

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**ALTERAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS EM *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (PULMONATA, PLANORBIDAE) POR INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Echinostoma paraensei* LIE & BASCH, 1967 (TREMATODA, ECHINOSTOMATIDAE).**

**VICTOR MENEZES TUNHOLI ALVES**

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ALTERAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS EM *Biomphalaria glabrata*  
SAY, 1818 (PULMONATA, PLANORBIDAE) POR INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL DE *Echinostoma paraensei* LIE & BASCH, 1967  
(TREMATODA, ECHINOSTOMATIDAE).**

**VICTOR MENEZES TUNHOLI ALVES**

*Sob a Orientação da Professora Doutora*  
**Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues**  
*e Co-orientação do Professor Doutor*  
**Jairo Pinheiro da Silva**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2012

594  
A474a  
T

Alves, Victor Menezes Tunholi, 1985-  
Alterações morfo-fisiológicas em  
Biomphalaria glabrata Say, 1818  
(Pulmonata, Planorbidae) por  
infecção experimental de Echinostoma  
paraensei Lie & Basch, 1967  
(Trematoda, Echinostomatidae) /  
Victor Menezes Tunholi Alves - 2012.  
82 f.: il.

Orientador: Maria de Lurdes de  
Azevedo Rodrigues.

Dissertação (mestrado) -  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 70-81.

1. Biomphalaria glabrata -  
Parasito - Teses. 2.  
Echinostomatidae - Teses. 3.  
Homeostase - Teses. 4. Parasitologia  
veterinária - Teses. I. Rodrigues,  
Maria de Lurdes de Azevedo, 1955-  
II. Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**VICTOR MENEZES TUNHOLI ALVES**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia VETERINÁRIA, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinária**.

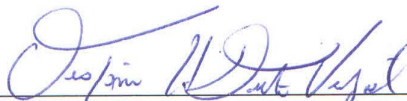
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2012.



Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues, UFRRJ.  
(Orientadora)



Dra. Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, UFRRJ.



Dra. Teofânia H. D. A. Vidigal, UFMG

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que trilhou ao meu lado toda essa trajetória e de toda minha vida, foi Apoio nas horas difíceis, foi Base nos momentos em que desanimei, foi Luz quando tudo parecia impossível, foi Amigo quando precisei chorar, foi Irmão quando me senti órfão, foi Alegria quando tudo deu certo, foi Deus quando eu sabia que mais nada dependia de mim e principalmente foi Amor, nos momentos felizes e tristes.

Aos meus pais, José Nilo e Sueli, que viveram comigo cada etapa da minha vida, me incentivando, educando, vibrando comigo nas minhas, ou melhor, nas nossas conquistas e sofrendo comigo quando tudo parecia tão difícil. Pela presença, mesmo quando eu estava longe. Por todas as renúncias e alegrias, meu amor e gratidão eternos.

A minha querida irmã Livia e Vovó Eunice que sempre me apoiaram em cada etapa da minha vida, me ajudando e incentivando em tudo.

A professora e orientadora Profa. Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues, DPA, IV, UFRRJ, pelo incentivo e confiança depositados em mim durante esse período, compartilhando comigo seus ensinamentos e amizade. O meu muito obrigado por ter apostado neste desafio!

Ao meu querido co-orientador, Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva, Área de Biofísica, DCF, IB, UFRRJ, que é muito mais que isso para mim, que faz o impossível por aqueles que estão próximos, sendo para mim não só um exemplo de pesquisador e profissional, mas de integridade e generosidade. Muito obrigado por sua paciência e por todos os seus ensinamentos concedidos a mim ao longo desses anos.

Ao meu irmão e amigo Vinícius por estar presente em todas as inúmeras etapas de minha vida. Obrigado por seus conselhos e cumplicidade. Obrigado por sua dedicação ao longo dos “meus” inúmeros experimentos e durante a fase de redação desse “meu” trabalho. Sem você tudo seria muito mais difícil.

Ao meu amigo e irmão Danilo pelos seus conselhos e ensinamentos a mim destinados. Aprendi e amadureci muito através do seu senso crítico tão essencial na formação de um verdadeiro mestre. Obrigado por se fazer presente nos experimentos realizados, pelos seus questionamentos e dúvidas ao longo desse trabalho. Sua participação foi vital para esse sucesso.

Aos professores Dr. Arnaldo Maldonado Júnior e Dra. Clélia Cristina Corrêa Mello-Silva, FIOCRUZ, RJ, que me receberam em seus respectivos laboratórios, e proporcionaram as condições necessárias para o bom desenvolvimento da minha dissertação, além do carinho e atenção a mim destinados.

A colega Patrícia Gôlo e a Profa. Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt, DPA, IV, UFRRJ, pela contribuição valiosíssima nas análises de lipídeos neutros teciduais.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, DPA, IV, UFRRJ, pela disponibilidade, troca de conhecimentos e vivências, amizade e respeito, permitindo fazer parte de suas vidas e experiências.

Aos amigos Fabrícia Viana, Elaine Liporage, Iracema Araújo, André Mecawi, Raquel do Nascimento, Ludimila Santos Amaral, Juberlan Garcia e Sócrates Neto pela convivência e conselhos concedidos a mim ao longo desses anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelas bolsas que permitiram a realização dessa dissertação.

Quando citamos nomes, corremos o risco de esquecer alguém, e, por isso, gostaria de agradecer a todos que, embora não tenham sido mencionados, estiveram presentes comigo durante a realização deste trabalho, auxiliando e transmitindo seus conhecimentos.

## **BIOGRAFIA**

Victor Menezes Tunholi Alves, filho de José Nilo Alves e Sueli Menezes Tunholi Alves, nascido em 1985, no Município de Cachoeiro de Itapemirim, ES.

Realizou os estudos primário e secundário nas Escolas Municipal Antônio Acha e Guimarães Rosa, ES, respectivamente. Em abril de 2004 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foi monitor das disciplinas Parasitologia II, Departamento de Parasitologia Animal, IV, e Patologia Clínica, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, IV. Adicionalmente, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), trabalhando no estudo da Interface *Echinostoma paraensei/Biomphalaria glabrata*, sob a orientação do Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva.

Graduou-se em Medicina Veterinária pela UFRRJ em setembro de 2009. Em março de 2010, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Parasitologia Veterinária da UFRRJ, a nível de Mestrado.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 <i>Biomphalaria</i> Preston,1910.....	2
2.2 <i>Echinostoma</i> spp.....	5
2.2.1 Introdução.....	5
2.2.2 Ciclo de vida.....	8
2.2.3 Importância dos equinostomatídeos em saúde pública.....	9
2.2.4 Importância de <i>Echinostoma</i> spp. em animais silvestres e domésticos.....	10
2.2.5 Equinóstomas como modelos experimentais.....	10
2.3 Relação entre moluscos vs trematódeos.....	12
2.3.1 Aspectos referentes à biologia reprodutiva em moluscos infectados por estágios larvais de trematódeos digenéticos.....	12
2.3.2 Aspectos referentes ao metabolismo de cálcio em moluscos infectados por estágios larvais de trematódeos digenéticos.....	13
2.3.3 Aspectos referentes ao metabolismo de proteínas e da atividade das aminotransferases em moluscos infectados por estágios larvais de trematódeos digenéticos.....	15
2.3.4 Aspectos referentes ao metabolismo de produtos nitrogenados em moluscos infectados estágios larvais de trematódeos digenéticos.....	16
2.3.5 Aspectos referentes ao metabolismo lipídico em moluscos infectados por estágios larvais de trematódeos digenéticos.....	17
3 OBJETIVOS .....	19
4 CAPÍTULO I Alterações na biologia reprodutiva de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com diferentes doses miracidiais de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
4.1 INTRODUÇÃO.....	23
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.2.1 Coleta de ovos de <i>Echinostoma paraensei</i> e obtenção dos miracídios.....	24
4.2.2 Obtenção de <i>Biomphalaria glabrata</i> e infecção experimental.....	24
4.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos.....	24
4.2.4 Análise da taxa ovipositória de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados com <i>Echinostoma paraensei</i> .....	24
4.2.5 Análises estatísticas.....	24
4.3 RESULTADOS.....	25
4.4 DISCUSSÃO.....	26
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
5 CAPÍTULO 2 A influência da infecção de <i>Echinostoma paraensei</i> (Lie e Basch, 1967) sobre o conteúdo de cálcio na hemolinfa e concha de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818).....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
5.1 INTRODUÇÃO.....	34
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35



5.2.1 Coleta de ovos de <i>Echinostoma paraensei</i> e obtenção dos miracídios.....	35
5.2.2 Obtenção de <i>Biomphalaria glabrata</i> e infecção experimental.....	35
5.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos.....	35
5.2.4 Dissecção e coletas da hemolinfa e concha .....	35
5.2.5 Determinação das concentrações de cálcio na hemolinfa e concha.....	36
5.2.6 Análises estatísticas.....	36
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
6 CAPÍTULO 3 Perfil bioquímico de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Mollusca: Gastropoda) após infecção por <i>Echinostoma paraensei</i> (Trematoda: Echinostomatidae).....	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
6.1 INTRODUÇÃO.....	46
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
6.2.1 Obtenção dos miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	47
6.2.2 Infecção experimental de <i>Biomphalaria glabrata</i> (isolado: Sumidouro, RJ).....	47
6.2.3 Dissecção e coleta da hemolinfa.....	47
6.2.4 Atividade das aminotransferases (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase).....	47
6.2.5 Dosagem de proteínas totais.....	47
6.2.6 Determinação das concentrações de ácido úrico e uréia.....	48
6.2.7 Análises estatísticas.....	48
6.3 RESULTADOS.....	48
6.4 DISCUSSÃO.....	51
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
7 CAPÍTULO 4 Níveis lipídicos em <i>Biomphalaria glabrata</i> infectadas com diferentes doses miracidiais de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	56
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
7.1 INTRODUÇÃO.....	59
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
7.2.1 Obtenção dos miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	59
7.2.2 Infecções experimentais de <i>Biomphalaria glabrata</i> (isolado: Sumidouro, RJ) e formação dos grupos.....	60
7.2.3 Determinações das concentrações de triacilglicerol e colesterol na hemolinfa.....	60
7.2.4 Cromatografia em camada fina monodimensional e análise de imagem.....	60
7.2.5 Análises histológicas.....	61
7.2.6 Análises estatísticas.....	61
7.3 RESULTADOS.....	61
7.4 DISCUSSÃO.....	64
7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8 CONCLUSÕES.....	69
9 REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS.....	70
10 ANEXOS.....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura ilustrativa de <i>Biomphalaria glabrata</i> sem a concha, vista pelo lado esquerdo. Fonte: Paraense; Deslandes, 1955.....	3
Figura 2. Vista lateral dos órgãos de <i>Biomphalaria glabrata</i> com o manto e o saco bucal dissecados (Figura ilustrativa). Legenda e apresentação das figuras modificada a partir dos originais. Fonte: Paraense; Deslandes (1955).....	4
Figura 3. Micrografia eletrônica de <i>Echinostoma paraensei</i> (isolado do Rio de Janeiro). Vista ventral de <i>E. paraensei</i> demonstrando a ventosa oral (os), colar peristômico (pc), acetábulo (a). <b>B</b> Vista ventral demonstrando colar peristômico e bolsa do cirro protuberada (c). Fonte: Maldonado et al. (2001).....	6
Figura 4. <i>Echinostoma paraensei</i> (isolado do Rio de Janeiro). <b>a</b> parasito adulto, 28 dias de idade, <b>b</b> colar peristômico, <b>c</b> bolsa do cirro (c), vesícula seminal (sv), glândula prostática (pg) e útero terminal com ovos. Fonte: Maldonado et al. (2001).....	6
Figura 5. Ilustração do ciclo de vida de <i>Echinostoma paraensei</i> . Fonte: Maldonado (2002).....	7
 CAPÍTULO 1	
Figura 1. Efeito da infecção por <i>Echinostoma paraensei</i> sobre a biologia reprodutiva de <i>Biomphalaria glabrata</i> , em função da dose miracidial (5 e 50 miracídeos), por um período de quatro semanas. (A) número de ovos/molusco; (B) número de ovos viáveis/molusco; (C) número de massas/molusco e (D) número de ovos/número de massas. Valores são expressos como médias $\pm$ erro padrão da média.....	26
 CAPÍTULO 2	
Figura 1. Conteúdo de cálcio na hemolinfa (A) e na concha (B) de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com 5 (●) ou 50 (■) miracídeos de <i>Echinostoma paraensei</i> , em diferentes períodos de infecção (em semanas). Zero (0) semana pós-infecção representa o valor da média do grupo controle. Os resultados representam as alterações percentuais dos conteúdos de cálcio em moluscos infectados por <i>Echinostoma</i> usando os valores do grupo controle como referência.....	37
 CAPÍTULO 3	
Figura 1. Relação entre a atividade da alanina aminotransferase, expressa em URF/ml, na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de <i>Echinostoma paraensei</i> e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada	

período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). <sup>a, b, c</sup> = Médias diferem significativamente entre si.  
(média±DP)..... 49

Figura 2. Relação entre a atividade da aspartato aminotransferase, expressa em URF/ml, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por 5 (**A**) e 50 (**B**) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). <sup>a, b, c</sup> = Médias diferem significativamente entre si.  
(média±DP)..... 49

Figura 3. Relação entre a concentração de proteínas totais, expresso em g/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por 5 (**A**) e 50 (**B**) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). <sup>a, b, c</sup> = Médias diferem significativamente entre si.  
(média±DP)..... 50

Figura 4. Relação entre a concentração de ácido úrico, expresso em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por 5 (**A**) e 50 (**B**) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). <sup>a, b, c</sup> = Médias diferem significativamente entre si.  
(média±DP)..... 50

Figura 5. Relação entre a concentração de uréia, expresso em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por 5 (**A**) e 50 (**B**) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). <sup>a, b, c</sup> = Médias diferem significativamente entre si.  
(média±DP)..... 51

#### CAPÍTULO 4

Figura 1. Conteúdo percentual médio de lipídeos neutros no complexo glândula digestiva-gônada (DGG) de *Biomphalaria glabrata* infectada por 5 (●) e 50 (■) miracídios de *Echinostoma paraensei* em função do tempo de infecção, expresso em semanas. 0 (zero) semana representa a média obtida do grupo controle ao longo das quatro semanas de análises. (**A**) Conteúdo de colesterol (CHO); (**B**) Conteúdo de colesterol esterificado (CHOE); (**C**) conteúdo de triacilglicerol (TAG) e (**D**) Conteúdo de ácidos graxos (AG). Todos os valores foram expressos como percentagem do grupo controle..... 63

Figura 2. Corte histológico da glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata*. **A** e **B** - Seção de moluscos não infectados mostrando a região da glândula digestiva funcional. Barra de escala = 50  $\mu$ m. **C** e **D**- Corte histológico da região da glândula digestiva de moluscos experimentalmente infectados com 5 e 50 miracídios, respectivamente de *Echinostoma paraensei* exibindo uma região caracterizada por uma intensa desorganização celular em função da presença de estágios de rédias (↑), demonstrando ventosa oral (vo) e faringe muscular (f). Barra de escala = 70  $\mu$ m..... 64

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Efeito da infecção de *Biomphalaria glabrata* com *Echinostoma paraensei* em função da dose miracidial (5 e 50). Dados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média. <sup>a, b, c</sup>= médias diferem significativamente entre si ( $\alpha=5\%$ )..... 25

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Conteúdo de cálcio na hemolinfa (mg/dl), e na concha (mg of CaCO<sub>3</sub>/g de concha) de *Biomphalaria glabrata* infectada com 5 ou 50 miracídeos de *Echinostoma paraensei*, em diferentes períodos de infecção (semanas).  $X \pm SD$ =média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a, b, c</sup>= médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente de seus respectivos grupo controle em cada semana experimental,  $P < 0.05$ ..... 37

### CAPÍTULO 4

Tabela 1. Variação nos conteúdos médios de colesterol e triglicerídeos na hemolinfa (mg/dl) de *Biomphalaria glabrata* infectadas com 5 e 50 miracídeos de *Echinostoma paraensei*, em função do tempo de infecção, expressos em semanas. A semana zero (0) é demonstrada como a média do grupo controle, uma vez que não houve diferença significativa entre estes ao longo das quatro semanas de análises. <sup>a, b, c</sup> = Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si,  $P < 0.05$ , (média $\pm$ SD=média $\pm$ desvio-padrão)..... 62

## RESUMO

TUNHOLI, Victor Menezes Alves. **Alterações Morfo-fisiológicas Em *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) Por Infecção Experimental De *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae).** 2012. 145p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Com ciclo biológico complexo, os parasitos pertencentes ao gênero *Echinostoma*, caracterizam-se por apresentar o hábitat restrito à luz intestinal dos hospedeiros definitivos, na qual se destacam as aves aquáticas, mamíferos, incluindo o homem, e ocasionalmente algumas espécies de répteis e peixes. Possuem como primeiro hospedeiro intermediário moluscos límnicos, onde os miracídios penetram ativamente e desenvolvem até as fases de cercárias e crustáceos, anfíbios, peixes e moluscos límnicos como segundo hospedeiro intermediário onde ocorre a formação de metacercárias, fase infectante ao hospedeiro definitivo. Neste estudo, *Biomphalaria glabrata* foi infectada com diferentes doses miracidiais (5 ou 50) de *E. paraensei* e após uma, duas, três e quatro semanas de infecção os moluscos foram dissecados para a coleta da hemolinfa, conchas e tecidos (complexo gônada-glândula digestiva- GGD). Observou-se a oviposição dos moluscos. Na hemolinfa foram dosadas proteínas totais, uréia, ácido úrico, cálcio, colesterol e triacilglicerol, bem como as atividades das transaminases (ALT e AST). Nos tecidos foram mensurados os conteúdos de lipídeos neutros (ácidos graxos, triacilglicerol, colesterol e colesterol esterificado) e nas conchas, quantificados os conteúdos de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Diferenças significativas foram observadas no estado bioenergético dos moluscos infectados com ambas as doses miracidiais em relação ao grupo controle (não-infectado), provavelmente em consequência da intensa formação de aminoácidos gliconeogênicos a partir do catabolismo protéico em resposta ao estresse gerado pelo parasitismo. O aumento da calcemia pode ser justificado devido ao alto consumo energético nos moluscos infectados, onde o metabolismo anaeróbico pode estar mais ativo culminando com o acúmulo de ácidos orgânicos que diminuem o pH da hemolinfa. Simultaneamente, acentuados decréscimos dos conteúdos de cálcio nas conchas foram constatados em *B. glabrata* infectadas por ambas as doses miracidiais (5 e 50) de *E. paraensei*, o que coincidiu com o pico da calcemia nestes mesmos organismos. Diminuições no conteúdo de proteínas totais na hemolinfa dos organismos infectados foram observadas, relacionando-se com o provável aumento das vias gliconeogênicas. Este consumo protéico é confirmado pelo aumento das atividades das transaminases (ALT e AST), efeito também decorrente ao aparecimento de rédias no molusco, bem como, ratificado pelo acúmulo de ácido úrico e uréia. Aumentos significativos na oviposição também foram evidenciados. Em adição, a significativa alteração no perfil lipídico dos moluscos infectados indica intensa utilização desse substrato tanto pelo hospedeiro intermediário quanto pelo parasito, sugerindo sua provável participação no metabolismo energético e estrutural. Os resultados observados neste estudo indicam que a infecção com cinco ou 50 miracídios de *E. paraensei* provocou consideráveis alterações metabólicas em *B. glabrata*, sendo que os moluscos expostos a maior carga miracidial apresentaram os maiores danos, caracterizando uma resposta dose-dependente.

**Palavras-chaves:** *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*, homeostase.

## ABSTRACT

TUNHOLI, Victor Menezes Alves. **Morpho-Physiological Alterations In *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) Experimentally Infected With *Echinostoma paraensei* Lie And Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae).** 2012. 145p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Parasites belonging to the *Echinostoma* genus are characterized by having a complex biological cycle, with two intermediate hosts and a final habitat restricted to the intestinal lumen of the definitive hosts. These hosts include aquatic birds, mammals (including humans) and occasionally some reptile and fish species. Their first intermediate hosts are freshwater snails, into which the miracidia actively penetrate for development of the next three stages (sporocysts, rediae and cercariae). Freshwater crustaceans, amphibians, fish and snails act as the second intermediate hosts, enabling the formation of metacercariae, the infective larval stage to the definitive host. In this work, *Biomphalaria glabrata* specimens were experimentally infected with different doses (5 or 50) of *E. paraensei* miracidia. The snails were dissected one, two, three and four weeks after infection to collect the hemolymph, shells and tissues (gonad-digestive gland complex- GDG). During this period, the snails' oviposition was observed. In the hemolymph, the concentrations of total proteins, urea, uric acid, cholesterol and triglycerides were measured, as well as the activities of the transaminases (ALT and AST). In the tissues, the levels of neutral lipids (fatty acids, triglyceride, cholesterol and esterified cholesterol) were measured, and in the shells the CaCO<sub>3</sub> content was quantified. Significant differences were observed in the bioenergy state of the snails infected with both miracidium doses in relation to the control group (not infected), probably because of the intense formation of glucogenic amino acids from the protein catabolism in response to the stress generated by the parasites. Because of the high energy consumption of the infected snails, it is possible that the anaerobic metabolism becomes more active, culminating in the accumulation of organic acids that reduce the pH of the hemolymph, thus explaining the significant increase in calcemia. In parallel, accentuated decreases in the calcium levels in the shells were found in the snails infected by both miracidium doses (5 and 50), which coincided with the peak calcemia in these specimens. Drastic declines in the total protein concentration in the hemolymph were observed in the infected snails, related to the probable increase of the activities of the transaminases (ALT and AST), an effect also caused by the appearance of rediae and corroborated by the accumulation of uric acid and urea. Additionally, the significant alteration of the lipid profile of the infected snails indicates intense utilization of lipids as a substrate both by the intermediate host and the parasite, suggesting the probable participation of lipids in the energy and structural metabolism of both organisms. The results observed in this study indicate that infection with 5 or 50 *E. paraensei* miracidia caused considerable metabolic changes in *B. glabrata*, with the snails exposed to the higher number of miracidia suffering greater damage.

**Key words:** *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*, homeostasis.

## 1 INTRODUÇÃO

Moluscos pertencentes às classes Gastropoda e Bivalvia são organismos invertebrados de grande importância para a medicina humana e veterinária, pois participam como hospedeiros intermediários de ciclos de vários parasitos principalmente dos trematódeos digenéticos. Muitos desses helmintos acometem animais domésticos e de produção, bem como o homem causando respectivamente, perdas econômicas principalmente em rebanhos de corte e problemas de saúde pública (SANTOS et al., 2009).

Os resultados dos inúmeros tipos de relações parasito-hospedeiro existentes são quase sempre interpretados como um processo adaptativo que ocorre entre ambos os organismos (TOFT et al., 1991; LAFFERTY, 1992; PINHEIRO et al., 2009). Como consequência, alterações comportamentais são onipresentes nos hospedeiros infectados, onde passam a optar por micro habitats e tipos de dietas, por exemplo, que diferem dos organismos não parasitados. Além disto, mudanças nos “status” sociais, fenotípicas, habilidade competitiva e na atratividade aos companheiros são frequentemente observados nos animais infectados (MOORE; GOTELLI, 1990) a fim de facilitar a etapa de transmissão do parasito, aumentando por vezes a probabilidade do organismo infectado ser predado (MOORE, 1983).

