulação comercial (Rizoflora®). Após aquisição fúngica 10 g deste material foi pesado em microtubo (1,5 mL) de centrifuga estéril de 50 ml. Em seguida, foi adicionado solução de 15 ml de PBS (0,1 M e pH 7,1) a temperatura ambiente. Após homogeneização, a solução foi vertida promovendo a ressuspensão da formulação fúngica. Posteriormente, tal solução foi centrifugada em centrífuga (Nova Tecnica - NT 815) refrigerada de bancada em 4°C a 3500 rpm, durante 30 minutos para coleta do sobrenadante em câmara de fluxo laminar.

Findada a centrifugação do material foi coletado em câmara de fluxo laminar (Filtracom 30 – F30/1) com auxílio de pipeta pasteur de plástico graduada estéril (3

mL) o sobrenadante. Este foi transferido para outro tubo de centrifuga de 50 mL também estéril e filtrado em seringa de filtro 0,45 µm, hidrofílica de nylon.

Após a aquisição do extrato, este foi inoculado em placa de 24 poços com dosagens de 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL e o controle (H<sub>2</sub>O) representando respectivamente as concentrações 1%, 2%, 5%, 8%, 10%. As análises foram conduzidas em triplicata utilizando um total de 900 ovos embrionados (vistos em microscópio ótico no aumento de 40x) totalizando 50 ovos em cada poço/dose.

Transcorrido 60 minutos da exposição os ovos de cada grupo foram avaliados em microscopia ótica para análise da viabilidade.

#### **2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) de ovos de *Fasciola hepatica* tratados e não tratados com o extrato enzimático.**

Após 60 minutos, ovos de ambos os grupos experimentais (controle e tratado) foram fixados em microtubos (1,5 mL) contendo solução de glutaraldeído 2,5%. O processamento das amostras foi conduzido no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Tanto para a MEV quanto para a MET procederam às etapas de fixação, desidratação, pós-fixação (tetróxido de ósmio 2%). A desidratação das amostras para a MEV foi realizada através das passagens seriadas em solução de álcool etílico em diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) durante 10 minutos para cada concentração. Em seguida, o ponto crítico de secagem com CO<sub>2</sub> foi estabelecido, seguido pela instalação do material seco sobre uma placa de metal submetida ao chapeamento de ouro durante 20 minutos antes da observação. O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JEM 6610 LV, Inc. USA).

Para a MET, as amostras foram desidratadas mediante passagens em solução de acetona (50%, 70%, 90% e 100%), sendo posteriormente inclusas em resina epóxi EPON e levadas à estufa a 60°C até secar. Após a secagem da resina, os blocos

contendo as amostras foram seccionados em cortes ultrafinos de 60nm de espessura no ultramicrotomo com faca de vidro. Em seguida, grades de cobre contrastadas em acetato de uracila e citrato de chumbo foram inseridas para visualização de estruturas biológicas. O material foi verificado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL-JEM 1400, Inc. USA).

## **2.5 Análises estatísticas**

As análises de regressão polinomial foram realizadas no programa R 3.4.1 e os resultados compilados em Excel 2010.

### 3. RESULTADOS

Evidenciou-se através de regressão polinomial por dose inoculada, uma série de alterações, que contribuíram no comprometimento e inviabilidade média de 81,77% (736/900) dos ovos de *F. hepatica* (Figura 1).