Para Trail (1980), a interação parasito-hospedeiro promove alterações nos padrões fisiológicos dos moluscos por afetar seu metabolismo, onde os parasitos são capazes de induzir mudanças no comportamento do hospedeiro que resultam em economia de energia. Deste modo, o hospedeiro passa a gastar menos energia nos padrões de comportamento agressivo, de corte e de reprodução, poupando esta energia de forma que possa ser disponibilizada para garantir o desenvolvimento do parasito (MINCHELLA, 1985). Por outro lado, segundo Becker (1980), ao invadir o seu hospedeiro molusco, as larvas de trematódeos causam-lhe danos pela retirada de substâncias, as quais seriam utilizadas como nutrientes pelo hospedeiro e são drenadas pelas larvas, causando-lhe um estado energético desfavorável. Além da retirada de substratos utilizados pelo molusco para a manutenção de seu metabolismo basal e para os processos de crescimento e reprodução, as larvas de trematódeos ainda eliminam, no interior do organismo, os seus produtos de excreção/secreção que por sua vez, acabam alterando a composição normal da hemolinfa, interferindo assim na homeostase do animal hospedeiro.

Parasitos pertencentes ao gênero *Echinostoma* (Rudolphi, 1809) apresentam grande importância tanto em medicina humana quanto veterinária por infectarem quando adultos uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo desde espécies de peixes, répteis, aves e mamíferos. Adicionalmente, dados indicam a infecção de humanos por equinostomatídeos através da ingestão de caramujos e peixes crus ou mal cozidos (KANEV et al., 2000).

O molusco planorbídeo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) está comumente associado à alta morbidade da esquistossomíase devido à vasta distribuição e altos índices de infecção, advindo desse fato, sua grande importância em saúde pública. Concomitantemente, estudos observacionais e experimentais têm constatado a susceptibilidade de *B. glabrata* à infecção por *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) (MALDONADO et al., 2001a,b).

O trematódeo digenético *E. paraensei* foi descrito no Brasil a partir de *B. glabrata* naturalmente infectadas coletadas no estado de Minas Gerais e todas as fases do ciclo biológico foram desenvolvidas em laboratório, utilizando a mesma espécie de molusco, bem como, hamsters, ratos albinos e camundongos. A descrição morfológica de todos os estágios evolutivos foi realizada com auxílio da microscopia de luz e eletrônica (LIE; BASCH, 1967).

Muitos estudos são realizados com o objetivo de elucidar o ciclo de vida dos parasitos, sua rota de migração e como a infecção se processa ao longo do tempo em que estão hospedando moluscos, baseando nos mecanismos desenvolvidos pelos estágios larvais durante este período com a finalidade de estabelecerem medidas voltadas para o seu controle (WHITE et al., 2005; MOSTAFA, 2007; MELLO-SILVA et al., 2010). No Brasil, pouco se conhece sobre a bioquímica de parasitos *E. paraensei* e com este estudo pretende-se reconhecer as alterações morfológicas e fisiológicas em *B. glabrata* infectadas com cinco ou cinquenta miracídios de *E. paraensei* em diferentes estágios de desenvolvimento, durante quatro semanas de infecção, tempo que corresponde o período pré-patente do parasito (LIE; BASCH, 1967).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Biomphalaria* Preston, 1910

Em termos de abundância de espécies, os moluscos constituem o segundo maior filo de invertebrados, logo após os artrópodes. Mais de 50.000 espécies vivas de moluscos já foram descritas (BARNES, 1996; BARKER, 2001). Os gastrópodes compreendem cerca de três quartos do número total de espécies de moluscos. Os pulmonados, que incluem a ordem Basommatophora, estão representados nas águas continentais da América do Sul tropical pelas seguintes famílias: Chiliniidae, Lymnaeidae, Physidae, Ancyliidae e Planorbidae (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Muitos destes organismos têm importância fundamental no ciclo de vida dos trematódeos digenéticos e alguns nematóides, atuando como hospedeiros intermediários (ROLLINSON, 2001). Adema e Loker (1997) iniciaram o seu trabalho chamando a atenção sobre os digenéticos, que apesar da grande diversidade em espécies e complexidade dos ciclos biológicos, todos têm como ponto básico a utilização de moluscos como hospedeiros para o desenvolvimento larval. Aproximadamente 40.000 espécies de trematódeos requerem moluscos para completar seu ciclo vital, havendo relatos de cercárias pertencentes a 76 famílias em moluscos das classes Gastropoda (66 famílias), Bivalvia (9 famílias) e Scaphopoda (1 família), de acordo com Cribb et al. (2001) e Dillon (2000). Estes dados refletem a importância dos gastrópodes e em especial a espécie *B. glabrata* como hospedeiros de parasitos para animais silvestres e domésticos, assim como para o homem.

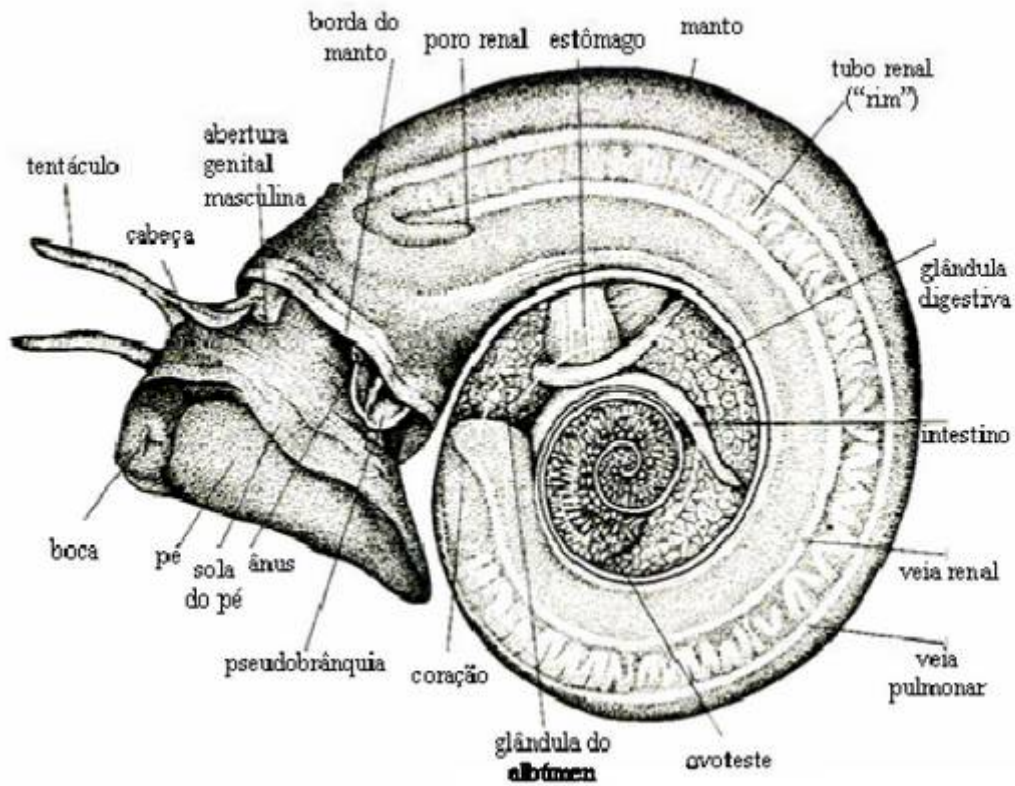
Estudos sobre a helmintofauna têm registrado inúmeras associações parasito-molusco em várias regiões brasileiras sendo *Biomphalaria* o gênero com maior variedade de tipos cercarianos (PARAENSE; ARAÚJO, 1984; VEINTEINHEIMER-MENDES et al., 1995; SOUZA et al., 1998; THIENGO et al., 2004). Segundo Hetneman (1960) e Rohde (1971, 2001), a íntima relação observada entre moluscos e trematódeos digenéticos, associada com a história evolutiva dos trematódeos digenéticos, aponta que estes tiveram origem de um ancestral turbelário rabdocele de vida livre, que habitava como comensal a cavidade palial de moluscos, tornando-se posteriormente, parasitos obrigatórios e dependentes, tendo desenvolvido vários tipos de adaptações que assegurassem a infecção nestes hospedeiros.

Os moluscos *Biomphalaria* Preston, 1910, pertencem ao Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora e Família Planorbidae. O nome do gênero tem origem do latim e refere-se a *Bis* (duas vezes) e *omphalos* (umbigo), devido ao aprofundamento do giro central em ambos os lados da concha. A sinonímia no Brasil é *Planorbina* Haldeman, 1843, *Armigerus* Clessin, 1884, *Thaphius* H.A. & Adams, 1855, *Tropicorbis* Brow & Pilsbry, 1914, *Australorbis* Pilsbry, 1934 (PARAENSE, 1975).

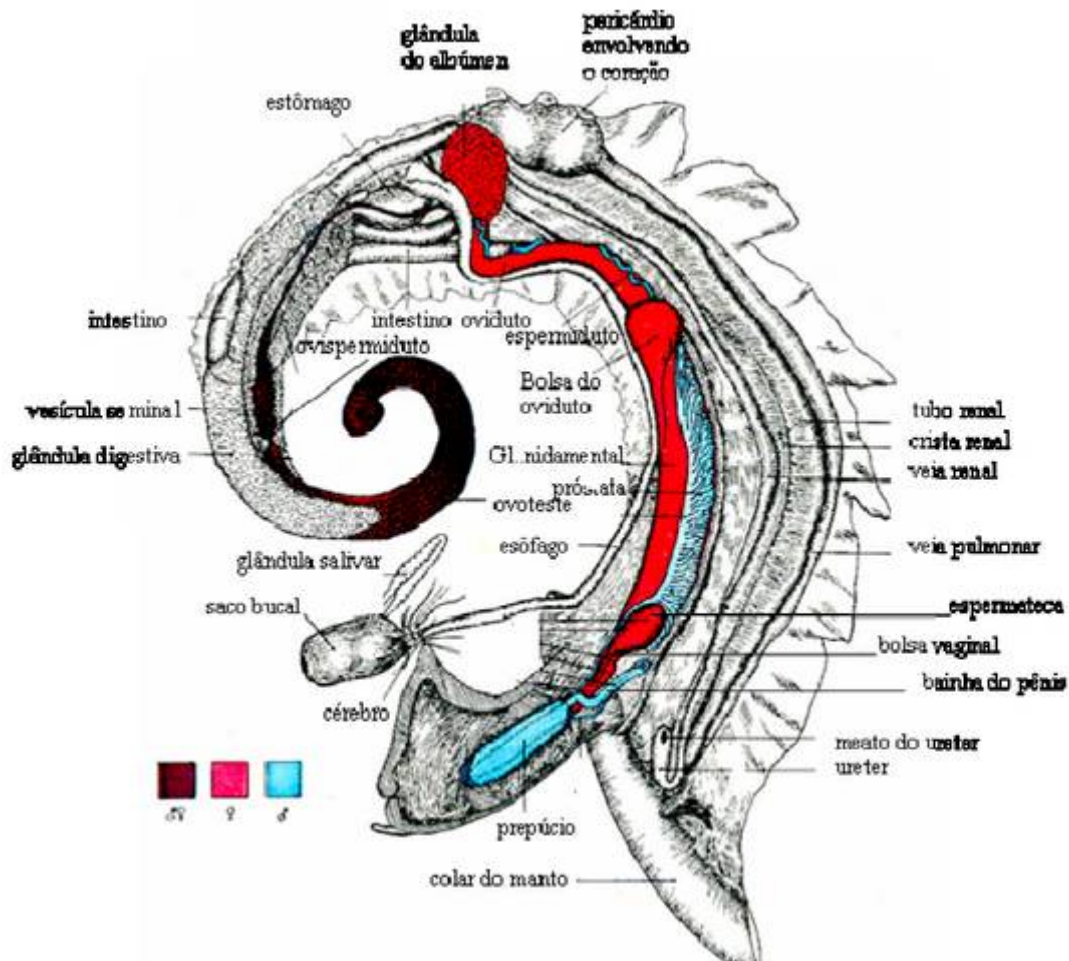
Anatomicamente, a parte mole de um gastrópode planorbídeo é mostrada do lado esquerdo, permitindo a visão dos órgãos internos (Figura 1). A massa cefalopediosa (cabeça e pé), exposta quando o molusco se movimenta, é unida pelo colo à massa visceral que é permanentemente protegida pela concha. Na massa cefalopediosa (lado esquerdo) encontra-se



a abertura anal e proximamente ao colo, encontramos as aberturas genitais masculina e feminina separados, pois são hermafroditas, apresentando ovoteste. O sistema genital é composto basicamente de um ovoteste, que produz óvulos e espermatozóides, seguido de um canal para a passagem dos mesmos, o qual se divide em dois ramos, um masculino e outro feminino (Figura 2) (PARAENSE; DESLANDES, 1955).



**Figura 1** Esquema ilustrativo de *Biomphalaria glabrata* sem a concha, vista pelo lado esquerdo. Fonte: Paraense; Deslandes, 1955.



**Figura 2** Vista lateral dos órgãos de *Biomphalaria glabrata* com o manto e o saco bucal dissecados (Figura ilustrativa). Legenda e apresentação das figuras modificada a partir dos originais. Fonte: Paraense; Deslandes (1955).

*Biomphalaria* abrange cerca de vinte espécies, sendo amplamente distribuído na África, América do Sul, Caribe, sudoeste da Ásia (Arábia Saudita e Iêmen), na América Central e sul dos Estados Unidos (PARAENSE, 1975; BANDONI et al., 1995; DEJONG et al., 2001), com características biológicas fundamentais para a preservação e a expansão das espécies e populações, em ambientes sujeitos as perturbações ambientais: 1) são hermafroditas simultâneas e se reproduzem tanto por fecundação cruzada, quanto por autofecundação (PARAENSE, 1955); e, 2) em situações de seca, dessecam, mantendo-se vivos, recolhidos à concha, em estágio fisiológico vegetativo, preservando-se até a próxima estação úmida (TUAN; SIMÕES, 1989).

No Brasil, este gênero compreende onze espécies e uma subespécie (TEODORO et al., 2010) das quais três foram encontradas naturalmente infectadas por *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *B. glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), sendo a primeira considerada a de maior importância em saúde pública, devido à ampla distribuição geográfica já notificada em 16 estados brasileiros mais o Distrito Federal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007); capacidade de adaptação em diferentes condições ambientais e maior susceptibilidade à infecção pelo parasito (SOUZA; LIMA, 1990).

Os equinostomatídeos, por sua vez, são exemplos adicionais de trematódeos digenéticos que apresentam como hospedeiros intermediários algumas espécies de moluscos límnicos, incluindo *B. glabrata*. Muitas aves, mamíferos selvagens e domésticos, incluindo humanos mostram-se susceptíveis a infecção por *Echinostoma* spp, apresentando, portanto importância médica e veterinária (MALDONADO Jr. et al, 2006).

Em adição, trabalhos têm identificado a possibilidade de *B. glabrata* atuar como hospedeiro intermediário para *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971, *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) e *Angiostrongylus cantonensis* (Cheng, 1935) (STUART, 1985; BARÇANTE, 2003; TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

Porém, no Brasil pouco tem sido feito em relação à fisiologia comparada dos moluscos de interesse médico-veterinário quando expostos a condições de estresse fisiológico, mesmo sendo este um dos pontos mais suscetíveis no ciclo de vida dos trematódeos e de certos nematóides ao controle, seja ele químico ou biológico.

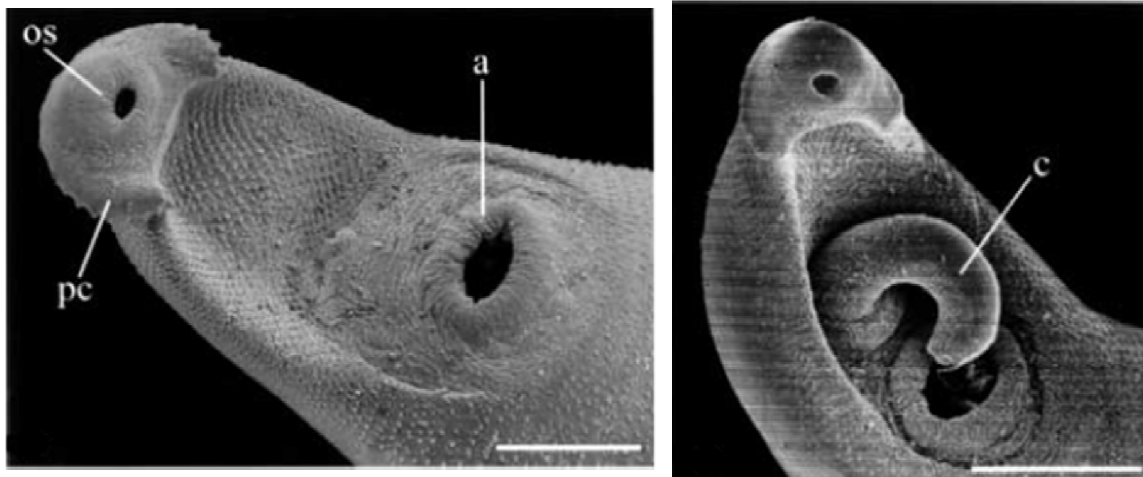
## **2.2 *Echinostoma* spp**

### **2.2.1 Introdução**

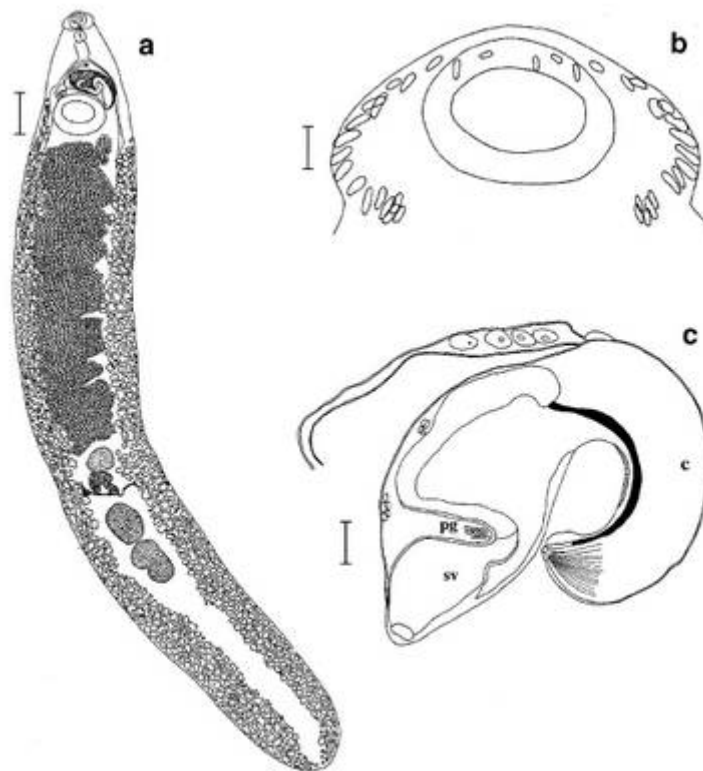
O gênero *Echinostoma* tem como espécie tipo *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) Dietz, 1909, entretanto, o grupo dos equinostomatídeos apresenta muitos aspectos controversos relacionados à sua taxonomia. Kanev (1994), utilizando apenas informações sobre a biologia de *E. revolutum*, afirmou que esta espécie utilizava exclusivamente aves como hospedeiros definitivos e moluscos límnicos como primeiro hospedeiro intermediário. Já os espécimes encontrados em roedores pertenceriam à espécie *Echinostoma caproni* Richard, 1964, que apresenta *Biomphalaria* spp. como primeiro e segundo hospedeiros intermediários e roedores como hospedeiro definitivo. O aspecto biológico levou a considerar *E. paraensei* e *E. caproni* como sinônimas (CHRISTENSEN et al., 1990); já Sloss et al. (1995), utilizando ferramentas bioquímicas como eletroforese em gel, observaram que *E. paraensei* e *E. caproni* possuíam seis sistemas enzimáticos diferentes entre si, em um total de dez, demonstrando que *E. paraensei* está geneticamente mais próximo de *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) do que de *E. caproni*, tratando-se portanto de espécies diferentes. Estudos baseados em técnicas de biologia molecular (FUJINO et al., 1999), vêm ratificar os resultados obtidos por Sloss et al. (1995).

Estes parasitos têm sido largamente estudados por algumas razões: (1) apresentam ampla distribuição geográfica; (2) são encontrados em muitas aves, mamíferos selvagens e domésticos, incluindo humanos. Muitos equinóstomas são hematófagos; (3) infectam a maioria dos órgãos e sítios na cavidade abdominal das aves e mamíferos, incluindo o trato alimentar, excretor e sistemas reprodutores; (4) adultos e larvas constituem bons materiais para estudos biológicos, fisiológicos, bioquímicos, imunológicos e outros estudos em biologia moderna; e (5) podem ser mantidos facilmente em laboratório com baixo custo (KANEV, 2000).

*Echinostoma paraensei* é uma espécie brasileira de equinostomatídeo, pertencente ao grupo “*revolutum*”, pois quando adultos os helmintos apresentam colar cefálico ou peristômico formado por 37 espinhos (Figura 2 e 3).

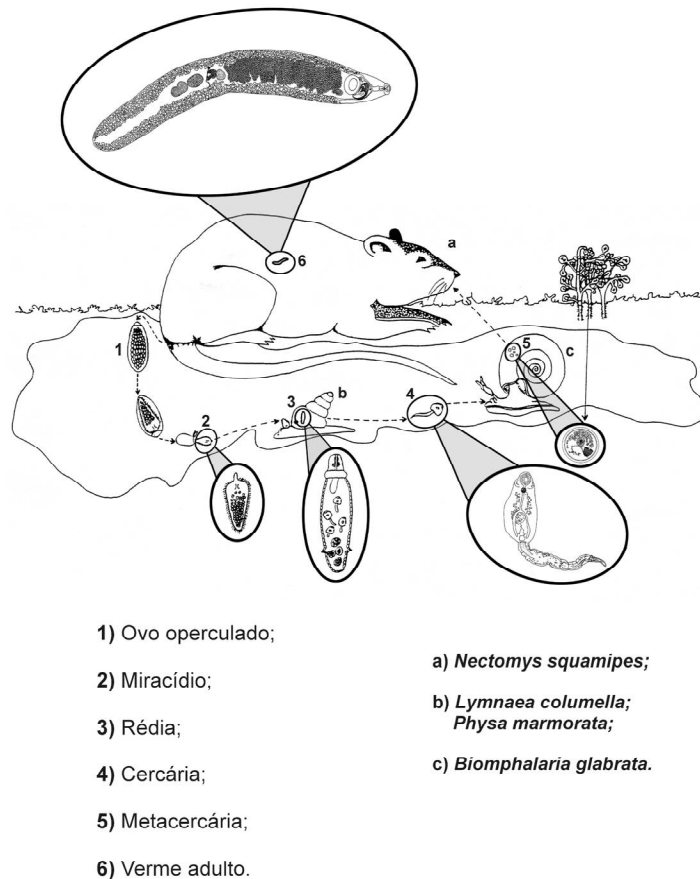


**Figura 3** Micrografia eletrônica de *Echinostoma paraensei* (isolado do Rio de Janeiro). **A** Vista ventral de *E. paraensei* demonstrando a ventosa oral (os), colar peristômico (pc), acetábulo (a). **B** Vista ventral demonstrando colar peristômico e bolsa do cirro protuberada (c). Fonte: Maldonado et al. (2001).



**Figura 4** *Echinostoma paraensei* (isolado do Rio de Janeiro). **a** parasito adulto, 28 dias de idade, **b** colar peristômico, **c** bolsa do cirro (c), vesícula seminal (sv), glândula prostática (pg) e útero terminal com ovos (Barras de escalas são 100 $\mu$ m exceto para o parasito adulto que é 1mm). Fonte: Maldonado et al. (2001).

Maldonado et al., (2001a,b) identificaram como hospedeiro definitivo natural, o roedor *Nectomys squamipes* Brants, 1827, conhecido popularmente como rato d'água, e propuseram o ciclo de vida natural deste parasito (Figura 4). Estes pesquisadores também demonstraram que estágios larvais de *E. paraensei* em *B. glabrata* podem interferir potencialmente na sobrevivência de *S. mansoni*. Alguns estudos realizados por estes autores demonstraram a participação direta de *E. paraensei* no controle biológico da esquistossomose, pois as rédias deste parasito atacam e destroem os esporocistos de *S. mansoni*. Deste modo, verificar as possíveis alterações fisiológicas nos moluscos parasitados por *E. paraensei* contribuirá para elucidar este processo.



**Figura 5** Esquema básico ilustrativo do ciclo de vida do trematódeo digenético *Echinostoma paraensei*. Fonte: Maldonado (2002).

Taxonomicamente, a espécie *E. paraensei* está agrupada da seguinte forma:

- Filo: Plathelminthes
- Superclasse: Cercomeria Brooks, 1982
- Classe: Cercomeridae Brooks, O'Grady & Glen, 1985
- Subclasse: Trematoda Rudophi, 1808
- Infraclasse: Digenea Carus, 1863
- Ordem: Echinostomatida La Rue, 1957
- Superfamília: Echinostomatoidea Looss, 1899

- Família: Echinostomatidae Looss, 1899
- Gênero: *Echinostoma* Rudolphi, 1809
- Espécie: *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967)

### 2.2.2 Ciclo de vida

Os equinostomatídeos apresentam três hospedeiros em seu ciclo biológico: hospedeiro definitivo vertebrado, o primeiro hospedeiro intermediário (geralmente representado por um molusco gastrópode aquático), e o segundo hospedeiro intermediário (exemplificado por moluscos gastrópodes e bivalves, peixes, alguns crustáceos e anfíbios) que carrega o estágio metacercarial. O ciclo de vida consiste de seis etapas:

1. Eliminação dos ovos não embrionados juntamente com as fezes pelo hospedeiro definitivo infectado em ambiente aquático com o subsequente desenvolvimento do miracídio. Segundo Esteban e Muñoz-Antoli (2009), os ovos das espécies de equinostomas levam de 10-21 dias a temperatura de 22-28°C para possibilitar o desenvolvimento completo do estágio miracidial;

2. Eclusão, busca e penetração ativa dos miracídios no primeiro hospedeiro intermediário. Pinheiro et al. (2005) utilizando microscopia eletrônica de transmissão observaram que os miracídios de *E. paraensei* apresentam a capacidade de realizar clivagem das células germinativas antes de sua penetração no molusco hospedeiro, o que não foi observado para os miracídios de *E. caproni* por Ataev et al. (2001). A capacidade de clivagem das células germinativas apresentada pelos miracídios de *E. paraensei* repercute no encurtamento significativo do período de seu desenvolvimento no interior do hospedeiro intermediário quando comparado com *E. caproni*.

3. Desenvolvimento e multiplicação dos parasitos no interior dos moluscos. Pinheiro (2003) revelou a partir de observações de seções ultrafinas que a superfície do tegumento dos esporocistos de *E. paraensei* é realmente provida de inúmeras dobras. Tal observação pode estar amparada no fato de que a ausência de uma abertura oral leva o esporocisto a adquirir os nutrientes necessários para seus intensos processos metabólicos de divisão e diferenciação celulares pela absorção destes através do tegumento, sendo estas dobras importantes para aumentarem a superfície de absorção dos nutrientes. Adicionalmente, observou a presença de esporocistos de *E. paraensei* na cavidade pericárdica de *Lymnaea columella* (Say, 1817) um dia pós-infecção. O mesmo autor ainda verificou a presença de rédias na cavidade cardíaca de *L. columella* após cinco dias de exposição ao *E. paraensei*. Aos 15 dias após a exposição, as rédias já podiam ser observadas nos tecidos mais superficiais da glândula digestiva do molusco, o que fornece uma informação inicial acerca da rota de migração de *E. paraensei* dentro de seu primeiro hospedeiro intermediário;

4. Emergência de cercárias dos moluscos e busca pelo segundo hospedeiro intermediário;

5. Penetração ativa e encistamento das cercárias no segundo hospedeiro intermediário. A presença de metacercárias tem sido observada na região do rim de *L. columella* após exposição experimental as cercárias de *E. paraensei* (PINHEIRO, 2003);

6. E, finalmente, ingestão do segundo hospedeiro intermediário contendo as metacercárias (estágios infectantes) pelo hospedeiro definitivo e desenvolvimento dos parasitos adultos.

Algumas diferenças em relação a este padrão geral de ciclo biológico podem ser observadas em determinadas espécies e gêneros relacionados. Por exemplo, os miracídios no interior de ovos de *E. caproni* podem eclodir no intestino dos moluscos (IDRIS; FRIED, 1996). Adicionalmente, moluscos límnicos podem se tornar infectados pela ingestão de ovos embrionados de *E. revolutum* (DAVIS, 2005). As cercárias de *Himasthla quissetensis* (Miller

e Northup, 1926) infectam diretamente aves domésticas através da cloaca, com o desenvolvimento do helminto ocorrendo no íleo destes animais (HERMAN; BACHA, 1978). Por sua vez, cercárias de *Echinochasmus* spp. infectam humanos e outros mamíferos quando são ingeridas juntamente com água contaminada (XIAO et al., 1995).

Contrário ao observado para a maioria dos trematódeos digenéticos, estudos observacionais e experimentais demonstraram que a especificidade de *Echinostoma* spp. em relação ao primeiro e segundo hospedeiros intermediários é baixa, em geral, visto que diferentes gêneros e espécies de moluscos foram registrados albergando a mesma espécie de equinóstoma. Por exemplo, Maldonado et al. (2001) relataram que *E. paraensei* apresenta como primeiro e segundo hospedeiros intermediários moluscos das espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *Physa marmorata* Guilding, 1828 e *L. columella*. Já *E. caproni* apresenta como primeiro hospedeiro intermediário *Biomphalaria* spp. tendo moluscos dos gêneros *Biomphalaria* spp., *Bulinus* spp. e anfíbios como segundos hospedeiros intermediários (FRIED; HUFFMAN, 1996). Em decorrência da importância zoonótica dos equinostomatídeos discutida a seguir, faz-se necessário determinar o hospedeiro intermediário natural para verificar o risco da ingestão de moluscos, peixes, e/ou anfíbios, já que tais organismos foram naturalmente encontrados com estágios de metacercárias. Experimentos a campo realizados por Park et al. (2006) denotaram a capacidade do bivalve *Pisidium* Pfeiffer, 1821, em desenvolver os estágios de cercária e metacercária de *Echinostoma cinetorchis* (Ando e Ozaki, 1923). Estes moluscos segundo Park et al. (2006) representam uma importante fonte alimentar para humanos no continente Asiático, assumindo por conta disto importância em saúde pública.

### 2.2.3 Importância dos equinostomatídeos em saúde pública

Parasitas da família Echinostomatidae (=equinóstomas) constituem cerca de 50 gêneros, com aproximadamente 355 espécies, e seis subespécies. Dentre eles, até 1964, um total de 13 espécies apresentavam a capacidade de realizar infecções em humanos (YAMASHITA, 1964). Todavia, trabalhos mais recentes destacam que o número de equinóstomas infectando humanos tem aumentado para um total de 20-21 espécies (CHAI, 2007).

Segundo Sianto et al. (2005) a presença de ovos de *Echinostoma* sp. encontrados em material intestinal de um corpo parcialmente mumificado (600 a 1200 anos antes de Cristo) no Brasil, indica a possibilidade da ocorrência desta zoonose em pessoas da América do Sul durante o período pré-Colombiano.

Em países considerados endêmicos, o hábito cultural de se alimentar a partir de peixes, crustáceos, anfíbios e moluscos aquáticos de águas doces crus ou mal cozidos contendo as metacercárias associadas às baixas condições sócio-econômicas, aumenta o risco de ocorrência da equinostomose humana, bem como de outras doenças de origem alimentar (GRACZYK; FRIED, 1998). Xiao et al. (2005) registraram que a infecção em humanos poderia ocorrer mediante ingestão de água contaminada com cercárias de equinóstomas, estas então, tornariam-se encistadas mediante exposição ao suco gástrico. Deste modo, o homem pode atuar como importante reservatório destes parasitos, promovendo à contaminação ambiental de novos habitats. Assim, à falta de saneamento básico, bem como, o desinteresse das autoridades de saúde, aumenta a probabilidade de incidência de moluscos infectados e da disseminação da doença em humanos.

Vários casos de equinostomose humana têm sido registrados no sudeste asiático, principalmente na Índia, Filipinas, Coreia e Japão (CHAI; LEE, 1990; CARNEY, 1991; CHAI et al., 2005) apresentando como sintomatologia clínica intensa dor abdominal, diarreia líquida e anorexia (GRACZYK; FRIED, 1998). Tal patologia é causada por várias espécies de equinostomatídeos, todavia, *Echinostoma malayanum* Leiper, 1911, *Echinostoma hortense* Asada, 1926 e *E. revolutum* merecem destaque em decorrência de amplas distribuições

geográficas (RIM, 1982; CHAI; LEE, 2002; CARNEY, 1991). No Brasil, em função do aparecimento de casos já diagnosticados em humanos, esta helmintose vem ganhando destaque (HASEEB; EVELAND, 2000).

A introdução de populações de peixes e moluscos infectados em países não-endêmicos motivada pelo comércio internacional, o tráfico de animais silvestres exóticos e o turismo internacional podem ser considerados os principais fatores responsáveis pela disseminação mundial desta antropozoonose (DIXON; FLOHR, 1997).

#### **2.2.4 Importância de *Echinostoma* spp. em animais silvestres e domésticos.**

A infecção por *Echinostoma* spp. tem sido registrada em muitos animais silvestres. Por exemplo, Maldonado et al. (2006) identificaram a presença de *E. paraensei* em *Nectomys squamipes* Brants, 1827 após necropsia. Presença de *E. trivolvis* tem sido verificada no intestino delgado de gaviões e corujas durante estudos observacionais realizados por Taft et al. (1993). Adicionalmente, Huffman (2000) relatou que os equinostomatídeos representam um significativo impacto na saúde de mamíferos aquáticos. Segundo alguns autores, a disseminação da infecção destes parasitos no ambiente silvestre e não silvestre pode ser em consequência de apresentarem baixa especificidade ao hospedeiro vertebrado definitivo, bem como as alterações ambientais ecológicas e climáticas induzidas pelo homem, em especial o desmatamento, que acabam exercendo intensa pressão sobre os animais silvestres, forçando suas migrações para novos habitats (KING et al., 2007).

Paralelamente, *Echinostoma* spp. pode ser visto parasitando animais domésticos e peridomésticos como cães residentes em áreas metropolitanas, suínos, galinhas e patos (LUTZ, 1924). Tal cenário epidemiológico é provavelmente um resultado do aumento da interface entre animais silvestres e domésticos associado a fatores antropogênicos (agentes de transformação da dinâmica global).

Além dos registros naturais, vários estudos experimentais têm analisado o estabelecimento de *Echinostoma* spp. em algumas aves, como as galinhas domésticas (FRIED et al., 1988; KIM; FRIED, 1989; HUMPHRIES et al., 1997). Fried (1984) registrou 100% de infectividade de *E. trivolvis*, com uma recuperação de 25% dos helmintos adultos em aves domésticas experimentalmente infectadas. O mesmo ensaio foi utilizado para verificar as taxas de infectividade de *E. revolutum* e de recuperação dos parasitos em galinhas. Como resultado, os autores estabeleceram infectividade de 64 a 67%, com aproximadamente 32% de recuperação dos helmintos, caracterizando valores inferiores dos observados para *E. trivolvis* (MULLICAN et al., 2001).

Revisões propostas por Huffman e Fried (1990) e Fried e Huffman (1996) ainda registram acentuadas alterações anatomopatológicas no íleo, reto, cloaca, ceco e bolsa de Fabricius de aves domésticas naturalmente e experimentalmente infectadas por *E. trivolvis*, coincidindo com as regiões onde os helmintos foram recuperados.

#### **2.2.5 Equinóstomas como modelos experimentais**

A patogenicidade de equinóstomas ainda é pouco conhecida, altamente complexa e diversificada (CHAI, 2007). A irritação mecânica e os efeitos tóxicos dos seus metabólitos são os principais fatores relacionados ao parasito responsáveis por esta patogênese. Estudos a respeito da infecção experimental de equinóstomas em “hamsters” e camundongos vêm sendo realizados por alguns autores, possibilitando desta forma, uma melhor compreensão da fisiopatologia induzida por estes parasitos e, por conseguinte, auxiliar o desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais eficientes. Intensa reação inflamatória intestinal associada com uma infiltração linfocítica e eosinofílica foi observada em “hamster” infectados por *E. caproni* e *E. trivolvis* (FUJINO; FRIED, 1993; TOLEDO et al., 2006). Processos erosivos e degenerativos da mucosa intestinal são verificados, acompanhados pela proliferação de tecido



conjuntivo e atrofia das vilosidades intestinais, caracterizando assim, a síndrome da má absorção. A anemia é outra alteração frequentemente manifestada por estes animais, uma vez que muitos equinóstomas são hematófagos, ingerindo linfa e sangue de seus hospedeiros (KANEV, 2000).

Garcia et al. (2011) verificaram a influência da infecção de *E. paraensei* em *Rattus norvegicus* sob condições experimentais. Neste estudo, os níveis plasmáticos da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase (GGT), bilirrubina e globulinas aumentaram significativamente em relação ao grupo controle (não-infectado) somente após as duas primeiras semanas de infecção. Cortes histológicos dos fígados de *R. norvegicus* infectados demonstraram a presença de hepatócitos altamente vacuolizados com infiltração de polimorfonucleares; espaço portal com estase e células infamatórias no lúmen vascular; hepatócitos com núcleos picnóticos, cariorrexis e cariólises e capilares sinusóides levemente expandidos com infiltração de polimorfonucleares. Em função das análises bioquímicas descritas acima e da histopatologia hepática, os mesmos autores concluíram que, a infecção de *E. paraensei* em *R. norvegicus* causou alterações na função hepática, muito possivelmente em decorrência de um mecanismo colestatóico produzido a partir da obstrução parcial do ducto biliar pela presença dos helmintos.

Além de aspectos bioquímicos e anatomopatológicos estudados mediante infecção experimental de equinostomatídeos no hospedeiro definitivo, o imunológico merece grande destaque principalmente pelo fato de várias manifestações de resistência a infecção de *Echinostoma* spp. terem sido descritas (TOLEDO, 2009). O aumento da carga parasitária estabelecida no hospedeiro definitivo é sem dúvida dependente da quebra imunológica do mesmo. O aumento no número de parasitos recuperados em função de imunossupressão tem frequentemente sido descrito para *E. caproni* e *E. trivolvis* em camundongos tratados com dexametasona (FRIED et al., 1997). Similarmente, Ryang et al. (2007) registraram que o tratamento com quetotifeno em camundongos aumentou significativamente o percentual de *E. hortense* recuperados quando comparado aos animais não-tratados. A eliminação de equinóstomas pelo hospedeiro definitivo é outra manifestação imunológica bastante estudada (TOLEDO; FRIED, 2005). Segundo Weinstein e Fried (1991), a eliminação de *E. trivolvis* em camundongos ocorria na segunda e terceira semanas pós-infecção, enquanto em “hamsters” tais helmintos sobreviveram por um período acima de 123 dias pós-infecção (MABUS et al., 1988). Este fenômeno pode ser explicado a partir de três constatações: (1) a sobrevivência de equinóstomas no hospedeiro definitivo é prolongada pela imunossupressão; (2) a expulsão dos equinostomatídeos pode ter sido em consequência de infecções concomitantes por outros helmintos intestinais; bem como (3) as diferenças respostas imunológicas edificadas entre as várias espécies e cepas de hospedeiros definitivos (MUÑOZ-ANTOLI et al., 2007), podem ajudar a compreender esta mudança do padrão de eliminação dos equinostomatídeos. Paralelamente, evidências relacionadas com a capacidade modulatória do sistema imune do hospedeiro definitivo sobre a inibição da fecundidade dos equinóstomas têm sido registrada (MUÑOZ-ANTOLI et al., 2004). Lee et al. (2004) infectaram cinco cepas de camundongos (ICR, C3H/HeN, BALB/c, C57BL6 e FvB) com *E. hortense*. Embora as cinco cepas tenham sido infectadas, a presença de ovos nas fezes foram detectados somente nos camundongos pertencentes às cepas ICR e C3H/HeN. Este fato sugere que a quebra imunológica do hospedeiro pode ser considerada um importante fator que favoreça a fecundidade dos equinostomatídeos. Fujino et al. (1996) observaram que a área corporal de *E. trivolvis* adultos em camundongos tratados com dexametasona aumentaram mais que 2,5 vezes em relação aos parasitos recuperados de camundongos não-tratados.

## 2.3 Relação entre moluscos e trematódeos

### 2.3.1 Biologia reprodutiva de moluscos infectados por larvas de trematódeos digenéticos

Segundo Noble e Noble (1971), a castração parasitária pode ser entendida pela destruição ou alteração do tecido gonadal do hospedeiro pelo parasito culminando com a interrupção total ou parcial da atividade ovipositora, modificação na expressão de características sexuais secundárias do hospedeiro, bem como, pelas alterações fisiológicas e comportamentais no mesmo. Baudoin (1975) ainda ressalta que a castração pode ser caracterizada por uma causa imediata, através da interferência mecânica com as gônadas, seja em função de uma atrofia tecidual, explicada por um desvio de nutrientes que seriam utilizados para o desenvolvimento e manutenção das gônadas, ou em decorrência de um processo degenerativo tecidual induzido pela presença física do parasito nas gônadas. Este fenômeno é observado em uma ampla variedade de interações parasito-hospedeiro, como por exemplo, insetos e crustáceos infectados por certas espécies de nematóides (WULKER, 1964; CHARNIAUX-COTTON, 1960) e em moluscos quando parasitados por larvas de trematódeos (MUÑOZ-ANTOLI et al., 2007).

McClelland e Bourns (1969) consideram que a castração parasitária é uma resposta adaptativa do hospedeiro frente à infecção. Quando infectados, moluscos apresentam um balanço energético negativo mobilizando suas reservas polissacarídicas principalmente da glândula digestiva e massa cefalopiedosa para a sua sobrevivência (PINHEIRO et al., 2009). Considerando que, a atividade reprodutiva é um mecanismo desencadeado por reações anabólicas (HINKLE; MC CARTHY, 1978) sua interrupção total ou parcial poupará o hospedeiro de um gasto energético duplo de produzir ovos e fornecer nutrientes para o desenvolvimento do parasito aumentando as perspectivas de sobrevivência de ambos.

Outros autores, por sua vez, sugerem que este fenômeno seja explicado a partir de uma modulação hormonal do hospedeiro induzida pela infecção (RAATIKAINEN, 1966). Por exemplo, de Jong-Brink et al. (1988) observaram que na hemolinfa de *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) infectadas com larvas de *Trichobilharzia ocellata* (La Valette, 1855), havia alguma substância capaz de antagonizar a ação de hormônios femininos envolvidos na reprodução, dentre eles a calfluxina e a qual denominaram schistosomina. A calfluxina é um hormônio feminino responsável pelo influxo de cálcio na matriz mitocondrial das células secretoras da glândula de albúmen descrita previamente em *L. stagnalis* por Dictus et al. (1987). Assim, a inibição/diminuição do influxo de íons cálcio para a matriz mitocondrial das células gonadais compromete todo o processo de fosforilação oxidativa e, por conseguinte, repercute numa menor produção de energia (ATP), que é essencial à galactogênese (HINKLE; Mc CARTHY, 1978). Como consequência deste mecanismo, a quantidade de galactogênio no interior dos ovos torna-se reduzida comprometendo sua viabilidade.

Alterações no perfil reprodutivo de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) infectadas por *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907 também foram demonstradas por Paschoal (1991). A autora após estudo histológico observou um estado degenerativo no ovotestis, redução da espermatogênese, bem como nas posturas de ovos nos organismos infectados, ratificando a hipótese sugerida por Baudoin (1975) durante seu trabalho de revisão. Similarmente, Pinheiro (1993) estudando a mesma interação verificou uma diminuição acentuada de 96,32% no número de ovos postos por moluscos infectados quando comparado aos não infectados. Muñoz-Antoli et al. (2007) estudando os efeitos da infecção miracidial de *Echinostoma friedi* (Toledo, Muñoz-Antoli e Esteban, 2000) na fecundidade de *Radix peregra* (O. F. Müller, 1774) e *B. glabrata* observaram que, o parasito produziu castração total em ambas as espécies de moluscos.

Paradoxalmente, estudos têm demonstrado que em resposta a infecção por *S. mansoni*, moluscos do gênero *Biomphalaria* podem acelerar o processo de maturação sexual (PAN, 1965). Como consequência, moluscos jovens infectados iniciariam imediatamente sua

atividade reprodutiva, aumentando significativamente o número de ovos em relação aos animais não parasitados. Minchella (1985) denominou este fenômeno de compensação reprodutiva entendida como um mecanismo estratégico de manutenção da espécie parasitada. O mesmo autor acredita que esta possibilidade esteja associada a fatores genéticos ligados ao hospedeiro, possibilitando-o reproduzir antes do processo de castração parasitária, provocada pela infecção ao *S. mansoni*. Gutierrez et al. (2002) observaram que em *L. columella* infectada por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) ao invés de ser observada uma redução na fecundidade do hospedeiro, os moluscos jovens infectados apresentaram um aumento na postura de ovos.

Jarne e Delay (1991) fazem questionamentos relacionados às condições que podem favorecer a seleção do mecanismo de autofecundação e especulam que essa pode ser selecionada em decorrência da baixa densidade populacional, devido à adaptação às condições ambientais locais ou ao parasito. O início da recolonização por autofecundação explicaria o fato de populações, mesmo que próximas, diferirem tanto uma da outra, a ponto de serem consideradas como espécies distintas, apesar de apresentarem estreita semelhança intrapopulacional (PARAENSE, 1955). Segundo Jarne e Delay (1991) os parasitos podem, indiretamente, alterar a estrutura das populações em algumas espécies de moluscos prosobrânquios pela influência na reprodução desses animais. Especulam que este fato pode estender-se aos Basommatophora e sugerem que por reduzir a atividade reprodutiva dos moluscos, esses tenderiam a utilizar a autofecundação, já que esta é registrada como tendo um “baixo custo” em comparação à fecundação cruzada. Entretanto, esses autores mencionaram que, até então, não há evidência comprovada dessa pressão nos Basommatophora. No entanto, Cooper et al. (1994) demonstraram a drástica redução na capacidade de produção de ovos de *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni* e Rupp (1996) demonstra diferenças no comportamento sexual de *B. glabrata* infectada e não infectada. O primeiro grupo, durante o acasalamento, tende a fazer quase sempre o papel de macho, indicando uma compensação à fecundidade reduzida causada pela infecção.

O aumento temporário na taxa de crescimento de moluscos infectados por larvas de trematódeos é outra manifestação frequentemente observada (PAN, 1965; STURROCK, 1966; LOKER, 1979). A energia na qual seria utilizada para a reprodução torna-se disponível e parte dela passa ser direcionada para o crescimento do hospedeiro, possibilitando uma maior acomodação dos estágios larvais intramolusco (SLUITERS, 1981). Todavia, autores têm evidenciado que quando parasitados, moluscos apresentam uma significativa redução em seu crescimento, caracterizando, portanto, efeito extremamente variável durante estas relações (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1964; WEBBE; JAMES, 1972).

Deste modo, a variação do padrão reprodutivo de moluscos infectados por estágios larvais de trematódeos é bastante ampla, demonstrando que esta relação é influenciada por variações específicas e individuais pertencentes tanto ao hospedeiro, quanto ao parasito, como a presença ou não de estágios de rédias no ciclo larval intramolusco, se as larvas apresentam estágios que se albergam na região do ovoteste ou glândula de albúmen, a ocorrência de diferentes linhagens de uma mesma espécie de parasito ou hospedeiro, idade dos moluscos infectados, estado bioenergético do hospedeiro, por exemplo.