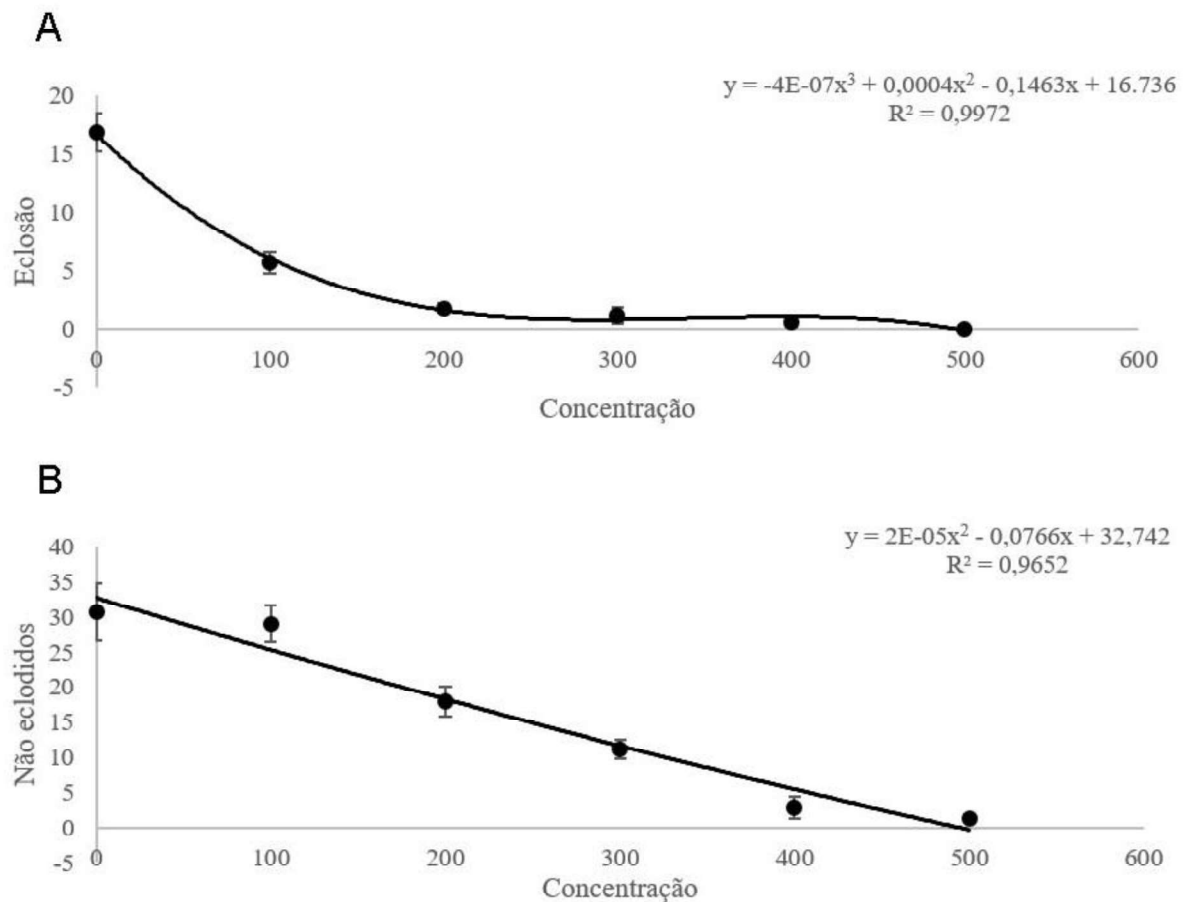


Figura 1 – Perfil de inviabilidade dos ovos de *Fasciola hepatica* em concentrações de 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL do extrato enzimático de *P. chlamydosporia* e H<sub>2</sub>O. A) Número de eclosão dos miracídios exposto à luz durante 60 minutos. B) Número de miracídios não eclodidos quando expostos à luz durante 60 minutos.

A partir dos resultados obtidos, a dose que propiciou maior efeito de inviabilidade (Figura 1) sobre os ovos de *F. hepatica* foi a de 500 µL (10%), culminando no comprometimento de 98% (147/150) dos ovos expostos.



O gráfico da Figura 1 – A observa-se que nem todos os ovos houveram eclosão dos miracídios (58/150), sendo decorrente de tratamentos químicos prévios dos bovinos utilizados ou por inviabilidade natural de embrionamento dos ovos.

Os resultados que demonstram o comprometimento dos ovos de *F. hepatica*, observado quando expostos ao extrato fúngico, são melhor observados em maiores concentrações (Figura 2).

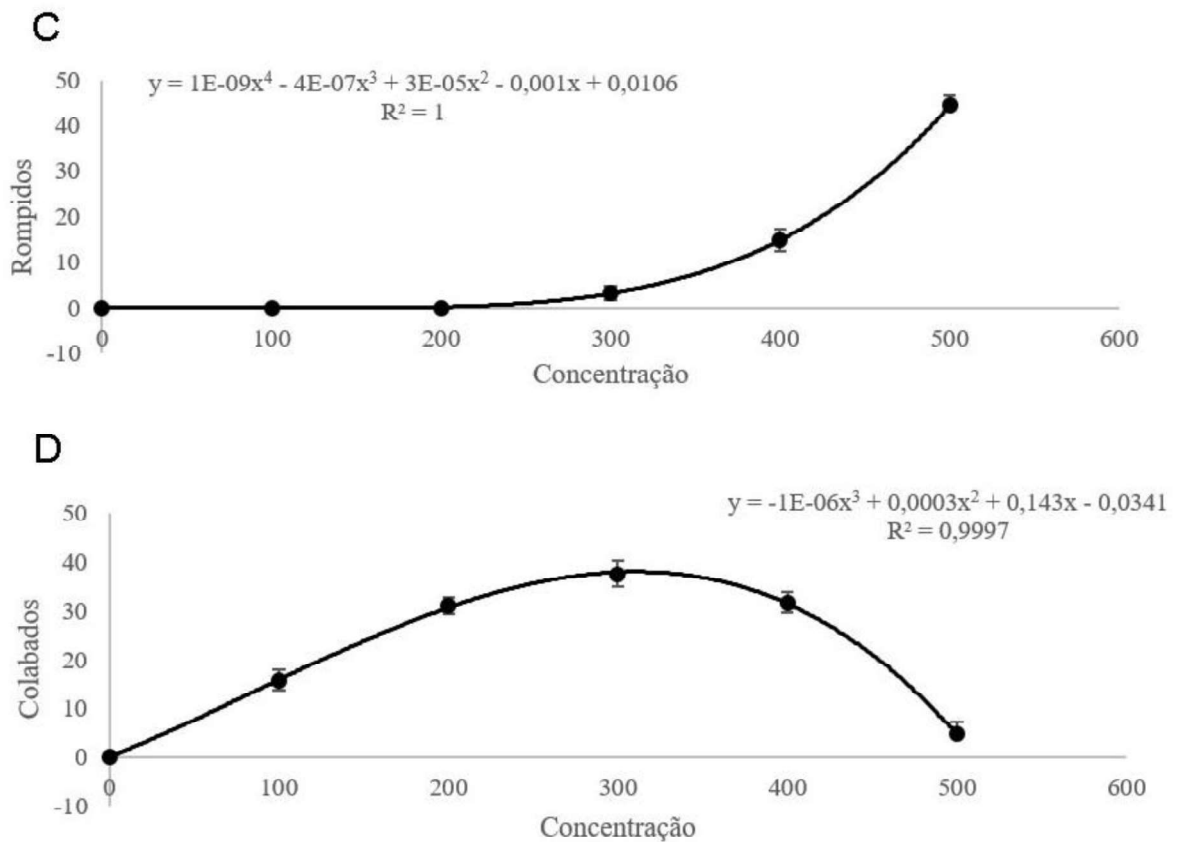


Figura 2 – Perfil de inviabilidade dos ovos de *Fasciola hepatica* em concentrações de 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL do extrato enzimático de *P. chlamydosporia* e H<sub>2</sub>O. C) Número de ovos rompidos D) Número de ovos colabados.