### **2.3.2 Aspectos do metabolismo de cálcio em moluscos infectados por larvas de trematódeos digenéticos**

O cálcio é um metal considerado essencial na biologia de moluscos e um dos principais componentes inorgânicos que compõe as conchas desses animais. Tal íon é descrito como importante fator limitador na distribuição e adaptação de moluscos adultos, em sua capacidade ovipositora e no desenvolvimento de ovos e embriões (THOMAS et al., 1974; DAWIES; ERASMUS, 1984). O neuroeptídeo, denominado calfluxina (CaFl) está envolvido

na regulação do influxo de cálcio para a mitocôndria das células secretoras da glândula de albúmen nestes organismos (DICTUS et al., 1987). Deste modo, qualquer condição fisiológica que altere a atividade da CaFI, como a infecção por larvas de trematódeos, leva à redução de cálcio na matriz mitocondrial, que repercute na queda da taxa ovipositória nestes organismos. De Witt e Sminia (1980) relataram que o cálcio ainda está envolvido no processo metabólico do equilíbrio ácido-base na hemolinfa destes organismos sendo este mobilizado da concha na forma de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) para a formação do tampão bicarbonato, além de atuar como importante co-fator enzimático para inúmeras reações bioquímicas, especialmente aquelas relacionadas com a fosforilação oxidativa.

Pinheiro e Amato (1995) verificaram que em *L. columella* infectadas experimentalmente com larvas de *F. hepatica* um aumento significativo na concentração de cálcio nas conchas (hipercalcificação) dos organismos hospedeiros. Esta hipótese (hipercalcificação) vem sendo frequentemente observada nas inúmeras associações entre moluscos e larvas de trematódeos (CHENG, 1971; SLUITERS et al., 1980).

Em contrapartida, Paschoal e Amato (1996) avaliando as alterações nos depósitos de cálcio em *B. similis* infectadas por *E. coelomaticum* observaram uma menor concentração de cálcio nas conchas dos moluscos e uma maior deposição de cálcio na glândula digestiva dos hospedeiros infectados. O mesmo foi relatado por Brandolini et al. (1997) durante a interface *Subulina octona* (Bruguière, 1792)/*Tanaisia bragai* (Santos, 1934). A mobilização de íons cálcio da concha para a hemolinfa caracteriza a presença de uma via homeostática estabelecida entre estes meios sendo a mesma estimulada mediante déficit de cálcio na hemolinfa circulante causada pelo parasitismo. Por sua vez, White et al. (2005) ao estudarem as relações entre *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) infectados naturalmente por larvas de *E. trivolvis*, *Physa* sp. naturalmente infectadas com vários tipos de larvas de trematódeos e *B. glabrata* infectadas com *E. caproni* ou *S. mansoni* registraram nenhuma diferença significativa nas concentrações de  $\text{CaCO}_3$  nas conchas de moluscos infectados quando comparados aos não-infectados. Assim, mudanças observadas no metabolismo de moluscos frente à infecção são amplamente variadas, não apresentando um padrão definido, já que cada parasito é capaz de induzir alterações específicas em seu hospedeiro (ZIBKOWSKA, 2003).

Em adição, trabalhos ressaltam a importância do íon cálcio na resposta imunológica do molusco hospedeiro, uma vez que a atividade fagocitária de hemócitos e demais células de defesa são dependentes da presença deste elemento na hemolinfa (ZELCK et al. 1995). Segundo Couto (2001), a atividade das lectinas plasmáticas de *Perna perna* Linnaeus, 1758 é cálcio dependente, sendo portanto, importantíssimo no processo de reconhecimento de substratos antigênicos e na resposta imune destes animais, capazes de aumentar a fagocitose pelos hemócitos, funcionando como opsoninas (OLAFSEN et al., 1992).

Ong et al. (2004) demonstraram que, a infecção por *S. mansoni* altera significativamente a concentração de cálcio na glândula digestiva de *B. glabrata*, com moluscos infectados apresentando duas vezes mais o conteúdo de cálcio quando comparado a moluscos não infectados. A calcificação da glândula digestiva de *B. glabrata* infectadas, segundo os autores, ocorreu em consequência de um processo inflamatório desencadeado a partir da presença e migração dos estágios larvais do parasito neste tecido.

Em estudo, Davies (1983) relatou que, as células da glândula pré-acetabular das cercárias de *S. mansoni*, ainda no interior do esporocisto, contém abundantes reservas de cálcio. Desta maneira, o cálcio é absorvido através da hemolinfa do molusco pelo parasito, o que caracteriza sua relevância para o desenvolvimento dos estágios larvais do helminto, causando alterações no metabolismo de cálcio do hospedeiro.

Assim, o melhor entendimento sobre o metabolismo de cálcio em moluscos infectados torna-se relevante, devido suas inúmeras funções biológicas consideradas vitais tanto para a sobrevivência do molusco, quanto para o desenvolvimento do parasito, possibilitando com

isto, o desenvolvimento de estudos voltados para o controle dos organismos hospedeiros e, por conseguinte, dos agentes patogênicos por eles transmitidos.

### **2.3.3 Aspectos do metabolismo de proteínas e da atividade das aminotransferases em moluscos infectados por larvas de trematódeos digenéticos**

O estabelecimento da infecção por trematódeos digenéticos em moluscos promove severas alterações no organismo hospedeiro, principalmente em decorrência da competição por nutrientes entre o parasito e o hospedeiro. Na tentativa de manter o metabolismo essencial a sua sobrevivência e, por conseguinte, a do parasito, o molusco passa a mobilizar de suas reservas polissacarídicas e de substratos não glicídicos como alternativa de manutenção glicêmica. Desta maneira, a ativação do catabolismo protéico é observada, repercutindo em um significativo decréscimo deste substrato na glândula digestiva e hemolinfa dos organismos infectados (PINHEIRO et al., 2009). Em adição, autores ainda consideram a possibilidade de estágios larvais de trematódeos e nematóides em absorverem diretamente aminoácidos da hemolinfa do hospedeiro (GRESS; CHENG, 1973; TUNHOLI-ALVES et al., 2011b).

Além de alterações quantitativas, mudanças qualitativas no perfil de proteínas de *B. glabrata* e *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831) infectadas por *S. mansoni* são verificadas, evidenciando com isso, a influência direta deste processo na taxa de resposta mitocondrial e, conseqüentemente, no transporte de elétrons na cadeia respiratória (MOHAMED; ISHAK, 1982).

Diferentemente dos estágios larvais de nematóides, as larvas dos trematódeos apresentam um intenso processo de multiplicação assexuada ao longo do seu desenvolvimento intramolusco necessitando, portanto, de uma grande demanda de energia obtida principalmente a partir de carboidratos, bem como, de outros substratos alternativos, como os aminoácidos do hospedeiro. Além disto, este processo requer grandes quantidades de proteínas (“blocos de construção”) devido à intensa síntese de membrana celular que ocorre sendo estas essenciais para a formação das estruturas larvais em desenvolvimento. Assim, a severa redução dos conteúdos de proteínas totais no molusco infectado pode ser mais bem compreendida (PINHEIRO, 2003).

Backry (2009) indicou significativo declínio nos níveis hemolinfáticos de albumina em *B. alexandrina* infectadas por *S. mansoni* muito provavelmente como reflexo do prejuízo histológico observado na glândula digestiva dos hospedeiros, uma vez que, representa o principal sítio de síntese deste substrato, como previamente reportado por Rawi et al. (1995).

Em contrapartida, Pokora et al. (1993), em investigações sobre as concentrações hemolinfáticas de proteínas totais em *L. stagnalis* infectadas por larvas de trematódeos digenéticos, relataram um aumento significativo dos seus níveis quando comparado ao grupo controle. Segundo os autores, este aumento pode ser entendido como uma consequência de injúria celular, especialmente aos tecidos da glândula digestiva do molusco desencadeado pela ação mecânica das larvas do parasito, que possibilita o extravasamento de proteínas celulares para a hemolinfa.

Poucos estudos têm sido feitos sobre os conteúdos de aminoácidos de *B. glabrata* infectadas por estágios larvais de *Echinostoma* spp. Ponder et al. (2003) em estudo qualitativo a partir de análises cromatográficas reportaram a presença de sete tipos de aminoácidos livres denominados como, histidina, lisina, alanina, serina, valina, leucina e isoleucina no complexo glândula digestiva-gônada e hemolinfa de *B. glabrata* não-infectadas. Após exposição aos miracídeos de *E. caproni* somente a lisina não foi encontrada em todas as amostras dos hospedeiros, conferindo desta maneira, sua importância no desenvolvimento dos estágios de esporocistos, rédias e cercárias do parasito.

Aminotransferases, também denominadas de transaminases, como a (E.C.2.6.1.2) (ALT) e a (E.C.2.6.1.1) (AST) constituem um grupo de enzimas responsáveis pela

transferência de grupamentos amino de um aminoácido convertendo a um  $\alpha$ -ceto ácido (MOSS; HENDERSON, 1998). As aminotransferases desempenham papel importantíssimo na associação entre o metabolismo de aminoácidos e carboidratos, representando um grupo de enzimas essenciais para a gliconeogênese. Além disto, as transaminases têm sido frequentemente utilizadas como excelentes biomarcadoras de lesão celular.

As atividades das aminotransferases têm sido registradas por alguns autores tanto na hemolinfa quanto nos tecidos de moluscos infectados por larvas de trematódeos (MANOHAR et al., 1972; CHRISTIE; MICHELSON, 1975). Segundo alguns autores, a infecção por larvas de trematódeos caracteriza uma condição fisiológica similar ao jejum, uma vez que ambas as situações induzem alterações quantitativas e qualitativas nos níveis de carboidratos e proteínas de moluscos (BECKER; SCHMALE, 1975; PINHEIRO, 1996). Como resposta fisiológica a estes estresses, o aumento na atividade dessas enzimas é verificado, principalmente em função da elevação da demanda energética do hospedeiro em decorrência a infecção, resultando na mobilização de fontes energéticas potenciais incluindo aminoácidos na tentativa de suprir esta deficiência (PINHEIRO et al., 2001; MASOLA et al., 2008).

Paralelamente, Lira et al. (2000) demonstraram que o aumento da atividade da AST observado no décimo dia de jejum em *B. similis* ocorreu devido a lesões teciduais no molusco, em especial na glândula digestiva, diminuindo após este período em função da sua degradação pela presença de enzimas na hemolinfa do molusco. Douglas e Haskin (1976) observaram que, em *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) infectadas com *Minchinia nelsoni* Haskins, Stauber e Mackin, 1966 o aumento da AST na hemolinfa foi associado à destruição dos tecidos das guelras durante o curso de desenvolvimento do parasito.

Em contra partida, autores observaram um decréscimo significativo nas concentrações das aminotransferases (ALT e AST) no complexo gônada-glândula digestiva de *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni* que, segundo os autores, poderia ser ocasionado por um declínio nos níveis de proteínas solúveis das amostras (CHRISTIE; MICHELSON, 1975).

#### **2.3.4 Aspectos do metabolismo de produtos nitrogenados em moluscos infectados por larvas de trematódeos digenéticos**

A infecção por larvas de trematódeos promove severas alterações metabólicas no organismo do hospedeiro especialmente em função da intensa drenagem de nutrientes existentes na hemolinfa do molusco pelo parasito. Como consequência, um estado de estresse fisiológico é estabelecido, sendo este caracterizado pela mobilização de reservas polissacarídicas em tecidos específicos, ativação do catabolismo protéico e lipídico para a manutenção das funções vitais do hospedeiro, assim como, para o suprimento dos estágios larvais do parasito em desenvolvimento (PINHEIRO; AMATO, 1994; BECKER, 1980).

A ureia é um produto de degradação contendo nitrogênio formado a partir do catabolismo de proteínas. Estudos têm demonstrado um aumento da excreção e concentração hemolinfática de ureia em moluscos infectados por trematódeos digenéticos, muito provavelmente em consequência a detoxificação da amônia através do acionamento do ciclo da uréia (CHENG; LEE, 1971; SCHMALE; BECKER, 1977). Kurelec (1975) também observou que durante o período de reprodução assexuada de *F. hepatica*, as larvas requereram grande quantidade de arginina. Segundo o autor, o parasitismo induziu significativo aumento da produção e excreção de ureia por estimular a atividade catalítica das enzimas do ciclo da ornitina no hospedeiro. Este fenômeno ajudaria na detoxificação de produtos tóxicos no molusco, como a amônia e forneceria arginina, substrato essencial para o desenvolvimento dos estágios larvais do parasito.

Moluscos aquáticos apresentam um padrão uricotélico de excreção. Para alguns autores, o ácido úrico tem a vantagem de poder ser excretado com pequena perda de água, porém quando a carga de produtos nitrogenados aumenta demasiadamente, o ácido úrico se acumula,

cristalizando-se e causando danos a estrutura dos tecidos do animal. Já a ureia é menos tóxica ao molusco, porém a sua excreção leva a perdas de água que podem ser significativas. Além disto, assumindo que a produção de uréia leva um menor consumo de NADPH quando comparado à formação de ácido úrico, é mais vantajoso para o molusco hospedeiro em termos energéticos excretar mais ureia do que ácido úrico. Assim, quando se verifica inversão do padrão uricotélico para ureotélico em moluscos infectados por estágios de trematódeos, como o observado por Pinheiro et al. (2009), uma excelente capacidade adaptativa do hospedeiro é caracterizada (PINHEIRO, 2003; MELLO-SILVA et al., 2010).

Becker (1983) verificou em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* alterações no metabolismo de purinas, caracterizadas principalmente pelo aumento do conteúdo de ácido úrico nos seus tecidos quando comparado aos moluscos não infectados até os 40 dias de infecção, diminuindo daí em diante. Os dados mostram que durante a infecção por estágios larvais de trematódeos a proteólise é aumentada culminando com a produção de amônia que necessita ser detoxificada via purinas, como o ácido úrico, levando ao hospedeiro demandar um maior gasto de energia. Tanto as sínteses de purinas como a de uréia dependem de ácido aspártico e Stanislawsky et al. (1979) utilizando o mesmo modelo anteriormente descrito, relataram uma redução na concentração deste aminoácido na hemolinfa dos organismos infectados, o que reforça a idéia de que a elevada carga de produtos nitrogenados acaba por saturar o mecanismo de detoxificação via ureia e leva ao molusco a excretar ácido úrico. O mesmo foi observado por Thompson et al. (1991), que descreveram níveis mais baixos de ureia em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*.

### **2.3.5 Aspectos do metabolismo lipídico em moluscos infectados por estágios larvais de trematódeos digenéticos**

Em moluscos tem sido identificado que lipídeos estão envolvidos na sobrevivência dos animais quando estes são submetidos a condições de estresse fisiológico, como o parasitismo. Nesta circunstância, as reservas de carboidratos são rapidamente deletadas e lipídeos são consumidos mais frequentemente como substrato alternativo para a produção de energia (STOREY, 2002; GIOKAS et al., 2005). Lipídeos também são componentes estruturais de membranas biológicas e alterações no número e composição destas moléculas podem acontecer quando alterações no estado metabólico dos moluscos ocorrem em resposta ao fator estressante (STUART et al., 1998). O mesmo estudo ainda destacou que as variações nos conteúdos de colesterol e colesterol esterificado de *Cepaea nemoralis* (Linnaeus, 1758) promovidas em função do hipometabolismo culminaria com alterações estruturais em suas membranas mitocondriais, aumentando conseqüentemente a permeabilidade da estrutura membranar, além de promover o aumento na taxa do processo metabólico envolvendo proteínas de membrana, principalmente aquelas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons como previamente registrado por Narayanan e Venkateswarara (1980).

Alguns autores tem se dedicado na caracterização do perfil lipídico em moluscos infectados por trematódeos digenéticos. Por exemplo, Bakry (2009) avaliando a influência da infecção de *S. mansoni* sobre alguns parâmetros biológicos de *B. glabrata* registrou um aumento significativo de cerca de 60% nos conteúdos de lipídeos totais na hemolinfa dos moluscos infectados em relação ao grupo controle. Para o autor, o aumento hemolinfático dos níveis de lipídeos nos organismos parasitados é devido à interrupção de seu metabolismo bem como, na aceleração de sua síntese estimulada pela infecção.

Paralelamente, Venkata (1980) através de análises em cromatografia de camada delgada (TLC) demonstrou marcantes alterações nos níveis de lipídeos neutros e fosfolipídios no complexo gônada-glândula digestiva (GGD) de *Lymnaea luteola* Lamarck, 1822 naturalmente infectada por cercárias diplocotylea. Todas as frações de lipídeos neutros analisadas

(triacilglicerol e ácidos graxos) foram elevadas no grupo infectado. Este aumento, segundo Venkata, pode ser explicado em função da secreção de lipídeos pelo tegumento das larvas do parasito ou pela alteração no metabolismo do (GGD) do hospedeiro em consequência da infecção. O mesmo estudo ainda constatou um decréscimo significativo nos conteúdos de fosfolipídios nas amostras dos organismos infectados. A presença dos estágios larvais do parasito em desenvolvimento leva a severas alterações histológicas no hospedeiro, principalmente da glândula digestiva, culminando com o extravasamento de moléculas, como fosfolipídios, em função do processo de remodelagem celular.

A utilização de reservas lipídicas pelo parasito em seu hospedeiro intermediário tem sido registrada. Humiczewska e Rajski (2005) verificaram a capacidade dos estágios de esporocistos, rédias e cercárias de *F. hepatica* em absorverem e acumularem lipídeos diretamente do molusco, *Lymnaea truncatula* Muller, 1774, durante o seu desenvolvimento. Neste estudo foi possível sugerir a possível utilização de lipídeos como fonte energética pelo parasito, já que, os maiores conteúdos foram verificados no tegumento e células germinativas, tecidos com atividade metabólica reconhecida. Em contrapartida, existem autores que defendem a idéia de que trematódeos utilizam e acumulam lipídeos apenas como componente estrutural, sendo importantíssimo nas primeiras semanas pós-infecção, período caracterizado pela intensa atividade mitótica das células germinativas dos mesmos durante sua fase de desenvolvimento intra-molusco (BARRET; SAGHIR, 1999; SWIDERSKI; MACKIEWICZ, 2004).

Thompson et al. (1991) avaliaram a influência de diferentes dietas em *B. glabrata* expostas à infecção experimental por *S. mansoni*. Como resultados, observaram um aumento dos níveis de lipídeos totais no GGD dos grupos infectados em relação ao grupo controle (não infectado), e ao compararem a influência da dieta durante a etapa de desenvolvimento do parasito, verificaram que moluscos submetidos à dieta com alto teor lipídico apresentaram período pré-patente significativamente menor em relação ao grupo alimentado com dieta normal, comprovando a significância que tais lipídeos exercem no desenvolvimento do parasito.

Aumento nos conteúdos hemolinfáticos de colesterol em moluscos submetidos a condições fisiológicas adversas foi verificada (LUSTRINO et al., 2010). Este acréscimo, segundo os autores, pode ser uma consequência direta de dois processos: i) aumento da biossíntese de colesterol; e/ou, ii) remodelagem de membrana celular com liberação das moléculas de colesterol.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar as possíveis alterações fisiológicas, morfológicas e na biologia reprodutiva de *B. glabrata* infectadas por duas doses miracidiais (5 e 50) de *E. paraensei* durante o período de quatro semanas.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Realizar infecções de *B. glabrata* com 5 e 50 miracídeos de *E. paraensei*.
- Analisar as possíveis alterações no metabolismo inorgânico de *B. glabrata* infectadas com 5 e 50 miracídeos de *E. paraensei*, através das determinações espectrofotométricas para os conteúdos de cálcio na hemolinfa e na concha.
- Avaliar a influência da infecção por duas doses miracidiais (5 e 50) de *E. paraensei* no metabolismo protéico, no padrão excretório, e nas atividades das aminotransferases em *B. glabrata*.
- Analisar as possíveis alterações de algumas frações de lipídeos neutros (ácidos graxos, colesterol, colesterol esterificado, triacilglicerol) no complexo gônada-glândula digestiva, bem como de colesterol e triacilglicerol hemolinfáticos em *B. glabrata* infectadas com 5 e 50 miracídeos de *E. paraensei*.
- Realizar estudos histopatológicos após 1, 2, 3 e 4 semanas pós-infecção com duas doses miracidiais (5 e 50), visando identificar as alterações morfológicas provocadas pelos estágios larvais do parasito em *B. glabrata*.
- Realizar análises estatísticas com os dados obtidos nos experimentos acima.

## 4 CAPÍTULO I

**ALTERAÇÕES NA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Biomphalaria glabrata*  
INFECTADA COM DIFERENTES DOSES MIRACIDIAIS DE *Echinostoma paraense***

ALTERAÇÕES NA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Biomphalaria glabrata* INFECTADA  
COM DIFERENTES DOSES MIRACIDIAIS DE *Echinostoma paraensei*

**RESUMO**

A taxa ovipositória, o número de massas ovíferas, o número de ovos/massas ovíferas, número de ovos eclodidos/molusco, bem como a viabilidade dos ovos de *Biomphalaria glabrata* expostas a diferentes doses miracidiais (5 e 50) de *Echinostoma paraensei* foram analisados como indicadores da atividade reprodutiva. Placas de isopor foram colocadas no interior dos aquários contendo os moluscos, em dias alternados, as placas foram retiradas dos aquários e os números de massas ovíferas e de ovos postos foram contabilizados por quatro semanas de infecção. Após a contagem, as placas eram numeradas individualmente e colocadas em novos aquários livres de moluscos e as massas ovíferas foram observadas diariamente para contagem de moluscos eclodidos. Em média, foi observado aumento dos parâmetros avaliados nos moluscos infectados em relação o grupo controle (não-infectado), com exceção da viabilidade dos ovos, que foi significativamente menor no grupo infectado com 50 miracidios. Estes dados indicam que quando infectado o molusco hospedeiro é capaz de aumentar sua atividade reprodutiva, sugerindo uma estratégia ecológica como tentativa de manutenção da espécie no meio ambiente.

**Palavras-chave:** *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*, taxa ovipositória, massas ovíferas, fisiologia comparada.

## ABSTRACT

The egg-laying rate, number of egg masses, number of eggs/mass, number of eggs hatched/snail and egg viability of *Biomphalaria glabrata* exposed to different doses (5 and 50) of *Echinostoma paraensei* miracidia were analyzed as indicators of reproductive activity. Polystyrene plates were placed in aquariums containing the snails and every other day for four weeks after infection the plates were removed to count the number of egg masses and eggs laid. After this, the plates were numbered individually and placed in new aquariums free of snails and the egg masses were observed daily to determine the hatching rate. On average there was an increase in the parameters evaluated in the infected snails in relation to the controls (uninfected snails), except for egg viability, which was significantly lower in the groups infected with 50 miracidia. These findings indicate that when infected, this host snail is able to increase its reproductive activity, suggesting an ecological strategy to maintain the species.

**Key words:** *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*, egg-laying rate, egg masses, comparative physiology.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento ontogenético de *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) apresenta estágios larvais que evoluem até a fase de cercárias em moluscos aquáticos de onde emergem para penetrarem no segundo hospedeiro intermediário e se desenvolverem até o estágio de metacercárias para garantir a infecção do hospedeiro vertebrado (MALDONADO et al., 2001). Esta fase é estritamente necessária para a multiplicação do trematódeo e torna o molusco prioritário para o aumento populacional do parasito no ambiente. Por isso, alternativas para o controle das doenças causadas por trematódeos digenéticos focam no combate aos moluscos hospedeiros (LUSTRINO et al. 2008; MELLO-SILVA et al. 2006, 2007). No entanto, o desenvolvimento larval pode causar alterações na atividade reprodutiva do molusco e interferir no desenvolvimento do ciclo do parasito (PINHEIRO; AMATO 1994, 1995; MUÑOZ-ANTOLI et al., 2007).

Alguns autores têm observado que as infecções com determinadas espécies de *Schistosoma* inibem totalmente a produção de ovos pelos moluscos hospedeiros (PAN 1965), porém algumas espécies de parasitos deste mesmo gênero são capazes de reduzir a produção de ovos, mas não de inibi-la completamente (STURROCK; STURROCK, 1970; WEBBE; JAMES, 1972; LOKER, 1979), o que demonstra ser este fenômeno influenciado por variações específicas e individuais.