A exposição ao extrato fúngico dos ovos (Figura 2 – C), resultaram o rompimento a partir da concentração de 300 µL (6/150), 400 µL (37/150) e 500 µL (133/150). Enquanto em concentrações menores, observou-se o colabamento dos

tegumento dos ovos 100  $\mu\text{L}$  (47/150), 200  $\mu\text{L}$  (99/150), 300  $\mu\text{L}$  (104/150), 400  $\mu\text{L}$  (98/150) e 500  $\mu\text{L}$  (14/150).

Ainda em análise molecular, visando saber o tempo de atividade da enzima e tamanho, foi utilizado a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese SDS-PAGE (Figura 4), pode-se observar que o fungo Pc-10 foi realmente apto em uma das produções da substância descrita como VCP1, condição genética que ratifica a manutenção do potencial ovicida do isolado fúngico utilizado neste estudo (Figura 3).

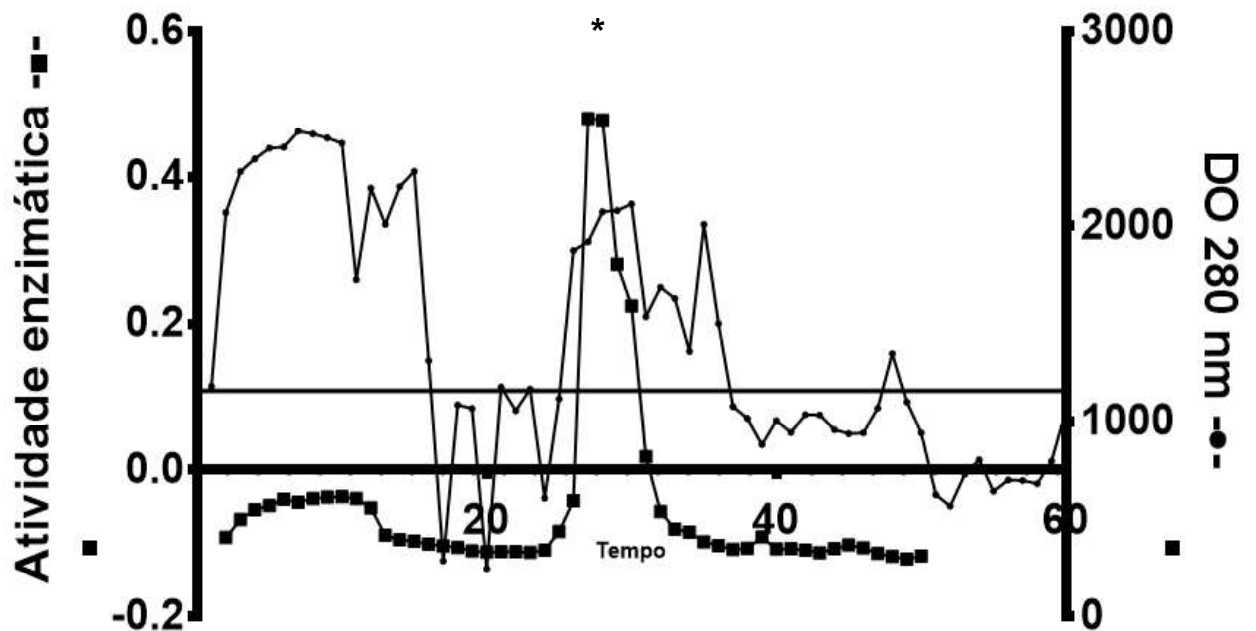


Figura 3 – Gráfico de análise cromatográfica (CLAE) do extrato enzimático de *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10). Densidade óptica 280 nm (DO).