Na relação parasito/hospedeiro entre *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) /*Lymnaea truncatula* (O. F. Müller, 1774), Hodasi (1972) descreveu os efeitos dos estágios larvais deste helminto sobre o seu hospedeiro molusco, observando uma interrupção da produção de ovos pelo molusco, cinco semanas após a infecção. Wilson e Denison (1980), estudando mesmo modelo, observaram uma acentuada redução do número de ovos postos por *L. truncatula* quando infectada, mas em momento algum houve uma completa inibição como citado por Hodasi. Entretanto, estes resultados divergentes podem ser devidos ao uso de diferentes doses de miracídios, pois Sluiters et al. (1980) e Sluiters (1981) demonstraram que, há uma correlação negativa entre o número de ovos postos e a dose de miracídios utilizada na infecção. Além disto, há ainda a influência de diversos fatores ambientais, como disponibilidade de alimento, fotoperíodo e densidade populacional (GOMOT, 1990; SANDLAND; MINCHELLA, 2003; OLIVEIRA et al., 2008; LUSTRINO et al., 2010).

Neste sentido, vários trabalhos tentam elucidar quais são as alterações que ocorrem na biologia reprodutiva dos moluscos infectados em diferentes modelos experimentais, entretanto, nenhum padrão foi estabelecido, uma vez que, cada trematódeo desenvolve mecanismos específicos.

*Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) é reconhecido por hospedar *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, e também pode participar do ciclo de vida de *E. paraensei*, considerado uma zoonose, capaz de infectar o homem e animais silvestres. Pinheiro et al. (2004a, b, 2005, 2009) descreveram características morfológicas dos estágios larvais deste parasito e as alterações fisiológicas no molusco hospedeiro, porém não há dados na literatura que abordem o perfil reprodutivo do molusco parasitado.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da infecção, com diferentes doses miracidiais (5 e 50) sobre a taxa ovipositória, o número de massas ovíferas, o número de ovos/massas ovíferas, número de ovos eclodidos/molusco bem como a viabilidade dos ovos de *B. glabrata*.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Coleta de ovos de *Echinostoma paraensei* e obtenção dos miracídeos

Foi realizada a infecção experimental de hamsters *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839), sendo posteriormente eutanasiados usando uma câmara de CO<sub>2</sub> (de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais, CEUA L-074/08) e necropsiados para a coleta das formas adultas de *E. paraensei* do intestino. Os vermes adultos foram dissecados para a coleta e recuperação dos ovos uterinos sendo em seguida incubados em água destilada, a 26°C durante 14 dias. Após isto, os ovos foram expostos à luz de uma lâmpada de 100W para estimular a eclosão dos miracídeos (PINHEIRO et al. 2004a, b, 2005).

### 4.2.2 Obtenção de *Biomphalaria glabrata* e infecção experimental

Os moluscos foram obtidos do Laboratório de Esquistossomose Experimental, Fundação Oswaldo Cruz, RJ.

Os moluscos (8 -12 mm) foram colocados numa placa de 24 furos onde os miracídeos foram colocados previamente com o auxílio de uma micropipeta, proporcionando uma infecção individual de cinco (5) ou cinquenta (50) miracídeos por molusco (SLUITERS et al., 1980; VASQUEZ; SULLIVAN, 2001). Após 24 horas os moluscos foram retirados da placa e transferidos para aquários.

### 4.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos

Em cada aquário foram previamente colocados 1500ml de água destilada onde era acrescentado cerca de 0.5g de CaCO<sub>3</sub>. Uma vez por semana quando água era renovada. Placas de isopor com ±2cm<sup>2</sup> foram colocadas no interior dos aquários, as quais serviram como substrato de oviposição para os moluscos.

Foram formados 12 grupos, quatro grupos controle (não infectados), 4 grupos de moluscos infectados com 5 miracídeos cada, e os 4 grupos restantes foram formados por moluscos infectados com 50 miracídeos cada. Cada grupo era composto por 10 moluscos. Todo experimento foi feito em duplicata, utilizando um “n” total de 240 moluscos.

A alimentação dos moluscos foi feita com folhas de alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum*. A manutenção do aquário foi realizada em dias alternados, quando as folhas de alface eram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos aquários. O número de moluscos mortos também foi um critério observado e contabilizado.

### 4.2.4 Análise da taxa ovipositória de *Biomphalaria glabrata* infectados com *Echinostoma paraensei*.

Em dias alternados, até o fim das quatro semanas de infecção, as placas de isopor foram retiradas dos aquários e os números de massas ovíferas e de ovos postos foram contados utilizando-se para o último, microscópio estereoscópico. Após a contagem as placas eram numeradas individualmente e colocadas em novos aquários livres de moluscos. Posteriormente, as massas ovíferas eram novamente observadas para contagem de moluscos eclodidos e o número de moluscos vivos anotado. A viabilidade dos ovos, expressa em percentagem, é o quociente entre o número de moluscos eclodidos sobre o número de ovos postos em cada grupo experimental.

### 4.2.5 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média e submetidos aos testes de ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer ( $\alpha=5\%$ ). (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism,

### 4.3 RESULTADOS

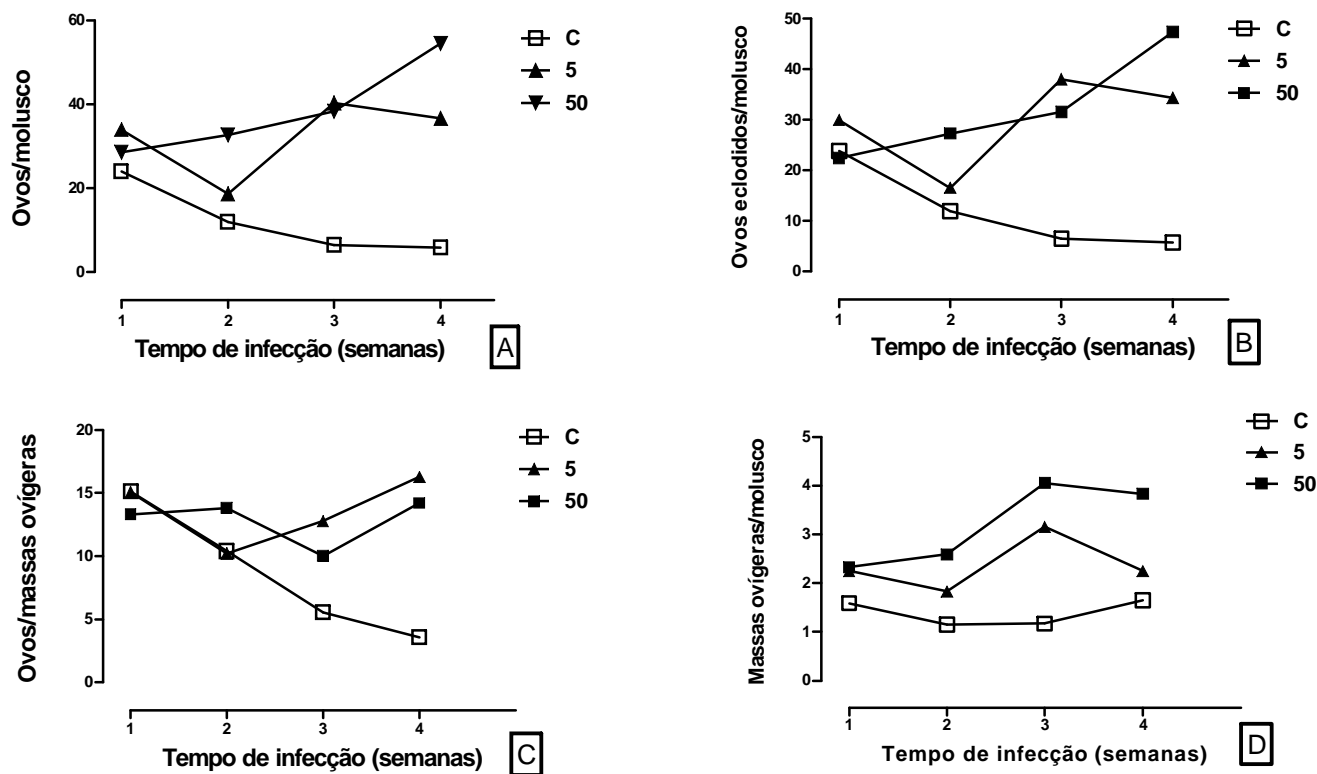
Alterações na atividade reprodutiva de *B. glabrata* foram observadas com a infecção por *E. paraensei* em relação ao controle, ao longo do período analisado. A infecção causou aumento significativo, em média, na taxa ovipositória dos moluscos infectados com 5 (32,381±4,741 ovos/molusco) e 50 (38,516±5,659 ovos/molusco) miracídios, em relação ao grupo não-infectado (12,107±4,195 ovos/molusco) (Tabela 1), sendo que, os maiores valores foram observados a partir da terceira semana de infecção (Figura 1a).

A partir da segunda semana pós-infecção ambos os grupos infectados apresentaram menor número de ovos eclodidos do que o controle (Figura 1b). Porém, não houve diferença significativa entre o grupo controle e infectados com 5 miracídios, e entre estes e infectados com 50 no final do período analisado (Tabela 1). Contudo, a viabilidade dos ovos foi de 91,72% e 83,48% nos grupos infectados com 5 e 50 miracídios, respectivamente. Enquanto, a viabilidade do grupo controle foi de 98,88%. Assim, embora os moluscos parasitados apresentassem em média um maior número de ovos postos, estes apresentaram menor eclodibilidade do que o grupo controle.

A análise do número de massas ovíferas/moluscos demonstrou a mesma ordem de variação, com os grupos infectados apresentando valores em média superiores ao grupo controle, porém somente o grupo infectado com 50 miracídios (3,202±0,434) diferiu significativamente do grupo não infectado (1,390±0,132) caracterizando um aumento de 130,36% (Tabela 1). Este aumento foi observado desde a primeira semana de infecção para ambos os grupos infectados (Figura 1c). Entretanto, a razão entre número total de ovos/massa ovígera apresentou maiores valores nas duas últimas semanas de análise para os grupos infectados com ambas as doses de miracídios (Figura 1d), não havendo diferença significativa entre eles e o controle (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito da infecção de *Biomphalaria glabrata* com *Echinostoma paraensei* em função da dose miracidial (5 e 50). Dados são expressos como médias ± erro padrão da média. <sup>a, b, c</sup>= médias diferem significativamente entre si ( $\alpha=5\%$ ).

	Nº ovos/molusco	Nº moluscos eclodidos/molusco	Ovos viáveis (%)	Nº massas/molusco	Nº ovos/nº massas
<b>Controle</b>	12,107±4,195 <sup>a</sup>	11,972±4,190 <sup>a</sup>	98.88	1,390±0,132 <sup>a</sup>	8,669±5,171 <sup>a</sup>
<b>Infectado 5</b>	32,381±4,741 <sup>b</sup>	29,700±4,703 <sup>a,b</sup>	91.72	2,371±0,278 <sup>a,b</sup>	13,58±2,675 <sup>a</sup>
<b>Infectado 50</b>	38,516±5,659 <sup>b</sup>	32,157±5,414 <sup>b</sup>	83.48	3,202±0,434 <sup>b</sup>	12,826±1,918 <sup>a</sup>



**Figura 1.** Efeito da infecção por *Echinostoma paraensei* sobre a biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata*, em função da dose miracidial (5 e 50 miracídeos), por um período de quatro semanas. (A) número de ovos/molusco; (B) número de ovos viáveis/molusco; (C) número de ovos/número de massas e (D) número de massas/molusco. Valores são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A análise do número de ovos postos/molusco revelou aumento da taxa ovipositória dos moluscos infectados por *E. paraensei* desde a primeira semana de infecção, no entanto, houve uma elevação ainda maior nos períodos mais tardios. O mesmo foi observado por Minchela (1985), que denominou este fenômeno compensação da fecundidade, onde o animal parasitado eleva seus esforços reprodutivos a fim de compensar as perdas futuras que ocorrerão em decorrência deste estresse. Resultados discordantes dos acima foram encontrados por Brumpt (1941) em um estudo sobre a influência da interação *S. mansoni*/*B. glabrata* na reprodução de seu hospedeiro, cujos resultados vieram mais tarde corroborar aqueles obtidos por Etges e Gresso (1965) que, trabalhando com o mesmo sistema parasito-hospedeiro, observaram inicialmente decréscimo do número de ovos postos pelos moluscos infectados, porém esta diminuição era temporária, aumentando novamente após a eliminação de cercárias.

Neste estudo, observou-se um aumento no número de massas ovíferas/moluscos infectados tanto por 5 quanto por 50 miracídeos de *E. paraensei* em relação ao grupo controle, todavia não houve alteração significativa na relação entre número de ovos/massas ovíferas. Da mesma maneira, Schallig et al. (1992) verificaram que estágios jovens de *Lymnaea*



*stagnalis* (Linnaeus, 1758) infectadas por *Trichobilharzia ocellata* (La Valette, 1855) apresentavam aumento significativo no número de massas ovíferas entre a segunda e quarta semanas pós-infecção quando comparado a moluscos não infectados, mas não observaram quaisquer diferenças no número de ovos/massa ovígera entre moluscos infectados e não infectados acima de cinco semanas pós-infecção. Os resultados do presente estudo sugerem que, embora a viabilidade dos ovos diminua com a infecção, a taxa ovipositória aumenta caracterizando um mecanismo ecológico capaz de compensar a redução da eficiência reprodutiva.

Na relação entre *L. stagnalis/T. ocellata*, Sluifers et al. (1984) demonstraram um aumento da atividade secretória das células caudo-dorsais em organismos infectados e Dictus et al. (1987) observaram que, um neuropeptídeo produzido por estas células estava envolvido na regulação da reprodução. de Jong-Bring et al. (1988) caracterizaram e denominaram este peptídeo de schistosomina, o qual antagoniza a ação da calfluxina, outro peptídeo responsável pelo influxo de cálcio na mitocôndria das células da glândula de albúmen de *L. stagnalis* infectada com *T. ocellata*. De acordo com Hinkle e McCarty (1978), o processo de fosforilação oxidativa requer influxo de cálcio na matriz mitocondrial e quando este influxo é reduzido, as células passam a sintetizar menos energia (ATP). Desta maneira, a síntese de galactogênio nas células da glândula de albúmen é reduzida. Subsequentemente, a quantidade deste polissacarídeo depositado nos ovos será reduzida e ovos inférteis serão produzidos.

A partir dos resultados acima, pode-se concluir que a infecção por 5 e 50 miracídios de *E. paraensei* em *B. glabrata* induziu alteração na atividade reprodutiva de tal molusco, provavelmente como um mecanismo de estratégia ecológica do hospedeiro intermediário, a fim de promover a manutenção da espécie no ambiente. Contudo, não se verificou diferenças significativas nos itens avaliados em relação à dose miracidial, demonstrando que neste modelo, a alteração da biologia reprodutiva de *B. glabrata* é decorrente somente a infecção e não da intensidade da infecção.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUMPT, E. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. **Annales de Parasitologie**, v.18, p.9–45, 1941.

de JONG-BRINK, M.; ELSAADANY, M. M.; BOER, H. H. *Trichobilharzia ocellata*: interference with endocrine control of female reproduction of *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v.65, p.91–100, 1988.

DICTUS, W. J.; de JONG-BRINK, M.; BOER, H. H. A neuropeptide (Calfluxin) is involved in the influx of calcium into mitochondria of the albumen gland of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.65, p.439–450, 1987.

ETGES, F. J.; GRESSO, W. Effect of *Schistosoma mansoni* Infection upon Fecundity in *Australorbis glabratus*. **The Journal of Parasitology**, v.51, p.757–760, 1965.

GOMOT, A. Photoperiod and temperature interaction in the determination of reproduction of the edible snail, *Helix pomatia*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.581–585, 1990.

- HINKLE, P. C.; MCCARTY, R. E. How cells make ATP. **Scientific American**, v.238, p.104–123, 1978.
- HODASI, J. K. The effects of *Fasciola hepatica* on *Lymnaea truncatula*. **Parasitology**, v.65, p.359–369, 1972.
- LIE, K. J.; BASCH, P. F. The Life History of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **The Journal of Parasitology**, v.53, p.1192–1199, 1967.
- LOKER, E. S. Effects of *Schistosomatium douthitii* infection on the growth, survival, and reproduction of *Lymnaea catascopium*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.34, p.138–144, 1979.
- LISTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; BESSA, E. C. A.; PINHEIRO, J. *Allamanda cathartica* L. Seeds induces changes on carbohydrates deposits of *Bradybaena similaris*. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.10, p.23–27, 2008.
- LISTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; MARASSI, M. P.; PINHEIRO, J. Lipids Analysis in Hemolymph of *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) Exposed to Different Photoperiods. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, p.631–637, 2010.
- MALDONADO JR., A.; COURA, R.; GARCIA, J. S.; LANFREDI, R. M.; REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.193–198, 2001.
- MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M. L. A. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B (Euphorbiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.3–8, 2006.
- MELLO-SILVA, C. C.; VILAR, M. M.; BEZERRA, J. C.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M. L. A. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* latex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.671–674, 2007.
- MINCHELLA, D. J. Host life-history variation in response to parasitism. **Parasitology**, v.90, p.205–216, 1985.
- OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J. The population density effects on the reproductive biology of the snail *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.367–371, 2008.
- PAN, C. T. Studies on the host–parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.14, p.931–976, 1965.
- PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris*

(Gastropoda, Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.407–410, 1994.

PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum*: influence of the infection on the reproduction and nucleic acids contents in the albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similaris*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.635–638, 1995.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR., A.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitology Research**, v.93, p.171–177, 2004a.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR., A.; LANFREDI, R. M. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, v.121, p.265–275, 2004b.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR, A.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55–59, 2009.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR., A.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Ultrastructure of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.97, p.367–372, 2005.

SANDLAND, G. J.; MINCHELLA, D. J. Effects of diet and *Echinostoma revolutum* infection on energy allocation patterns in juvenile *Lymnaea elodes* snails. **Oecologia**, v.134, p.479–486,

SCHALLIG, H. D.; SASSEN, M. J.; de JONG-BRINK, M. In vitro release of the antigonadotropic hormone, Schistosomin, from the central nervous system of *Lymnaea stagnalis* is induced with a methanolic extract of cercariae of *Trichobilharzia ocellata*. **Parasitology**, v.104, p.309–314, 1992.

SLUITERS, J. F. Development of *Trichobilharzia ocellata* in *Lymnaea stagnalis* and the effects of infection on the reproductive system of the host. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.64, p.303–319, 1981.

SLUITERS, J. F.; BRUSSAARD-WUST, C. C. M.; MEULEMAN, E. A. The relationship between miracidial dose, production of cercariae, and reproductive activity of the host in the combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.63, p.13–26, 1980.

SLUITERS, J. F.; ROUBOS, E. W.; JOOSSE, J. Increased activity of the female gonadotrophic hormone producing caudo dorsal cells in *Lymnaea stagnalis* with *Trichobilharzia ocellata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.70, p.67–72, 1984.

STURROCK, B. M.; STURROCK, R. F. Laboratory studies on the host–parasite relationship of *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata* from St. Lucia, West Indies. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.64, p.357–363, 1970.

VASQUEZ, R. E.; SULLIVAN, J. T. Effect of miracidial dose on adoptively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. **The Journal of Parasitology**, v.87, p.460–462, 2001.

WEBBE, G.; JAMES, C. Host–parasite relationships of *Bulinus globosus* and *B. truncatus* with strains of *Schistosoma haematobium*. **Journal of Helminthology**, v.46, p.185–199, 1972.

WILSON, R. A.; DENISON, J. The parasitic castration and gigantism of *Lymnaea truncatula* infected with the larval stages of *Fasciola hepatica*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.61, p.109–119, 1980.

## 5 CAPÍTULO II

**A INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO DE *ECHINOSTOMA PARAENSEI* (LIE E BASCH, 1967) SOBRE O CONTEÚDO DE CÁLCIO NA HEMOLINFA E CONCHA DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818)**

A INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO DE *ECHINOSTOMA PARAENSEI* (LIE E BASCH, 1967)  
SOBRE O CONTEÚDO DE CÁLCIO NA HEMOLINFA E CONCHA DE *BIOMPHALARIA*  
*GLABRATA* (SAY, 1818)

**RESUMO**

Os conteúdos de cálcio na hemolinfa e concha de *Biomphalaria glabrata* foram determinados antes e após exposição às diferentes cargas parasitárias (5 e 50 miracídeos) de *Echinostoma paraensei*. Semanalmente, durante quatro semanas de infecção, moluscos foram dissecados e a hemolinfa e concha foram coletadas. Um aumento na calcemia ocorreu nos moluscos infectados com ambas as doses miracidiais. Um decréscimo significativo nos conteúdos de íons cálcio na concha foi verificado, coincidindo com o pico de calcemia na hemolinfa. Os resultados demonstram uma grande mobilização de cálcio estabelecida entre concha e hemolinfa para regular o conteúdo de cálcio no organismo do molusco hospedeiro quando é exposto a condições de estresse, como também tem sido observada em alguns outros moluscos infectados. Paralelamente, os resultados obtidos indicam que neste modelo, o metabolismo de cálcio depende da dose miracidial.

**Palavras-chaves:** Metabolismo inorgânico; Molusco; Relação parasito-hospedeiro; Trematoda.

## ABSTRACT

The calcium content in the haemolymph and shell of *Biomphalaria glabrata* was determined before and after exposure to different parasite burdens (5 and 50 miracidia) of *Echinostoma paraensei*. Weekly, for four weeks of infection, snails were dissected and the haemolymph and shell were collected. An increase in calcemia occurred when the snails infected with both miracidial doses. A significant decrease in the calcium ions in the shell was observed, coinciding with the calcemia peak in the haemolymph. This result greater mobilization of calcium between the shell and the haemolymph to regulate the calcium content in the snails' body when it is exposed to stress conditions, as has also been observed in some other infected snails. The results obtained indicate that in this model, the calcium metabolism depends on the miracidial dose used.

**Keywords:** Inorganic metabolism; snail; host-parasite relationship; Trematoda.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Cálcio é o elemento inorgânico mais importante presente na concha de gastrópodes, onde é estocado na forma de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Carbonato de cálcio fornece o grupamento  $\text{CO}_2$  para a formação do tampão bicarbonato que é importante no processo metabólico do equilíbrio ácido-base na hemolinfa de moluscos submetidos a condições de estresse (de WITH; SMINIA, 1980). Íons cálcio têm sido referidos como um fator limitante na distribuição e adaptação de moluscos adultos no ambiente. Em paralelo, estudos apontam o envolvimento deste elemento no sucesso adaptativo de moluscos, principalmente em suas atividades ovipositoras (THOMAS et al., 1974; NDUKU; HARRISON, 1976; APPLETON, 1978; DAWIES; ERASMUS, 1984).

Estudos prévios demonstram alterações no metabolismo inorgânico de moluscos infectados por larvas de trematódeos digenéticos (PINHEIRO; AMATO, 1995; PASCHOAL; AMATO, 1996). Entretanto, nenhum padrão tem sido estabelecido considerando a habilidade dos parasitos de induzir alterações específicas em seus hospedeiros (ZIBKOWSKA, 2003; PINHEIRO et al., 2009). Por exemplo, aumento do conteúdo de cálcio na concha de moluscos infectados foi demonstrado por McClelland e Bourns (1969) estudando a interface *Trichobilharzia ocellata* (La Valette, 1855) / *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) e Pinheiro e Amato (1995) durante a relação entre *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) / *L. stagnalis*. Em contra partida, White et al. (2005) após estudarem os efeitos da infecção de *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914), *Echinostoma caproni* Richard, 1964 e *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) em seus respectivos hospedeiros intermediários *Helisoma trivolvis* (Say, 1818), *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Physa* Draparnaud, 1801 verificaram um decréscimo significativo na concentração deste mineral na concha dos moluscos infectados em relação aos não infectados. A partir de tal estudo, estes autores propuseram que a possível influência de larvas de trematódeos no conteúdo de cálcio das conchas de moluscos infectados sob condições experimentais ou naturais necessita de novos estudos utilizando mais materiais comparativos e representativos para o melhor entendimento deste fenômeno.

*Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) é um equinostomatídeo brasileiro com detalhes sobre aspectos morfológicos e biológicos dos helmintos adultos descritos por Maldonado et al. (2001a, b). Adicionalmente, o desenvolvimento dos estágios larvais de trematódeos digenéticos e as alterações metabólicas no hospedeiro molusco tem sido estudado por vários grupos de pesquisa (PINHEIRO et al., 2004a,b, 2005, 2009; ATAEV et al., 2001; DOBROVOLSKIJ et al., 2000; FUJINO et al., 2000). Entretanto, existem poucos estudos sobre alterações no metabolismo inorgânico de moluscos infectados por *Echinostoma* spp (LAYMAN et al., 1996; WHITE et al., 2005;).

A utilização de diferentes cargas miracidiais em estudos voltados na interação parasito/hospedeiro tem sido utilizada para determinar o impacto da infecção (SLUITERS et al. 1980; VASQUEZ; SULLIVAN, 2001; TUNHOLI et al., 2011). Resultados de estudos prévios têm demonstrado que algumas frações de lipídeos neutros na relação *B. glabrata* / *E. paraensei* alteram em resposta a dose miracidial (TUNHOLI-ALVES et al., 2011). Assim, um melhor entendimento do complexo balanço entre parasito/hospedeiro pode ser fornecido por tais experimentos, onde a dose miracidial e/ou tempo de infecção podem ser experimentalmente manipulados (BANDSTRA et al. 2006). Entretanto, não existem estudos sobre o metabolismo de cálcio em moluscos infectados com diferentes doses miracidiais de *E. paraensei*. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações nos conteúdos de cálcio na hemolinfa e concha de *B. glabrata* após exposição a duas doses miracidiais (5 e 50)



de *E. paraensei* ao longo de 4 semanas, intervalo que corresponde o período pré-patente deste parasito (LIE; BASCH, 1967).

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Coleta de ovos de *Echinostoma paraensei* e obtenção dos miracídios

Foi realizada a infecção experimental de “hamsters” *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839), os quais foram posteriormente eutanasiados usando uma câmara de CO<sub>2</sub> (de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais, CEUA L-074/08) e necropsiados para a coleta das formas adultas de *E. paraensei* do intestino. Os vermes adultos foram dissecados para a coleta e recuperação dos ovos uterinos, os quais em seguida foram incubados em água destilada, a 30°C durante 14 dias. Após isto, os ovos foram expostos à luz de uma lâmpada de 100W por cerca de 2 horas para estimular a eclosão e concentração dos miracídios (PINHEIRO et al. 2004a, b, 2005).

### 5.2.2 Obtenção de *Biomphalaria glabrata* e infecção experimental

Os moluscos foram obtidos do Laboratório de Esquistossomose Experimental, Fundação Oswaldo Cruz, RJ.

Moluscos jovens (8-12mm) foram colocados numa placa de 24 furos onde os miracídios foram colocados previamente com o auxílio de uma micropipeta, proporcionando uma infecção individual de cinco (5) ou cinquenta (50) miracídios por molusco (SLUITERS et al., 1980; VASQUEZ; SULLIVAN, 2001). Após 24 horas os moluscos foram retirados das placas e transferidos para aquários.

Os moluscos foram então removidos das placas e transferidos para os aquários. Somente aqueles moluscos que albergavam esporocistos de *E. paraensei* em seus respectivos sistemas circulatórios foram selecionados para estudos adicionais, uma vez que esporocistos já são visíveis em 2 dias pós-infecção (LOKER; HERTEL, 1987).

### 5.2.3 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos

Em cada aquário foram previamente colocados 1500ml de água destilada onde era acrescentado cerca de 0,5g de CaCO<sub>3</sub>. Uma vez por semana a água era renovada. Foram formados 12 grupos, quatro grupos Controle (não infectados) utilizando n=80 moluscos, 4 grupos de moluscos infectados com 5 miracídios cada (n=80 moluscos), e os 4 grupos restantes foram formados por moluscos infectados com 50 miracídios cada (n=80 moluscos). Cada aquário era composto por 10 moluscos sendo todo experimento realizado em duplicata, utilizando um “n” total de 240 moluscos. Estas doses (5 e 50 miracídios) foram usadas para caracterizar baixa e alta parasitemias, uma vez que na natureza não existe uma maneira de controlar estes parâmetros e o sucesso da infecção está relacionado com a presença e o número de moluscos e miracídios (TUNHOLI et al., 2011).

A alimentação dos moluscos foi feita com folhas de alface (*Lactuca sativa* Linnaeus, 1753) *ad libitum*. A manutenção do aquário foi realizada em dias alternados, quando as folhas de alface eram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos aquários. O número de moluscos mortos também foi um critério observado e contabilizado.

### 5.2.4 Dissecção e coletas da hemolinfa e concha

Semanalmente, durante quatro semanas de infecção, a hemolinfa dos moluscos era coletada por punção cardíaca de exemplares, randomicamente escolhidos, de cada grupo (n=10). Após a dissecção dos moluscos, as conchas eram removidas, lavadas e guardadas

secas em temperatura ambiente. A hemolinfa era mantida em banho de gelo durante toda a coleta e acondicionada a - 10°C.

### 5.2.5 Determinação das concentrações de cálcio na hemolinfa e concha

O conteúdo de cálcio na hemolinfa de *B. glabrata* foi determinado pela adição de 20µl de hemolinfa a 2,6ml de reagente de cor (dietanolamina 5,7M, dietilamina 4,3M, 8-hidroxiquinolina 0,019M, o-cresoltaleína complexona 0,00025M), sendo a absorbância lida em 570nm, contra o branco de reação, e usando como padrão solução de cálcio 10mg/dl (Doles®, Brasil). Os resultados foram expressos como mg de cálcio/dl de hemolinfa. O conteúdo de cálcio na concha foi determinado de acordo com Pinheiro e Amato (1995) e Soido et al. (2009). Resumidamente, as conchas foram transferidas para cadinhos de porcelanas não-porosos, previamente lavados com ácido nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>). As conchas foram mantidas em mufla, a 450°C por 48 horas para o processo de calcinação. As amostras foram então pesadas e diluídas em 50 ml de HNO<sub>3</sub> e mantidas em digestão por seis horas. Em seguida, 2 ml de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram adicionados permitindo a clarificação da solução resultante. As amostras foram então diluídas cem vezes em água destilada e cinco alíquotas de 25 mL cada foram feitas para a determinação de cálcio usando complexometria, tendo o EDTA como titulante e murexida como indicador de acordo com McCornick (1973). A massa de carbonato de cálcio foi calculada utilizando o volume de EDTA gasto no processo de titulação e expresso como mg de CaCO<sub>3</sub>/g de concha.

### 5.2.6 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão e o teste de TukeyANOVA foram utilizados para a comparação das médias. A regressão polinomial foi aplicada para análise da relação entre os valores obtidos e o tempo de infecção, bem como a carga parasitária às quais os moluscos foram expostos ( $\alpha=5\%$ ) (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

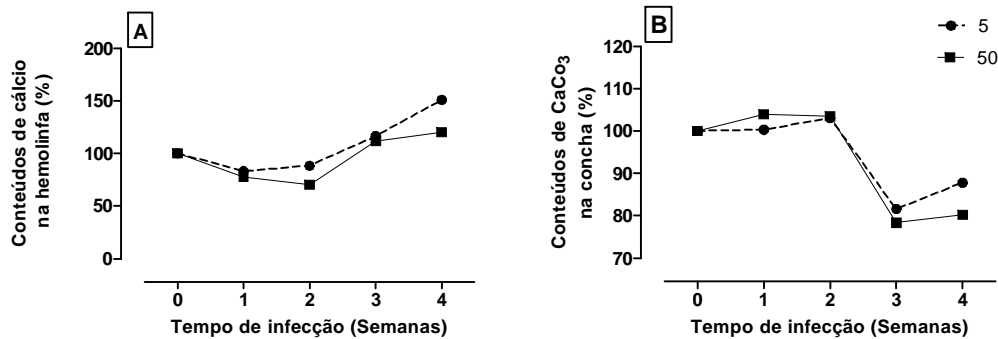
## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma relação positiva entre o período de infecção e o conteúdo de cálcio na hemolinfa de moluscos parasitados foi observada em ambos os grupos (5 [ $r^2=0,99$ ] e 50 [ $r^2=0,77$ ] miracídios). Os maiores valores dos níveis de cálcio na hemolinfa foram verificados na quarta semana pós-exposição: +50,9% (19,98±0,43 mg/dl, para os moluscos infectados com 5 miracídios) e +20,46% (15,95±0,29 mg/dl, para os moluscos infectados com 50 miracídios). Estes valores foram maiores àquele observado na média do grupo controle (13,24±0,38 mg/dl) (Tabela 1 e Figura 1a).

Na concha, uma relação negativa entre o conteúdo de cálcio e o período de infecção foi constatada para ambas as doses miracidiais (5 [ $r^2=0,56$ ] e 50 [ $r^2=0,72$ ] miracídios). O nível de íons cálcio foi reduzido tanto nos moluscos infectados com 5 miracídios (-18,41%) quanto aqueles infectados com 50 miracídios (-19,29%) na terceira semana pós-exposição em relação a média do grupo controle (307,19±3,4 mg de CaCO<sub>3</sub>/g de concha) (Tabela 1 e Figura 1b).

**Tabela 1.** Conteúdo de cálcio na hemolinfa (mg/dl), e na concha (mg de CaCO<sub>3</sub>/g de concha) de *Biomphalaria glabrata* infectada com 5 ou 50 miracídeos de *Echinostoma paraensei*, em diferentes períodos de infecção (em semanas). X ± SD=média ± desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup>= médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente de seus respectivos grupo controle em cada semana experimental, P <0.05.

Período de infecção (semanas)	Hemolinfa (mg/dl)			Concha (mg of CaCO <sub>3</sub> /g de concha)		
	Controle	5	50	Controle	5	50
	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD
1	13,20±0,35 <sup>a</sup>	11,03±0,33 <sup>b</sup>	10,30±0,24 <sup>b</sup>	305,27±3,38 <sup>a</sup>	308,19±8,46 <sup>a</sup>	309,41±3,85 <sup>a</sup>
2	13,25±0,39 <sup>a</sup>	11,69±0,16 <sup>b</sup>	9,30±0,03 <sup>c</sup>	307,32±3,36 <sup>a</sup>	316,50±3,27 <sup>a</sup>	317,92±1,75 <sup>a</sup>
3	13,22±0,36 <sup>a</sup>	15,41±0,40 <sup>b</sup>	14,78±0,18 <sup>b</sup>	304,87±3,30 <sup>a</sup>	250,61±2,77 <sup>b</sup>	240,87±1,11 <sup>b</sup>
4	13,29±0,42 <sup>a</sup>	19,98±0,43 <sup>b</sup>	15,95±0,29 <sup>c</sup>	311,30±3,56 <sup>a</sup>	269,75±0,95 <sup>b</sup>	246,55±3,95 <sup>c</sup>
r <sup>2</sup>		0,99	0,77		0,56	0,72



**Figura 1.** Conteúdo de cálcio na hemolinfa (A) e na concha (B) de *Biomphalaria glabrata* infectada com 5 (●) ou 50 (■) miracídeos de *Echinostoma paraensei*, em diferentes períodos de infecção (em semanas). Zero (0) semana pós-infecção representa o valor da média do grupo controle. Os resultados representam as alterações percentuais dos conteúdos de cálcio em moluscos infectados usando os valores do grupo controle como referência.

O aumento no conteúdo de cálcio na hemolinfa foi associado com um decréscimo deste íon na concha de *B. glabrata* expostas com 5 e 50 miracídeos de *E. paraensei* evidenciando a existência de uma via homeostática entre concha e hemolinfa. Moluscos expostos a condições de estresse aceleram seu metabolismo energético culminando com um balanço energético negativo, devido ao alto consumo de nutrientes a partir de formas larvais em desenvolvimento, levando a um aumento na formação de ácidos orgânicos e concomitante redução do pH hemolinfático (PINHEIRO; AMATO, 1994; PINHEIRO, 1996). A mobilização de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) da concha para a hemolinfa ajuda a manter o equilíbrio do balanço ácido-base, onde se dissocia e libera CO<sub>2</sub>, um importante componente do tampão bicarbonato, vital ao estabelecimento da homeostase ácido-base (de WITT; SMINIA, 1980;

PINHEIRO; AMATO, 1995; MOREIRA et al., 2003).

O período inicial da infecção por *E. paraensei* no hospedeiro intermediário é caracterizado por um intenso processo de reprodução assexuada, permitindo o desenvolvimento dos estágios de miracídios para esporocistos mãe, com a formação de rédias dentro destes últimos (PINHEIRO et al., 2004a, b, 2005). Por esta razão, os requerimentos metabólicos do hospedeiro e parasito neste momento são maiores, o que pode explicar as menores concentrações de cálcio na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *E. paraensei*, nas duas primeiras semanas pós-infecção.

Significativa hipocalcificação foi observada nas conchas de moluscos infectados com cinco e 50 miracídios, quando comparado a média do grupo controle (não-infectado) a partir da terceira semana pós-exposição. Isto poderia ser uma consequência do processo metabólico do molusco relacionado com a manutenção do equilíbrio ácido-base na hemolinfa em resposta a infecção por estágios larvais de *E. paraensei*, como registrado por Shaw e Erasmus (1987). Esta alteração pode também ser em função das necessidades energéticas do parasito necessários para completar o desenvolvimento de seus estágios larvais intra-molusco, já que eles também apresentam reservas de cálcio em suas células (DAWIES; ERASMUS, 1984)

Outros estudos também têm demonstrado a importância do íon cálcio na resposta imunológica do hospedeiro, uma vez que, a atividade fagocítica de hemócitos e outras células de defesa dependem de cálcio (GUILLOU et al., 2007). Portanto, o aumento nos níveis de cálcio na hemolinfa de moluscos parasitados a partir da terceira semana pós-exposição, provavelmente contribui para o fortalecimento da resposta imunológica contra a infecção, reduzindo os distúrbios fisiológicos ocasionados por este estresse porque neste período rédias maduras liberam as cercárias, que seguem migrando através dos tecidos do hospedeiro até alcançarem o meio ambiente. As injúrias teciduais causadas por estas migrações podem ativar uma resposta imunológica, elevando a quantidade de cálcio circulante na hemolinfa do molusco. Um aumento não significativo nos conteúdos de cálcio nas conchas de moluscos infectados com ambas as doses miracidiais foi determinado, porém este efeito pode ser uma resposta a hipocalcificação induzida pelas larvas do parasito. Zbikowska (2003) não encontrou diferenças significativas nas concentrações de carbonato de cálcio em *L. stagnalis* naturalmente infectada com larvas de digenéticos, e o autor sugeriu que isto fosse devido ao consumo de cálcio da água. Isto pode explicar o aumento do conteúdo de cálcio na concha apresentada na primeira e segunda semanas pós-infecção no presente experimento.

O menor conteúdo de cálcio na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com 50 miracídios, quando comparado àqueles infectados com cinco miracídios, pode ser melhor explicado pela alta deposição deste íon em tecidos do hospedeiro como resultado de uma resposta inflamatória causada pelo parasito (MOSTAFA, 2007). De acordo com Pinheiro et al. (2005), este período coincide com a formação de rédias no molusco. Este estágio larval alimenta dos tecidos do hospedeiro, especialmente a glândula digestiva de *B. glabrata* (FRIED; HUFFMAN, 1996). Além disto, após a formação dos estágios de rédia, a maior aquisição alimentar deste íon pelas larvas do parasito é observado (DAVIES, 1983), o que explica os menores níveis de cálcio hemolinfáticos nos hospedeiros com alta parasitemia em relação aos moluscos infectados com 5 miracídios, resultando em uma maior mobilização de  $\text{CaCO}_3$  da concha para regular os níveis de cálcio na hemolinfa nestes hospedeiros.

Estes resultados permitem supor uma estratégia precisamente elaborada pelas larvas do parasito durante seu desenvolvimento intra-molusco. No início do desenvolvimento larval (primeira e segunda semanas) o conteúdo de cálcio é aumentado na concha, quando comparado aos moluscos não-infectados, e isto aumenta a resistência da concha, um importante fator que dificultaria a morte do hospedeiro por predadores naturais garantindo assim, o desenvolvimento larval. Posteriormente, quando as larvas infectantes (cercárias) forem formadas (terceira e quarta semanas) esta situação é invertida, o cálcio é removido da

concha para a hemolinfa, sendo a concha enfraquecida, favorecendo a predação e consequentemente a liberação/transmissão das larvas infectantes.

No modelo *B. glabrata/E. paraensei* a dose miracidial exerce um significativo efeito na concentração deste íon. As maiores alterações foram observadas nos moluscos infectados com 50 miracídios, sendo o padrão de resposta similar a ambas as doses, uma vez que, o desenvolvimento ontogênico do parasito permanece o mesmo. Estas observações explicam as maiores necessidades energéticas e danos celulares nos organismos com alta parasitemia.

#### 5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLETON, C. C. Review of literature on abiotic factors influencing the distribution and life cycles of bilharziasis intermediate host snails. **Malacological Review**, v.11, p.1-25, 1978.

ATAEV, G. L.; DOBROVOLSKIJ, A. A.; AVANESSIAN, A. V.; LOKER, E. S. 2001. Germinal elements and their development in *Echinostoma caproni* and *Echinostoma paraensei* (Trematoda) miracidia. **Journal of Parasitology**, v.87, p.1160-1164, 2001.

BANDSTRA, S. R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, p.414-418, 2006.

DAVIES, T. W. *Schistosoma mansoni*: the structure and elemental composition of pre acetabular penetration gland cell secretion in pre-emergent cercariae. **Parasitology**, v.87, p.55-60, 1983.

DAVIES, T. W.; ERASMUS, D. A. An ultrastructural study of the effect of parasitism by larval *Schistosoma mansoni* on the calcium reserves of host, *Biomphalaria glabrata*. **Cell Tissue Research**, v.236, p.643-649, 1984.

de WITT, N. D.; SMINIA, T. The effects of the nutritional state and the external concentration of the ionic composition of the haemolymph and on calcium cells in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v.83, p.213-227, 1980.

DOBROVOLSKIJ, A. A.; GALAKTIONOV, K. V.; ATAEV, G. L. Germinal materials organization features and mothers sporocyst's reproduction dynamics of trematodes. **Parazitologija**, v.34, p.14-22, 2000.

FRIED, B.; HUFFMAN, J. E. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. **Advances in Parasitology**, v.38, p.311-368, 1996.

FUJINO, T.; NAKANO, T.; WASHIOKA, H.; TONOSAKI, A.; ICHIKAWA, H.; FRIED, B. Comparative ultrastructure of eggs in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni* and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.86, p.427-430, 2000.

GUILLOU, F.; ROGER, E.; MONÉ, Y.; ROGNON, A.; GRUNAU, C.; THÉRON, A.; MITTA, G.; COUSTAU, C.; GOURBAL, B. E. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, v.155, p.45-56, 2007.

LAYMAN, L. R.; DORY, A. C.; KOEHNLEIN, K. M.; FRIED, B.; SHERMA, J. Effects of *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) infection on metallic ions in the host snail *Heliosoma trivolvis* (Gastropoda). **Parasitology Research**, v.82, p.19–21, 1996.

LOKER, E. S.; HERTEL, L. A. Alterations in *Biomphalaria galabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. **The Journal of Parasitology**, v.73, p.503–513, 1987.

MALDONADO JR, A.; LOKER, E. S.; MORGAN, J. A. T.; REY, L.; LANFREDI, R. M. Description of the adult worm of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitology Research**, v.87, p.840–848, 2001a.

MALDONADO JR, A.; VIEIRA, G. O.; GARCIA, J. S.; REY, L.; LANFREDI, R. M. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. **Parasitology Research**, v.87, p.853–859, 2001b.

MCCLELLAND, G.; BOURNS, T. K. R. Effects of *Trichobilharzia ocellata* on growth, reproduction and survival of *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v.24, p.137–146, 1969.

MCCORNICK, P.G. Titration of calcium and magnesium in milk with EDTA. **Journal of Chemistry Education**, v.50, p.136, 1973.

MOREIRA, C. S. D. R.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M.; PINHEIRO, J. Calcium alterations in *Bradybaena similaris* Férussac, 1821 (Mollusca, Gastropoda) under starvation. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.5, p.45–54, 2003.

MOSTAFA, O. M. S. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. **Parasitology Research**, v.101, p.963–966, 2007.

NDUKU, W. K.; HARRISON, A. D. Calcium as a limiting factor in the biology of *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss) (Gastropoda: Planorbidae). **Hydrobiologia**, v.49, p.143–170, 1976.

PASCHOAL, S. V.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet) (Digenea: Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda: Xanthonychidae): alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, p.411–418, 1996.

PINHEIRO, J. Influence of Starvation on the Glycogen and Galactogen Contents in the Snail *Bradybaena Similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.39, p.349–357, 1996.

PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris*

(Gastropoda, Xanthynchidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.407-410, 1994.

PINHEIRO, J.; AMATO, S. Calcium determination in the shell of *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda) infected with *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes, Digenea). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.38, p.761-767, 1995.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitology Research**, v.93, p.171-177, 2004 a.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Ultrastructure of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.97, p.367-372, 2005.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; LANFREDI, R. M. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, v.121, p.265-275, 2004b.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55-59, 2009.

SHAW, M. K.; ERASMUS, D. A. *Biomphalaria glabrata*: changes in calcium reserves following parasitism by larval *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v.95, p.267-276, 1987.

SLUITERS, J. F.; BRUSSAARD-WUST, C. C. M.; MEULEMAN, E. A. The relationship between miracidial dose, production of cercariae, and reproductive activity of the host in the combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.63, p.13-26, 1980.

SOIDO, C.; VASCONCELLOS, M. C.; DINIZ, A. G.; PINHEIRO, J. An improvement of calcium determination technique in the shell of mollusks. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.93- 98, 2009.

THOMAS, J. D.; BENJAMIN, M.; LOUGH, A.; ARAM, R. H. The effects of calcium in the external environment on the growth and natality rates of *Biomphalaria glabrata* (Say). **Journal of Animal Ecology**, v.43, p.839-860, 1974.

TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; GÔLO, P.; LUSTRINO, D.; MALDONADO, A. JR.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v.128, p.212-216, 2011.

TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; MELLO-SILVA, C. C. C.; MALDONADO, A. JR.; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.106, p.192-195, 2011.

VASQUEZ, R. E.; SULLIVAN, J. T. Effect of miracidial dose on adoptively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**, v.87, p.460-462, 2001.

WHITE, M. M.; CHEJLAVA, M.; FRIED, B.; SHERMA, J. Effects of various larval digeneans on the calcium carbonate content of the shells of *Helisoma trivolvis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Physa* sp. **Parasitology Research**, v.95, p.252–255, 2005.

ZBIKOWSKA, E. The effect of digenea larvae on calcium content in the shells of *Lymnaea stagnalis* (L.) individuals. **Journal of Parasitology**, v.89, p.76–79, 2003.



## **6 CAPÍTULO III**

**PERFIL BIOQUÍMICO DE *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA: GASTROPODA)  
APÓS INFECÇÃO POR *Echinostoma paraensei* (TREMATODA:  
ECHINOSTOMATIDAE).**

PERFIL BIOQUÍMICO DE *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA: GASTROPODA) APÓS INFECÇÃO POR *Echinostoma paraensei* (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE).