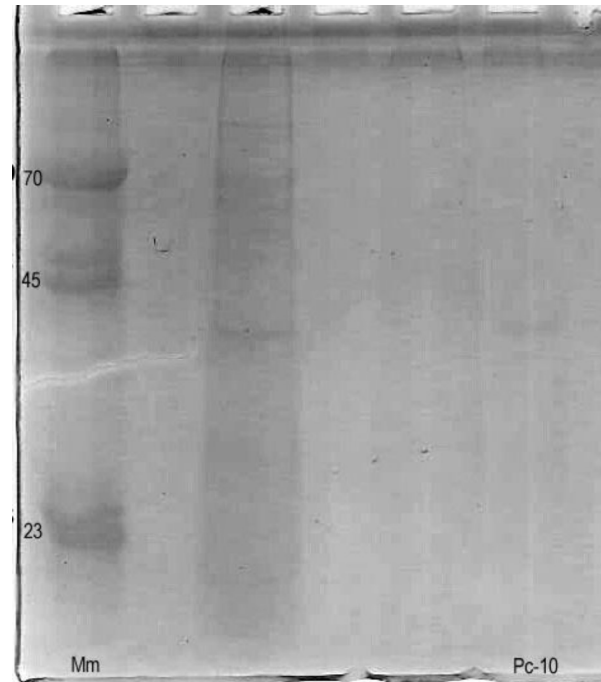


Figura 4 – Fotodocumentação de gel SDS-PAGE (corado com nitrato de prata) com extratos brutos proteicos de (*P. chlamydosporia* – Pc-10) de fração solúvel em DBB após a purificação de banda de interesse por eluição direta do gel de poliacrilamida. Marcador molecular (Mm) e tamanho da proteína (Pc-10) indicado pela seta (→).

Em complementar ao estudo, resultados do comprometimento do extrato fúngico enzimático de *P. chlamydosporia*, foi observado (Figura 5).

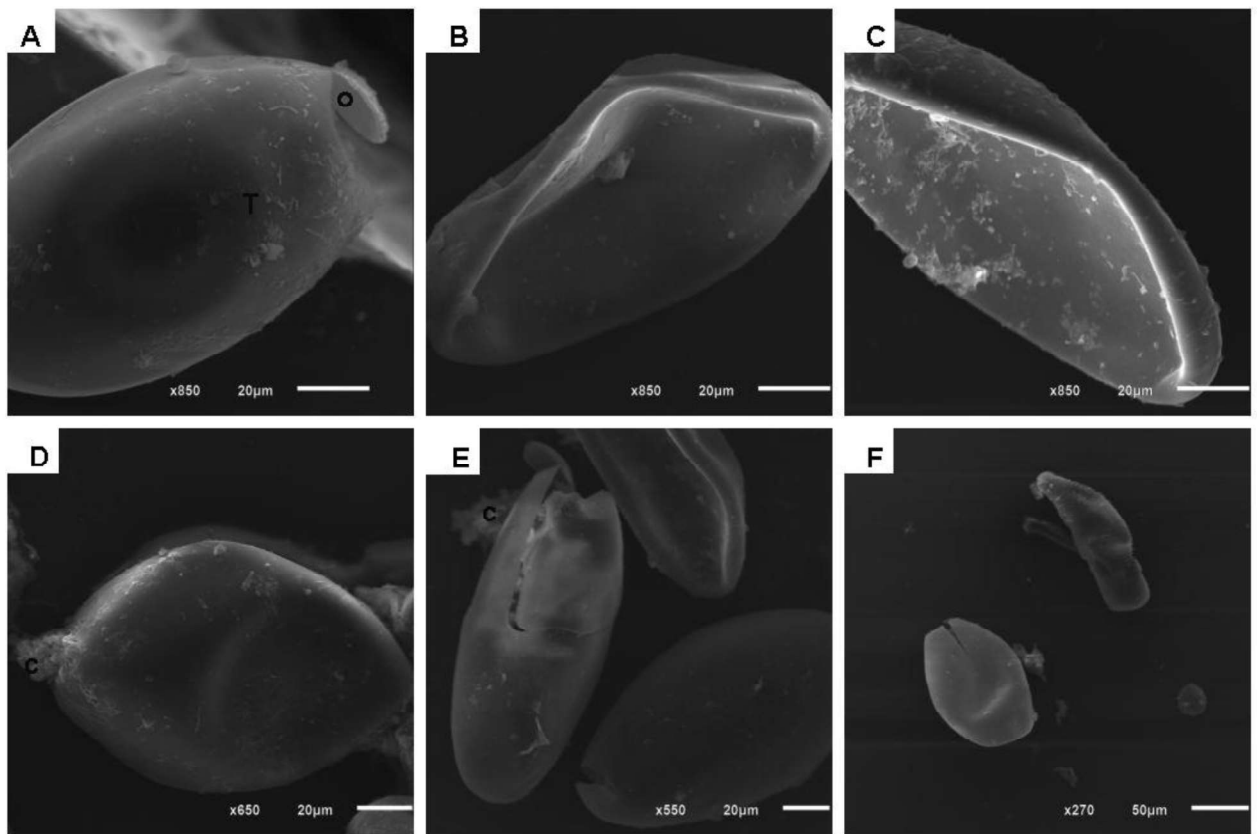


Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Fasciola hepatica* após 60 minutos em extrato enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia*. A) Ovo controle (H<sub>2</sub>O) com abertura do opérculo (o) e o sem dano ao tegumento. B e C) Ovos colabados e sem abertura do opérculo na dosagem de 200 µL e 300 µL D, E, F) Ovos colabados e com a integridade interna, afetando as células do miracídio (c) e externa do tegumento rompidos nas dosagens de 300 µL, 400 µL e 500 µL.

A microscopia eletrônica de transmissão evidenciou a desintegração da parte externa do tegumento, também chamada de casca (Figura 5 - D, E, F), extravasando assim células embrionárias ou germinativas do miracídio em formação.