**RESUMO**

O efeito da infecção por *Echinostoma paraensei* sobre a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e o conteúdo de proteínas totais, ácido úrico e uréia da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* foram investigados após exposição a 5 ou 50 miracídios. As concentrações bioquímicas foram semanalmente avaliadas até o final da quarta semana após a exposição. Foi observado decréscimo significativo nas concentrações de proteínas totais nos moluscos expostos a 5 ou 50 miracídios, e aumento de produtos nitrogenados de excreção, bem como aumento da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A elevação da atividade de ALT observada na hemolinfa dos moluscos após a infecção com 50 miracídios sugere maior requerimento energético destes moluscos em relação aqueles infectados por cinco miracídios. Estes resultados também sugerem aumento do uso de proteínas totais uma vez que foi verificado aumento da formação de catabólitos nitrogenados em conformidade com aumento da atividade das enzimas aminotransferases frequentemente relacionadas à condição de injúria tecidual. Isto pode ser explicado pela penetração dos miracídios e subsequente desenvolvimento de esporocistos e rédias após o período de exposição ao trematódeo.

**Palavras-chaves:** *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*, uréia, ácido úrico, aminotransferases.

## ABSTRACT

The effect of infection by *Echinostoma paraensei* on the activity of the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) and the concentration of total proteins, uric acid and urea in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* were investigated after exposure to five or 50 miracidia. The biochemical concentrations were measured weekly until the end of the fourth week after exposure. There was a significant decrease in the concentrations of total proteins in the snails exposed both to five and 50 miracidia, as well as an increase in the nitrogenous products of excretion, ALT and AST activities. The higher ALT activity in the hemolymph of the snails after infection with 50 miracidia suggests highest energetic requirement in these snails in relation to snails exposed to five miracidia. The results also suggest an increase in the use of total proteins, since there was increased formation of nitrogenous catabolites, in conformity with an increase in the aminotransferase activities, frequently associated with tissue damages. This can be explained by damage due to penetration by the miracidia and subsequent development of intramolluscan sporocysts and rediae.

**Keywords:** *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*, urea, uric acid, aminotransferases.

## 6.1 INTRODUÇÃO

*Echinostoma paraensei* (Lie e Basch, 1967) é uma espécie de trematódeo que pode infectar moluscos pulmonados, basomatóforos dos gêneros *Biomphalaria* (Preston, 1910), *Physa* Draparnaud, 1801, e *Lymnaea* Lamarck, 1799 (MALDONADO et al. 2001a). Foi primeiramente descrita a partir de espécimes *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) naturalmente infectados (LIE; BASCH, 1967). Posteriormente, este trematódeo foi isolado do seu hospedeiro definitivo, o roedor silvestre *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (MALDONADO et al., 2001b). Ambos *B. glabrata* e *N. squamipes* atuam como hospedeiros naturais de *Shistosoma mansoni* Sambon, 1907 (MALDONADO Jr. et al., 2001c, 2006). Durante seu desenvolvimento intra-molusco, *E. paraensei* apresenta os estágios de esporocistos mãe, rédias e cercarias, que migram pelos tecidos do molusco podendo causar destruição tecidual, e comprometimento dos processos metabólicos do molusco (FRIED et al., 2004; PINHEIRO et al. 2004a).

A infecção por trematódeos pode alterar as características bioquímicas da hemolinfa de moluscos (PEREZ et al, 1994; BANDSTRA et al, 2006). A maior demanda energética decorrente da infecção por trematódeos resulta em um redirecionamento das vias metabólicas tais como a das proteínas. Quando infectados por parasitos, moluscos drasticamente aumentam sua mobilização de carboidratos. A concentração de glicose na hemolinfa é severamente reduzida e os moluscos passam a fazer uso de reservas oriundas da glândula digestiva e massa cefalopediosa. Isto tem sido mostrado estar relacionado à intoxicação decorrente ao aumento de produtos nitrogenados de excreção (PINHEIRO; AMATO, 1994, 1995). Esta mobilização é dependente de alguns fatores, tais como o número de parasitos e a idade do molusco, sendo seguido por fenômenos compensatórios até sua morte pela exaustão das reservas energéticas ou intoxicação por excesso de catabólitos nitrogenados (de SOUZA et al., 2000).

Vários estudos têm demonstrado alterações significativas nos padrões biológicos de moluscos infectados por diferentes doses miracidiais (MASSOUD, 1974; SLUITERS et al., 1980; VASQUEZ; SULLIVAN, 2001). Théron et al. (1992) estudando a relação funcional de *B. glabrata* /*S. mansoni* com diferentes doses miracidiais observaram que moluscos expostos a infecções plurimiracidiais apresentaram glândula digestiva menor em relação a moluscos expostos a uma baixa dose miracidial, indicando um balanço de espaço e energia entre o desenvolvimento do parasito/hospedeiro. Neste contexto, embora alterações no perfil reprodutivo de *B. glabrata* infectada com *E. paraensei* ocorresse, este foi independente da dose miracidial usada (TUNHOLI et al., 2010).

Neste artigo, revisita-se a idéia da possível interferência da dose miracidial em relação às alterações bioquímicas como ferramentas adicionais para estudos comparativos utilizando parâmetros sistemáticos que permita explicar de maneira mais específica as alterações observadas. Para isto, foram analisadas as concentrações dos conteúdos de proteínas totais, ácido úrico e uréia, bem como a atividade da L-aspartato: 2 oxoglutarato aminotransferase (E.C.2.6.1.1) (AST) e L-alanina: 2 oxoglutarato aminotransferase (E.C.2.6.1.2) (ALT), como parâmetros de alteração metabólica e injúria tecidual de *B. glabrata* decorrentes da infecção experimental com 5 ou 50 miracídeos de *E. paraensei* (BLASCO; PUPPO, 1999; PINHEIRO et al., 2001).

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Obtenção de miracídios de *Echinostoma paraensei*

Hamsters *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839, com quatro semanas de idade foram infectados por via gástrica com 50 metacercárias, sendo eutanasiados e necropsiados após quatro semanas de infecção para obtenção dos vermes adultos de *E. paraensei*. Os helmintos tiveram o útero dissecado para liberação dos ovos. Esses foram então incubados em água destilada e mantidos em estufa B.O.D. a 26 °C por 14 dias. Após este período, os ovos foram expostos à luz (100 W) para estimular a eclosão e concentração dos miracídios (PINHEIRO et al., 2004a, b, 2005).

### 6.2.2 Infecção experimental de *Biomphalaria glabrata* (isolado Sumidouro, RJ.)

Os espécimes foram obtidos a partir da criação mantida no Laboratório de Esquistossomose Experimental, Fundação do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Os moluscos foram então mantidos em aquários de vidro de 2L (10 espécimes/aquário) e alimentados em dias alternados com alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum* por uma semana visando à adaptação as condições da experimentação. Três grupos de 40 moluscos foram formados: controle não exposto aos miracídios; expostos a 5 miracídios e expostos a 50 miracídios, individualmente por 24 horas (SLUITERS et al., 1980; VASQUEZ; SULLIVAN, 2001). Estas doses foram usadas para caracterizar baixa e alta parasitemias, uma vez que na natureza não existe maneira para controlar este parâmetro e o sucesso da infecção está relacionado à presença e número de moluscos e miracídios. Posteriormente, estes moluscos foram transferidos para novos aquários e mantidos como descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em duplicata.

### 6.2.3 Dissecção e coleta da hemolinfa

Semanalmente pós-infecção, dez espécimes de cada grupo experimental foram randomicamente escolhidos, dissecados e a hemolinfa coletada através da punção cardíaca e mantida a -10°C até a utilização para análises bioquímicas. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo durante as dissecções. Os hemócitos foram removidos após etapa de centrifugação (5 min - 10<sup>3</sup> rpm).

### 6.2.4 Atividade das aminotransferases (AST e ALT)

Para os ensaios das aminotransferases, 0,5 ml de substrato para ALT ou AST (solução contendo L-alanina a 0,2M ou L-aspartato a 0,2M;  $\alpha$ -cetoglutarato a 0,002M e tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7.4) foi incubado a 37 °C por 2 minutos. Em seguida, 100 ou 200 $\mu$ l de hemolinfa (para ALT e AST, respectivamente), foi adicionado, homogeneizado e novamente incubado a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, 0,5mL de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,001M foram adicionados e mantidos a 25 °C por 20 min. As reações foram interrompidas pela adição de 5mL de NaOH 0,4M. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 505nm (KAPLAN; PESCE, 1996). Os resultados foram expressos como URF/ml.

### 6.2.5 Dosagem de proteínas totais

Este ensaio foi feito de acordo com a técnica do Biureto (WEICHSELBAUM, 1946). Uma mistura de 50 $\mu$ l de hemolinfa e 2,5 ml do reagente de Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M, e sulfato de cobre 0,01M) foi homogeneizado, e deixado sob temperatura ambiente e após 5 min as leituras foram realizadas em espectrofotômetro 550nm. Os resultados foram expressos como g/dl.

### 6.2.6 Determinação das concentrações de ácido úrico e uréia

Para a determinação do ácido úrico, 50 µl de hemolinfa foi misturado com 2 ml do reagente de cor (tampão fosfato de sódio 100mmol/l [pH 7,8] contendo 4mmol/L diclorofenol-sulfonato, 4-aminoantipirina 0,5mmol/L, 120U ≤ uricase, 4.980U ≤ ascorbato oxidase, 1.080U ≤ peroxidase). A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 5 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 520nm (BISHOP et al., 1996). Os resultados foram expressos como mg/dl.

O ensaio para dosagem de uréia foi realizado através da adição de 2 ml de solução contendo 60 mmol de salicilato de sódio, nitroprussiato de sódio 3,4 mmol, e EDTA dissódico 1,35 mmol. Então, foram adicionados 2µl de urease e 20µl de hemolinfa. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 5 mim. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm. Os resultados foram expressos como mg/dl (CONNERTY et al., 1955).

### 6.2.7 Análises estatísticas

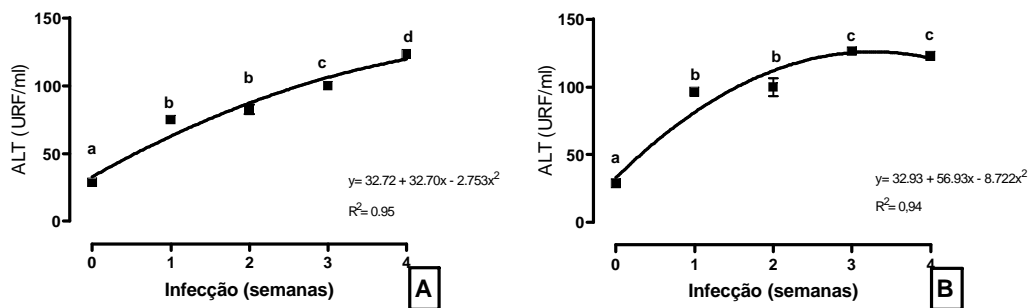
Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão e o teste de TukeyANOVA foram utilizados para a comparação das médias. A regressão polinomial foi aplicada para análise da relação entre os valores obtidos e o tempo de infecção, bem como a carga parasitária às quais os moluscos foram expostos ( $\alpha=5\%$ ) (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

## 6.3 RESULTADOS

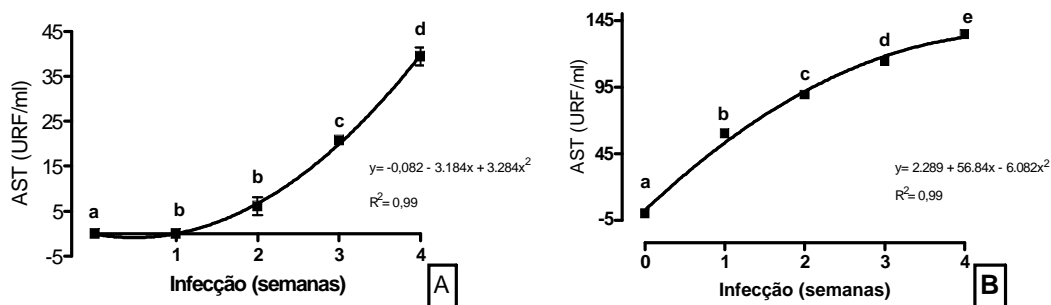
Um aumento significativo nas atividades de AST e ALT foi observado em moluscos infectados com 5 e 50 miracídios. Uma relação direta entre o período de infecção e atividade das enzimas, indicada pelos altos valores de  $r^2$  foram demonstradas ( $r^2=0,95$  e  $0,94$  para ALT e  $r^2=0,99$  e  $0,94$  para AST, para os moluscos infectados com 5 e 50 miracídios, respectivamente). (Figs. 1 e 2).

Um aumento significativo de 329% na atividade da ALT no final da quarta semana de infecção foi observado ( $123,30\pm 2,65$  URF/ml), quando infectados com 5 miracídios em relação ao grupo controle ( $28,74\pm 3,11$  URF/ml) (Fig. 1a). Semelhantemente, a infecção com 50 miracídios causou a elevação de 326% na atividade da ALT após quatro semanas de infecção ( $122,67\pm 3,14$  URF/ml), entretanto o maior valor observado ocorreu na terceira semana após a infecção ( $126,11\pm 4,39$  URF/ml) não sendo estatisticamente diferente do observado na quarta semana (Fig. 1b).

A atividade da AST também apresentou aumento significativo em função do tempo de infecção, com o valor máximo observado na quarta semana pós-infecção, para moluscos infectados com 5 e 50 miracídios ( $39,41\pm 3,44$  URF/ml e  $134,61\pm 1,97$  URF/ml, respectivamente). Foi verificado que o aumento na atividade da AST foi 134 vezes maior do que observado para moluscos infectados com 5 miracídios (Fig. 2a e b).

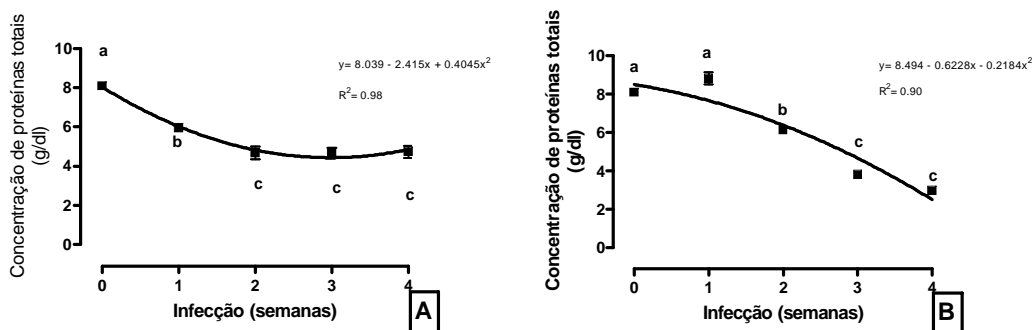


**Figura 1.** Relação entre a atividade da ALT, expressa em URF/ml, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP).



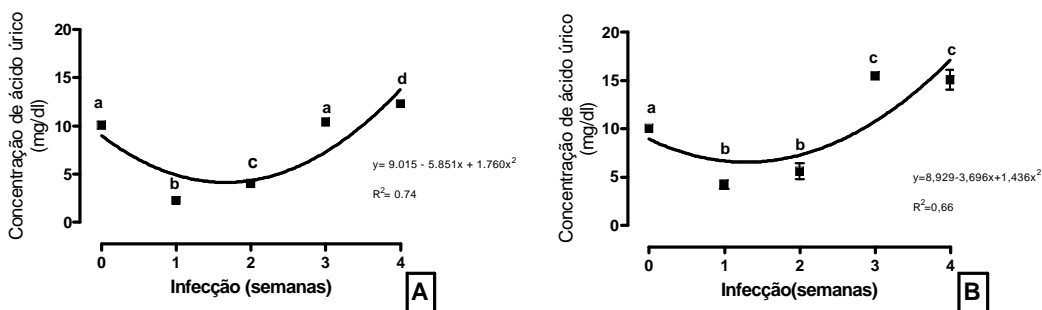
**Figura 2.** Relação entre a atividade da AST, expressa em URF/ml, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP).

O conteúdo de proteínas totais na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *E. paraensei* demonstrou diferenças significativas quando comparado ao grupo controle não infectado. Uma forte relação negativa foi observada entre o tempo de infecção e o conteúdo de proteínas totais na hemolinfa dos moluscos infectados com 5 miracídeos [ $r^2=0,98$ ] (Fig. 3a) e para aqueles infectados com 50 miracídeos [ $r^2=0,90$ ] (Fig. 3b). Uma redução de 41,46% nos níveis de proteínas totais foi observada nos moluscos infectados com 5 miracídeos na quarta semana de infecção ( $4,73 \pm 0,51$  g/dl) em comparação ao grupo controle ( $8,08 \pm 0,39$  g/dl). Entretanto, esta redução foi mais severa nos moluscos infectados com 50 miracídeos em mesmo período de infecção ( $2,97 \pm 0,29$  g/dl).



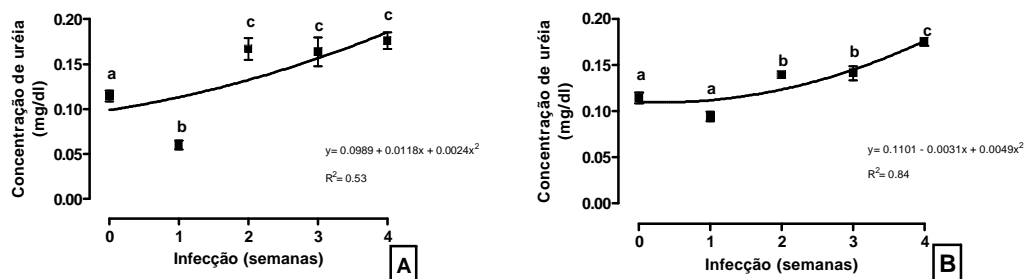
**Figura 3.** Relação entre a concentração de proteínas totais, expresso em g/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP).

A infecção de *B. glabrata* com 5 ou 50 miracídeos de *E. paraensei* causou alterações no metabolismo de excreção dos produtos nitrogenados dos moluscos, com aumento nas concentrações de ácido úrico e uréia na hemolinfa destes animais durante o curso da infecção. Apesar do discreto aumento observado, uma fraca correlação foi obtida ( $r^2=0,53$  e  $r^2=0,84$ ) para as concentrações de uréia nas *B. glabrata* infectadas com 5 ou 50 miracídeos, respectivamente, e  $r^2=0,74$  e  $r^2=0,66$  para a concentração de ácido úrico na hemolinfa de *B. glabrata* infectadas com 5 ou 50 miracídeos, respectivamente. Um decréscimo de 47,64% ( $0,060\pm0,008$  mg/dl) e 77,37% ( $2,273\pm0,293$  mg/dl) foi observado na concentração de uréia e de ácido úrico, respectivamente, na hemolinfa de *B. glabrata* infectadas com 5 miracídeos quando comparado com o grupo controle ( $0,114\pm0,011$  mg/dl e  $10,048\pm0,201$  mg/dl, respectivamente) no final da primeira semana de infecção (Fig. 4a e 5a). Relação similar foi observada para moluscos infectados com 50 miracídeos (Fig. 4b e 5b). Os resultados do grupo controle (0 semana de infecção) não alterou durante as 4 semanas analisadas, por esta razão eles foram agrupados e expressos como média (Figs. 1, 2, 3, 4 e 5).



**Figura 4.** Relação entre a concentração de ácido úrico, expresso em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP).





**Figura 5.** Relação entre a concentração de uréia, expresso em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP).

## 6.4 DISCUSSÃO

Um dos aspectos mais importantes do presente estudo é a verificação do curso da infecção com diferentes doses miracidiais de *E. paraensei* nos padrões metabólicos do molusco hospedeiro, *B. glabrata*. Ultimamente, esta é uma continuação de estudos desenvolvidos que enfocam alguns mecanismos associados com a resposta de *B. glabrata* a diferentes doses miracidiais, fornecendo dessa maneira, a primeira descrição de alterações metabólicas em moluscos infectados por diferentes doses miracidiais de *E. paraensei*.

Muitos estudos têm constatado alterações no metabolismo de moluscos infectados por larvas de trematódeos, particularmente nas concentrações de carboidratos. A interação entre o hospedeiro intermediário e helmintos causa um estado de hipometabolismo no molusco hospedeiro, que acaba utilizando de suas reservas para manter suas funções vitais, bem como atender às necessidades energéticas das larvas durante os seus estágios de desenvolvimento. Deste modo, estas alterações levam a um balanço energético negativo, caracterizado pelo consumo de glicogênio da glândula digestiva e massa cefalopodia, e depósitos de galactogênio na glândula de albúmen (PINHEIRO; AMATO, 1994). Nestas circunstâncias, moluscos infectados começam a utilizar fontes não glicídicas para sua sobrevivência e reprodução, culminando em muitas alterações fisiológicas (PINHEIRO et al., 2009) e um processo de compensação na fecundidade como observado no modelo *E. paraensei* /*B. glabrata* (TUNHOLI et al., 2011).

O decréscimo na concentração de proteínas totais na hemolinfa de moluscos parasitados sugere à utilização das estruturas de carbono obtidas a partir de aminoácidos gliconeogênicos, pois como referido anteriormente, alterações no metabolismo de carboidratos têm sido observadas em moluscos sob condição de estresse fisiológico, especialmente causado na infecção por larvas de trematódeos (PINHEIRO; AMATO, 1994; LUSTRINO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, o decréscimo na concentração de proteínas totais na hemolinfa dos organismos infectados parece estar relacionado à utilização de proteínas pelas larvas do trematódeo, que se encontram localizadas no interior do molusco durante seus estágios de desenvolvimento, uma vez que uma relação entre a quantidade de larvas a qual moluscos foram experimentalmente expostos e os níveis de proteína total na hemolinfa foi verificada, com uma redução de 63,25% nos moluscos infectados com 50 miracídeos após a quarta semana de infecção em relação ao exposto a cinco miracídeos. Resultado semelhante foi observado por Pinheiro e Amato (1994), utilizando como modelo *Bradybaena similaris*

(Férussac, 1821) infectadas com larvas de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) Looss, 1907. Estes autores sugerem que os esporocistos localizados à superfície externa da glândula digestiva dos hospedeiros são banhados pela hemolinfa, podendo remover diretamente os monômeros de glicose para a manutenção de seus intensos processos metabólicos que ocorrem durante o desenvolvimento larval do trematódeo. Portanto, é possível que ocorra situação semelhante, caracterizada pela absorção de aminoácidos a partir de proteínas pelos estágios larvais de *E. paraensei*.

Moluscos de água doce apresentam padrão de excreção tipicamente uricotelico, uma vez que a disponibilidade de água permite que o ácido úrico seja facilmente depurado (BECKER, 1980). Porém, alterações no padrão excretor são observadas em moluscos expostos a situações adversas, tais como infecção por larvas de trematódeos (BECKER; SCHMALE, 1975; de SOUZA et al. 2000).

Aumentos significativos no conteúdo de uréia na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com 5 e 50 miracídios de *E. paraensei* foram observados, com as maiores concentrações obtidas na quarta semana de infecção. Relação similar foi também observada sobre os conteúdos de ácido úrico no mesmo sítio. Isto sugere que os parasitos sejam capazes de estimular o molusco hospedeiro em alterar as vias de formação de produtos nitrogenados de excreção durante o curso da infecção. Provavelmente, o aumento nas concentrações dos produtos nitrogenados resulte a partir do aumento do catabolismo protéico provocado pela necessidade energética do hospedeiro. Em consequência disso, os aminoácidos são desaminados e direcionados para a síntese de glicose, com acumulação de produtos nitrogenados detoxificados através da formação de ácido úrico e uréia, aumentando suas concentrações na hemolinfa de moluscos parasitados (BECKER; SCHMALE, 1975; de SOUZA et al., 2000).

Apesar dos níveis de uréia e ácido úrico estarem aumentados na infecção de *B. glabrata* por *E. paraensei*, o mesmo não foi observado na primeira semana de infecção quando ocorreu diminuição nas concentrações de uréia e ácido úrico em ambas condições de exposição, ou seja, 5 e 50 miracídios. Thompson et al. (1991) também observaram menores níveis de uréia em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*, o que corrobora os resultados observados no presente estudo. Da mesma forma, no modelo *B. similis/E. coelomaticum*, de Souza et al. (2000) relataram uma marcada redução nos conteúdos de uréia na hemolinfa dos moluscos a partir de 30 até 40 dias após infecção, apesar de tratarem-se de moluscos terrestres. Este fato sugere que no início da infecção os moluscos utilizam mecanismos fisiológicos compensatórios ao processo de formação de excretas nitrogenadas, exibindo outros mecanismos predominantes de excreção, os quais já foram postulados para a espécie *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (HIONG et al., 2005).