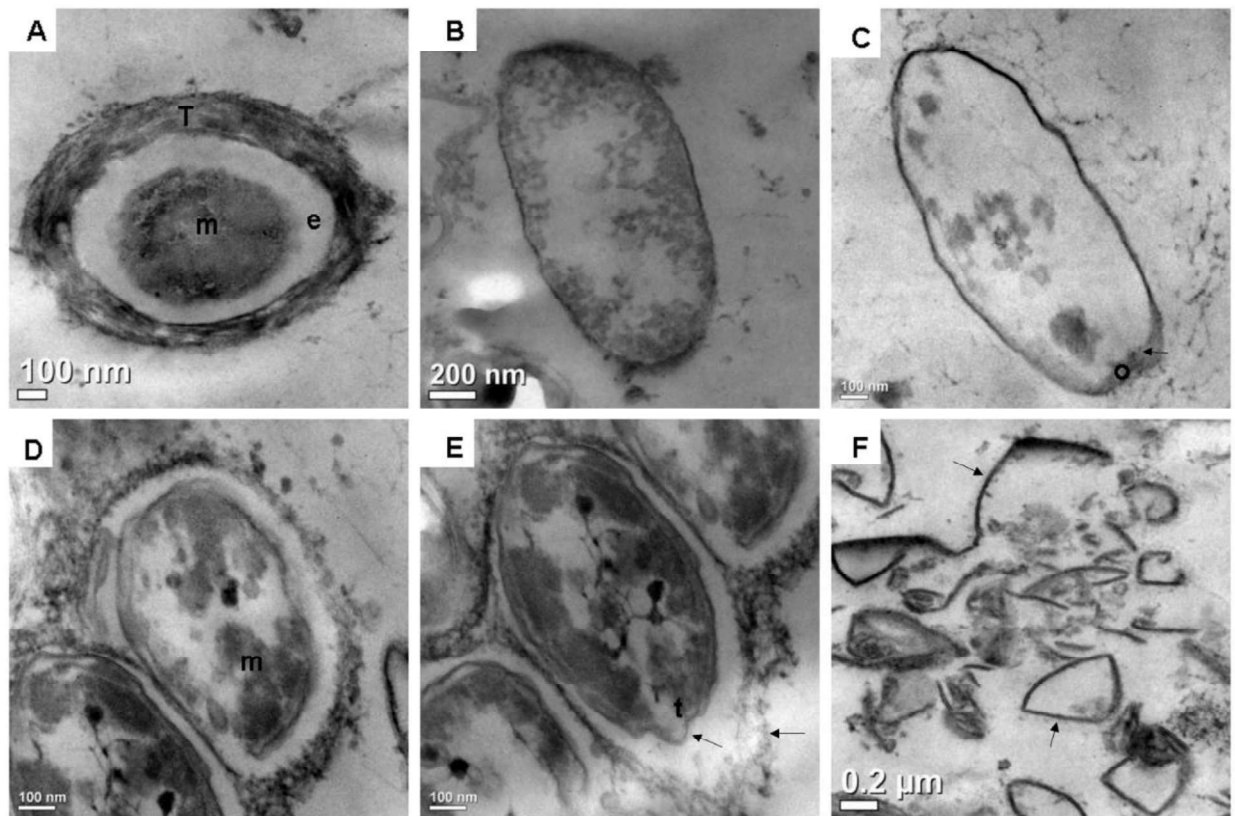


Figura 6 – Microscopia eletrônica de transmissão dos ovos de *Fasciola hepatica* após 60 minutos em extrato fúngico enzimático da espécie *Pochonia chlamydosporia*. A, B e C) Ovo controle (H<sub>2</sub>O) e visualização do miracídio (m) e opérculo (o) do tegumento sem dano. D, E e F) Ovos nas dosagem de 500 µL, com os tegumentos rompidos (→) e observação de terebratorium (t) indicados pela →.

#### 4. DISCUSSÃO

Os ovos da *Fasciola hepatica*, à medida que amadurecem, ganham certa rigidez e resistência, decorrentes também de fatores abióticos, como o oxigênio, que conferem proteção ao embrião (TONER et al., 2011). O rompimento (BOJANICH; BASUALDO; GIUSANO, 2017) do tegumento seria favorecido por enzimas, dentre as quais destaca-se a quitinase VCP1, SCP1 e outras proteases do filtrado (ESCUDERO et al., 2016). Segundo Lýsek (1976) um fungo é considerado ovicida quando apresenta capacidade de comprometer o processo de embriogênese do helminto.

O uso do extrato fúngico enzimático nas concentrações de 400 µL (8%), 300 µL (5%), 200 µL (2%) e 100 µL (1%), ainda assim, se mostraram eficientes na inviabilidade de eclosão dos miracídios, favorecendo o colapamento do tegumento externo ou casca, dos ovos, decorrente da biocatalise de enzimas do filtrado de *P. chlamydosporia*.

Na dosagem de 500 µL, foi percebido um maior número de rompimento dos ovos, demonstrando eficiência na concentração de 10%. Em relação as demais concentrações (8%, 5%, 4%, 2% e 1%), os ovos também mostraram-se colabados, fato que contribui para a baixa eclodibilidade miracidial.

Segundo as análises eletroforéticas e cromatográficas, o tamanho da proteína envolvida (33 kDa), propiciou uma maior interferência quando em maior proporção que nas concentrações inferiores. Resultados como o colapamento também reforça a ação enzimática, favorecendo, a interrupção do embrionamento da fase larval da *F. hepatica*. A prospecção de proteínas livres oriundas do fungo liofilizado foi determinada em membrana de gel de poliacrilamida identificou uma das proteases de tamanho 33 kDa, corroborando com resultados obtidos por outros autores utilizando cepas fúngicas diferentes (ESTEVES et al., 2009; ESCUDERO et al., 2016). Esta proteína é compatível com a VCP1, uma alcalina serino-protease, secretada por *P. chlamydosporia* que confere potencial ovicida ao fungo em ovos de helmintos e moluscos gastrópodes (DUARTE et al., 2014; ARAÚJO et al., 2011; BRAGA et al., 2010).

O estudo de *P. chlamydosporia* tem sido alvo de estudos e aplicabilidade no combate de helmintos do solo e por sua ação ovicida. É sabido que a enzima serino-alcalina é responsável pela aderência e comprometimento do tegumento do ovo que quebra ligações polissacarídicas de quitina, causando uma permeabilidade, colabamento e amaciamento da parte externa (PALMA-GUERRERO et al., 2010) consequentemente favorecendo uma relação de catalise dessas substâncias que favorecem resistência e permanência no meio.

A partir desses resultados, análises complementares de microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram realizadas para melhor compreender a relação e mecanismos enzimáticos de *P. chlamydosporia*/ ovo de *F. hepatica*.

A quitina estrutural presente na parede dos ovos favoreceu a atividade pelas proteases como VCP1 e SCP1 (LARRIBA et al., 2014). A expressão dessas enzimas extracelulares pelo fungo *P. chlamydosporia*, indica sua alta capacidade de degradação do ovo. A diferença entre a proteína serino-alcalina (VCP1) é uma subtilisina que expõe catalisa as substâncias superficiais do ovo, expondo a quitina e substâncias internas como a membrana vitelínica e lipídica, que consequentemente vem favorecendo o aumento da expressão de carboxipeptidases (SCP1) envolvidas na degradação e inviabilizando o embrião e seu desenvolvimento.

## 5. CONCLUSÃO

A utilização do extrato enzimático de *Pochonia chlamydosporia* serviu como um recurso natural e próprio do fungo, que comprometeu tanto o tegumento externo, rompendo e colabando, quanto estruturas vitais da atividade embrionária do ovo de *F.hepatica*.



#### 4. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. M. et al. The ovicidal activity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Taenia saginata* eggs in laboratory trial. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 2, p. 165-169, 2010.
- BOJANICH, M. V.; BASUALDO, J. A.; GIUSIANO, G. In vitro effect of *Chrysosporium indicum* and *Chrysosporium keratinophylum* on *Toxocara canis* eggs. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 49, n. 4, p. 30135- 30141, 2017.
- BRAGA, F. R. et al. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 116–118, fev. 2011.
- DIAS, A. S. et al. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. **Parasitology research**, v. 112, n. 6, p. 2131-2136, 2013.
- DUARTE, G. F. et al. New insights into the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. **Journal of invertebrate pathology**, v. 125, p. 31-36, 2015
- ESCUADERO, N. et al. Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Fungal biology**, v. 120, n. 4, p. 572-585, 2016.
- ESTEVEZ, I. et al. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, v. 113, n. 8, p. 867-876, 2009.
- FOREYT, W. J. **Parasitologia Veterinária - Manual de Referência**. 5ª ed. Roca, p. 240 2005.
- HOFSTÄTTER, B. D. M. et al. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* eggs. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 1, p. 28-31, 2017.
- LARRIBA, E. et al. Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 65, p. 69-80, 2014.
- LÝSEK, H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. **Acta University Palack Olumue**. v.76, p. 9-13, 1976

MANZANILLA-LOPEZ, R. H. et al. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, n. 1, p. 1, 2013.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M. et al. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 282, 2013.

MAURE, E. A. P. et al. Dinâmica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 00–00, 1998.

PALMA-GUERRERO, J. et al. Comparative analysis of extracellular proteins from *Pochonia chlamydosporia* grown with chitosan or chitin as main carbon and nitrogen sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 568-574, 2010.

SIDDIQUI, I. A.; ATKINS, S. D.; KERRY, B. R. Relationship between saprotrophic growth in soil of different biotypes of *Pochonia chlamydosporia* and the infection of nematode eggs. **Annals of Applied Biology**, v. 155, n. 1, p. 131-141, 2009.

TONER, E. et al. Disruption of egg formation by *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with triclabendazole in the sheep host. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 79-89, 2011.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2-3, p. 159-173, 2008.

ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H. C. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. **Nova Hedwigia**, v. 73, n. 1/2, p. 51-86, 2001.