Os aumentos crescentes nas atividades de ambas as aminotransferases analisadas são em linha acompanhadas com o decréscimo nos níveis de proteínas e o aumento das concentrações de uréia e ácido úrico. Isto provavelmente está relacionado à maior atividade da gliconeogênese, com o maior consumo de estruturas de carbono dos aminoácidos, redução dos conteúdos de proteínas totais, e acumulação de produtos nitrogenados de excreção. AST e ALT são enzimas chaves relacionadas com o metabolismo de aminoácidos, pois relacionam os aminoácidos às vias metabólicas envolvidas na geração de energia, em particular o ciclo de Krebs. O aumento na atividade dessas enzimas pode caracterizar elevação da demanda energética, resultando na mobilização de fontes energéticas potenciais, incluindo aminoácidos (MASOLA et al., 2008; PINHEIRO et al., 2001).

Os aumentos da AST e ALT são mais pronunciados no final do período de infecção estudado quando ocorre à presença de rédias. Estes estágios larvais são capazes de causar danos aos tecidos devido à presença de uma abertura oral, que lhes permitem ingerir fragmentos dos tecidos do hospedeiro (PINHEIRO et al., 2004a). As aminotransferases têm

sido sugeridas como parâmetros válidos na mensuração de injúria tecidual, especialmente da glândula digestiva, um órgão similar ao fígado, onde carboidratos são armazenados, proteínas são recicladas e produtos nitrogenados de excreção são formados (BLASCO; PUPO, 1999; PINHEIRO et al., 2001).

Os resultados observados neste estudo indicam que a infecção com cinco ou 50 miracídios de *E. paraensei* provoca consideráveis alterações metabólicas em *B. glabrata*, principalmente na glândula digestiva, pois este é o sítio de várias rotas metabólicas e pelo contato físico de alguns estágios larvais que são hospedados neste órgão, como mostrado por Pinheiro et al. (2004a). Finalmente, a infecção com 50 miracídios causou maiores danos ao molusco hospedeiro, como mostrado por meio do aumento na atividade da AST e consumo de proteína, quando comparados com os moluscos infectados com cinco miracídios de *E. paraensei*.

## 6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDSTRA, S. R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, p.414-418, 2006.

BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.63, p.101-111, 1980.

BECKER, W.; SCHMALE, H. The nitrogenous products of degradation – ammonia, urea and uric acid – in the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.51A, p.407-411, 1975.

BISHOP, M. L.; DUBEN-ENGELKIRK, J. L.; FODY, E. P. Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations. (third ed.) Lippincott, Filadélfia, 1996.

CONNERTY, H. V.; BRIGGS, A. R.; EATEN, E. H. Determination of blood urea nitrogen using a simple stabilizing reagent. **American Journal of Clinical Pathology**, v.25, p.1321, 1955.

de SOUZA, R. M.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M.; PINHEIRO, J. The Influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.365-371, 2000.

FRIED, B.; GRACZYK, T. K.; TAMANG, L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. **Parasitology Research**, v.93, p.159-170, 2004.

HIONG, K. C.; LOONG, A. M.; CHEW, S. F.; IP, Y. K. Increases in urea synthesis and the ornithine-urea cycle capacity in the giant African snail, *Achatina fulica*, during fasting or aestivation, or after the injection with ammonium chloride. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, v.303, p.1040-1053, 2005.

KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. Clinical Chemistry (Third ed.) Mosby, St. Louis, 1996.

- LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; BESSA, E. C. A.; PINHEIRO, J. *Allamanda cathartica* (Apocynaceae) seeds induces changes on carbohydrates deposits of *Bradybaena similaris* (Mollusca, Bradybaenidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.10, p.23-27, 2008.
- MALDONADO JR, A.; GENTILE, R.; FERNANDES, C. M.; D'ANDREA, P. S.; LANFREDI, R. M.; REY, L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v.80, p.369-375, 2006.
- MALDONADO, A. JR.; COURA, R.; GARCIA, J. G.; LANFREDI, R. M.; REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontidae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.193–198, 2001b.
- MALDONADO, A. JR.; LOKER, E. S.; MORGAN, J. A. T.; REY, L.; LANFREDI, R. M. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitology Research**, v.88, p.40–848, 2001a.
- MASOLA, B.; CHIBI, M.; KANDARE, E.; NAIK, Y. S.; ZARANYIKA, M. F. Potential marker enzymes and metal-metal interactions in *Helisoma duryi* and *Lymnaea natalensis* exposed to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.70, p.79-87, 2008.
- OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J. The population density effects on the reproductive biology of the snail *Bradybaena similaris* (Mollusca, Gastropoda). **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.631-637, 2008.
- PEREZ, M. K.; FRIED, B.; SHERMA, J. High performance thin-layer chromatographic analysis of sugars in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) infected with *Echinostoma caproni* (Trematoda). **Journal of Parasitology**, v.80, p.336-338, 1994.
- PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthynchidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.407- 410, 1994.
- PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum*: influence of the infection on the reproduction and nucleic acids contents in the albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similaris*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.635-638, 1995.
- PINHEIRO, J.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M. Aminotranferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* under starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.1161-1164, 2001.
- PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Ultrastructure of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.97, p.367-372, 2005.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitology Research**, v.93, p.171-177, 2004a.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; LANFREDI, R. M. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, v.121, p.265-275, 2004b.

SLUITERS, J. F.; BRUSSAARD-WUST, C. C. M.; MEULEMAN, E. A. The relationship between miracidial dose, production of cercariae, and reproductive activity of the host in the combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.63, p.13-26, 1980.

THOMPSON, S. N.; MEJIA-SCALES, V.; BORCHARDT, D. B. Physiologic studies of snail-schistosome interactions and potential for improvement of in vitro culture of schistosomes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.27A, p.497-504, 1991.

VASQUEZ, R. E.; SULLIVAN, J. T. Effect of miracidial dose on adoptively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**, v.87, p.460-462, 2001.

WEICHSELBAUM, C. T. E. An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, v.16, p.40-49, 1946.

## 7 CAPÍTULO IV

### **NÍVEIS LIPÍDICOS EM *Biomphalaria glabrata* INFECTADAS COM DIFERENTES DOSES MIRACIDIAIS DE *Echinostoma paraensei***

NÍVEIS LIPÍDICOS EM *Biomphalaria glabrata* INFECTADAS COM DIFERENTES  
DOSES MIRACIDIAIS DE *Echinostoma paraensei*

**RESUMO**

Foram avaliados os conteúdos de colesterol e triglicerídeos circulantes na hemolinfa e de lipídeos neutros no complexo glândula digestiva-gônada (DGG) de *Biomphalaria glabrata* após exposição experimental a 5 e 50 miracidídeos de *Echinostoma paraensei*. Os moluscos foram dissecados uma, duas, três e quatro semanas pós-infecção para a coleta da hemolinfa e tecidos para mensurar os níveis de colesterol e triglicerídeos na hemolinfa e lipídeos neutros no tecido. Em relação aos conteúdos hemolinfáticos, os resultados demonstraram uma ordem de variação similar para ambos os substratos testados, com menores valores registrados na primeira semana de infecção. A diminuição do conteúdo destes lipídeos nos moluscos infectados indica intensa utilização destes substratos tanto pelo hospedeiro intermediário quanto pelo parasito, sugerindo sua provável participação no metabolismo energético e construção estrutural das larvas em desenvolvimento. O perfil de lipídeos neutros no DGG apresentou alterações, indicando que neste modelo, o metabolismo de lipídeos é dependente da dose miracidial usada.

**Palavras-chaves:** Lipídeos, Relação parasito-hospedeiro, *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*.

## ABSTRACT

The effect of experimental exposure of *Biomphalaria glabrata* to different doses (5 and 50) of *Echinostoma paraense* miracidia on the total levels of cholesterol and triglycerides circulating in the hemolymph and the neutral lipids in the digestive gland–gonad (DGG) complex were studied. The snails were dissected one, two, three and four weeks after infection to collect the hemolymph and DGG tissue, to measure the levels of cholesterol and triglycerides in the hemolymph and neutral lipids in the tissue. The results for the hemolymph showed a similar order of variation for both substrates tested in the first week after infection. The reduced levels of these lipids in the infected snails indicate intense use of these substrates both by the intermediate host and the parasite, suggesting its probable participation in the energy metabolism and structural construction of the developing larval stages. Alterations in the profile of neutral lipids in the DGG were also found. The results obtained indicate that in this model, the lipid metabolism depends on the miracidial dose used.

**Keywords:** Lipids, Host–parasite relationship, *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraense*.



## 7.1 INTRODUÇÃO

Alterações no metabolismo lipídico de moluscos em resposta a condições de jejum, estivação, fotoperíodo, tipo de dieta e infecção por diferentes tipos de trematódeos, especialmente *Echinostoma* spp. vem sendo investigadas (FRIED et al., 1989, 2001; LISTRINO et al., 2010). Entretanto, efeitos patobioquímicos de larvas de trematódeos sobre o metabolismo lipídico do hospedeiro são frequentemente contraditórios. Por exemplo, Fried et al. (1989) e Bandstra et al. (2006) verificaram decréscimo significativo da fração de triacilglicerol no complexo glândula digestiva-gônada (DGG) de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infectada com *E. caproni* (Richard, 1964). Paradoxalmente, Fried et al. (1990) observaram o aumento nos níveis de triacilglicerol no DGG de *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) infectada por *E. trivolvis* (Cort, 1914). Mais tarde, Fried et al. (2001) constataram que a dieta rica em lipídeos era capaz de alterar o conteúdo de esteróides livres, mas não de triacilglicerol no DGG de *B. glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). Os resultados destes estudos demonstram que esta mobilização depende de vários fatores, tais como dieta, espécies do parasito, espécies do hospedeiro e as condições as quais eles são submetidos. Adicionalmente, Bandstra et al. (2006) sugerem que estas discrepâncias possam ser respondidas, pelo menos em parte, através do uso de diferentes doses miracidiais, uma vez que diferentes respostas tem sido observadas na função reprodutiva, desenvolvimento larval e alterações metabólicas em moluscos infectados com diferentes doses miracidiais (MASSOUD, 1974; THÉRON et al., 1992; TUNHOLI et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da infecção por diferentes doses miracidiais (5 e 50) de *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) sobre o perfil de lipídeos neutros no DGG de *B. glabrata* durante quatro semanas de infecção que corresponde o período pré-patente deste parasito (LIE; BASCH, 1967). Em adição, os conteúdos de colesterol livre e triacilglicerol foram mensurados na hemolinfa dos moluscos infectados e não infectados, uma vez que estudos prévios têm demonstrado alterações mais significativas nos conteúdos destas moléculas nos tecidos de *B. glabrata* em diferentes protocolos de infecção (MULLER et al., 2000; BANDSTRA et al., 2006). Portanto, tentar explicar a causa das diferenças entre os estudos citados acima, utilizando pelo menos um possível fator, a dose miracidial, bem como, possibilitar melhor compreensão deste sistema de interação ainda tão pobremente conhecido (PINHEIRO et al., 2009) são também as propostas deste estudo.

## 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1 Obtenções de miracídeos de *Echinostoma paraensei*

Hamsters *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839) nascidos em laboratório, com quatro semanas de idade, foram experimentalmente infectados por via gástrica com 50 metacercárias de *E. paraensei*. Após quatro semanas de infecção, os hamsters foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> (de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais, CEUA L-074/08) e necropsiados para obtenção dos vermes adultos de *E. paraensei*. Os helmintos adultos coletados do intestino delgado tiveram o útero rasgado para liberação dos ovos. Esses foram então incubados em água destilada e mantidos em estufa B.O.D. a 26 °C por 14 dias. Após este período, os ovos foram expostos à luz de lâmpada incandescente (100W, 127V) para estimular a eclosão dos miracídeos (PINHEIRO et al., 2004a,b, 2005, 2009).

### **7.2.2 Infecções experimentais de *Biomphalaria glabrata* (isolado Sumidouro, RJ.) e formação dos grupos**

Os espécimes foram obtidos a partir da criação mantida no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Fundação Instituto Oswaldo, RJ, Brasil. Os moluscos foram mantidos em aquários de vidro de 2L (10 espécimes/aquário) e alimentados em dias alternados com alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum* por uma semana visando à adaptação às condições da experimentação. Três grupos de 40 moluscos foram formados: controle, não exposto aos miracídeos; expostos a 5 miracídeos e expostos a 50 miracídeos por 24 horas (TUNHOLI et al., 2011). Posteriormente, estes moluscos foram transferidos e mantidos como descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Semanalmente pós-infecção, dez espécimes de cada grupo foram dissecados para coleta do DGG e hemolinfa. Os espécimes de *B. glabrata* utilizados neste experimento apresentavam diâmetro de concha entre 8 e 12 mm. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo durante as dissecações e posteriormente mantidas a -10°C até a utilização para análises bioquímicas.

### **7.2.3 Determinações das concentrações de triacilglicerol e colesterol na hemolinfa**

Análises espectrofotométricas foram utilizadas para determinar quantitativamente os conteúdos hemolinfáticos de triacilglicerol (TAG) e colesterol (CHO), uma vez que este método é prático e tem sido validado na quantificação destas e outras moléculas (LUSTRINO et al., 2010; PINHEIRO et al., 2009).

Para a determinação do TAG, 10 µl de hemolinfa foram misturados com 1 ml da solução contendo 50mmol/L de piperasine-*N,N'*-bis (2-etanosulfônico ácido) (PIPES) [pH 7,4], 1,25mmol de 4-clorofenol, 4.600U de lipase, 40U glicerolquinase, 125U de glicerolfosfato oxidase, 60U de peroxidase, 0,024mmol de ATP e 0,018mmol de 4-aminoantipirina. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C em banho maria por 10 min. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro em 510nm (KAPLAN; PEASCE, 1987). Os resultados foram expressos como mg/dl.

Para dosagem de CHO, 10µl de hemolinfa foram misturadas com 1 ml do reagente de cor (tampão de PIPES 35mmol/L [pH 7,0] contendo 0,5mmol/L de colato de sódio, 0,5mmol/L de 4-aminoantipirina, colesterol esterase  $\geq$  300U, colesterol oxidase  $\geq$  204U e peroxidase  $\geq$  828U). A solução resultante foi então homogeneizada e incubada a 37°C por 10 min. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro em 500nm (KAPLAN; PEASCE, 1987). Os resultados foram expressos como mg/dl.

### **7.2.4 Cromatografia em camada fina monodimensional e análise de imagem**

Para a análise dos diferentes lipídeos neutros nos tecidos dos moluscos, TLC foi utilizada como metodologia padrão, devido sua habilidade de verificar vários tipos de lipídeos concomitantemente. Além disto, esta metodologia tem sido usada em outros estudos relacionados com alterações de lipídeos neutros no DGG de moluscos, como discutidas aqui (BANDSTRA et al., 2006; FRIED et al., 1998, 2001).

Cinquenta miligramas dos tecidos (DGG) de cada grupo foram macerados em 100 µl de tampão de lise (TRIS 50 mM; EDTA 5 mM; Nonidet P-40 1%; TLCK 0,1 mM; PMSF 2 mM). Após a maceração, os homogeneizados foram centrifugados a 2520xg por 3 min. O conteúdo de proteína nas frações sobrenadantes foi determinado de acordo com Lowry com modificação (MARKWELL et al., 1978), usando albumina bovina como padrão. As amostras contendo 300 µg de proteína total foram submetidas à extração de lipídeos, conforme descrito por Bligh e Dyer (1959). Os lipídeos extraídos foram analisados por cromatografia em camada fina monodimensional (TLC) para lipídeos neutros utilizando hexano, éter etílico e

ácido acético (60:40:1 por volume) como eluentes (KAWOYYA; LAW, 1988). Os lipídeos neutros utilizados como padrão foram CHO, colesterol esterificado (CHOE), TAG e ácidos graxos (AG). Ambos os padrões (20 µg de cada) e os extratos das amostras foram aplicados em placa de sílica. Lipídeos na placa foram carbonizados por imersão da chapa em 10% sulfato de cobre (w / v) e 8% de ácido fosfórico (v / v). Depois de secos, a chapa foi aquecida a 150° C por 10 min (RUIZ; OCHOA, 1997). A imagem foi analisada pelo software Image Quant.

Os tecidos (DGG) de moluscos não infectados coletados no final de cada semana foram agrupados formando um poll. Assim, a média do resultado obtido poderia melhor expressar a variação observada nos grupos infectados durante as quatro semanas de infecção.

### 7.2.5 Análises Histológicas

Moluscos de cada período de infecção foram dissecados e transferidos para o fixador Duboscq-Brasil (FERNANDES, 1949). Os tecidos moles foram processados de acordo com as técnicas histológicas de rotinas (HUMASON, 1979). As secções (5 µm) foram coradas usando hematoxilina e eosina e observadas com microscópio de luz Zeiss Axioplan; imagens foram capturadas com uma câmara digital MRC5 AxioCam e processadas com o software Axiovision.

### 7.2.6 Análises estatísticas

Os resultados obtidos dos ensaios para a determinação das concentrações de CHO e TAG na hemolinfa foram expressos como média ± desvio padrão e o teste de Tukey/ANOVA foram utilizados para a comparação das médias. A regressão polinomial foi aplicada para análise da relação entre os valores obtidos e o tempo de infecção, bem como a carga parasitária às quais os moluscos foram expostos ( $P>0,05$ ) (InStat, GraphPad, v.5.00, Prism). Os valores para os conteúdos de TAG e CHO na hemolinfa dos moluscos não infectados foram expressos como média, representada por semana zero (0), visto que não existe diferença significativa entre eles no final de cada semana. Os resultados referentes à cromatografia foram expressos como valores percentuais em relação ao grupo controle, não infectado, também representado como zero (0) semana de infecção.

## 7.3 RESULTADOS

A infecção em *B. glabrata* por *E. paraensei* provocou alteração nos níveis hemolinfáticos de CHO nos moluscos, com relação positiva entre a concentração de CHO nos moluscos expostos tanto por 5 ( $r^2=0,69$ ) como por 50 ( $r^2=0,46$ ) miracídios e o tempo de infecção. Quando os moluscos foram expostos a 5 miracídios houve um decréscimo de 68,65% e de 48,09% nos conteúdos de CHO na hemolinfa nas duas primeiras semanas pós-infecção ( $0,32\pm 0,04$  e  $0,53\pm 0,03$ mg/dl, respectivamente), em relação a média do grupo controle ( $1,02\pm 0,08$  mg/dl), porém a partir da terceira semana ( $0,91\pm 0,02$ mg/dl) de infecção houve aumento, o qual diferiu estatisticamente das duas semanas anteriores. Do mesmo modo, para os moluscos expostos a dose de 50 miracídios as análises apontaram redução nas concentrações de CHO na hemolinfa, nas duas primeiras semanas de infecção ( $0,50\pm 0,052$  e  $0,71\pm 0,05$ mg/dl, respectivamente), elevando seus níveis a partir da terceira semana de estudo ( $0,85\pm 0,04$ mg/dl) (Tabela 1).

Alterações na concentração de TAG na hemolinfa de *B. glabrata* infectadas também foram observadas. O menor e o maior valores foram obtidos, respectivamente, na primeira ( $0,27\pm 0,06$ mg/dl) e quarta ( $0,89\pm 0,00$ mg/dl) semanas pós-infecção para moluscos expostos a 5 miracídios em relação ao grupo controle ( $2,22\pm 0,22$ mg/dl). Moluscos expostos a 50

miracídios também apresentaram alterações nos níveis de TAG na hemolinfa. O menor valor foi observado na primeira semana de infecção ( $0,38\pm 0,04$ mg/dl) e o maior valor verificado já na terceira semana de infecção ( $0,84\pm 0,03$ ). O teste de regressão polinomial revelou fraca relação positiva entre os conteúdos de TAG e o tempo de infecção nos grupos submetidos tanto a dose de 5 ( $r^2=0,78$ ) quanto de 50 ( $r^2=0,74$ ) miracídios (Tabela 1).

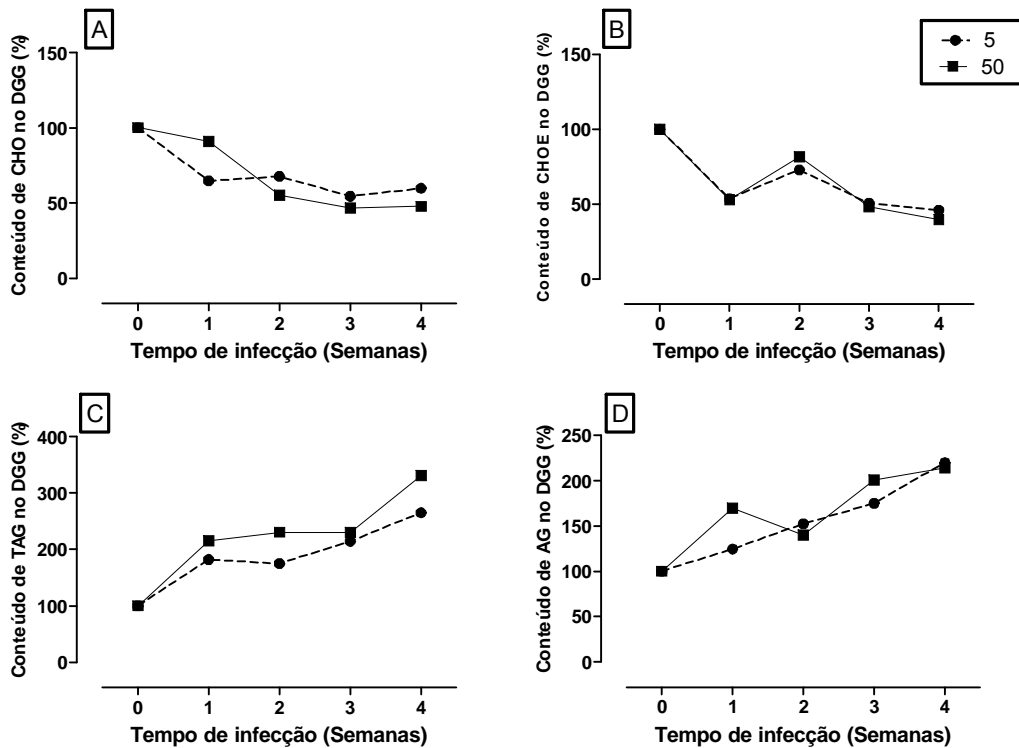
Moluscos expostos a 5 miracídios, apresentaram queda nos conteúdos de CHO no complexo DGG quando comparado ao grupo controle, sendo os menores valores registrados nos períodos mais tardios da infecção (3 e 4 semanas) caracterizado por um decréscimo de 45,47% e 40,2%, respectivamente (Figura 1A). A mesma ordem de variação foi observada no grupo exposto a 50 miracídios, apresentando uma redução de 53,45% e 52,13% nos mesmos períodos. Da mesma forma, grupos infectados, demonstraram redução nos conteúdos de CHO no DGG, sendo esta mais pronunciada na terceira e quarta semanas pós-infecção (Figura 1B).

Paradoxalmente, os conteúdos de TAG no DGG foram aumentados nos grupos infectados por 5 e 50 miracídios desde a primeira semana de infecção, alcançando valores de 264,83% e 331%, respectivamente, em relação ao grupo controle, na quarta semana de infecção (Figura 1C). Em relação aos níveis de AG no DGG, foi observado aumento gradativo do seu conteúdo com o avançar da infecção, sendo os maiores valores (220 % e 214,48%) registrados na quarta semana de infecção para 5 e 50 miracídios, respectivamente em relação ao grupo controle (Figura 1D).

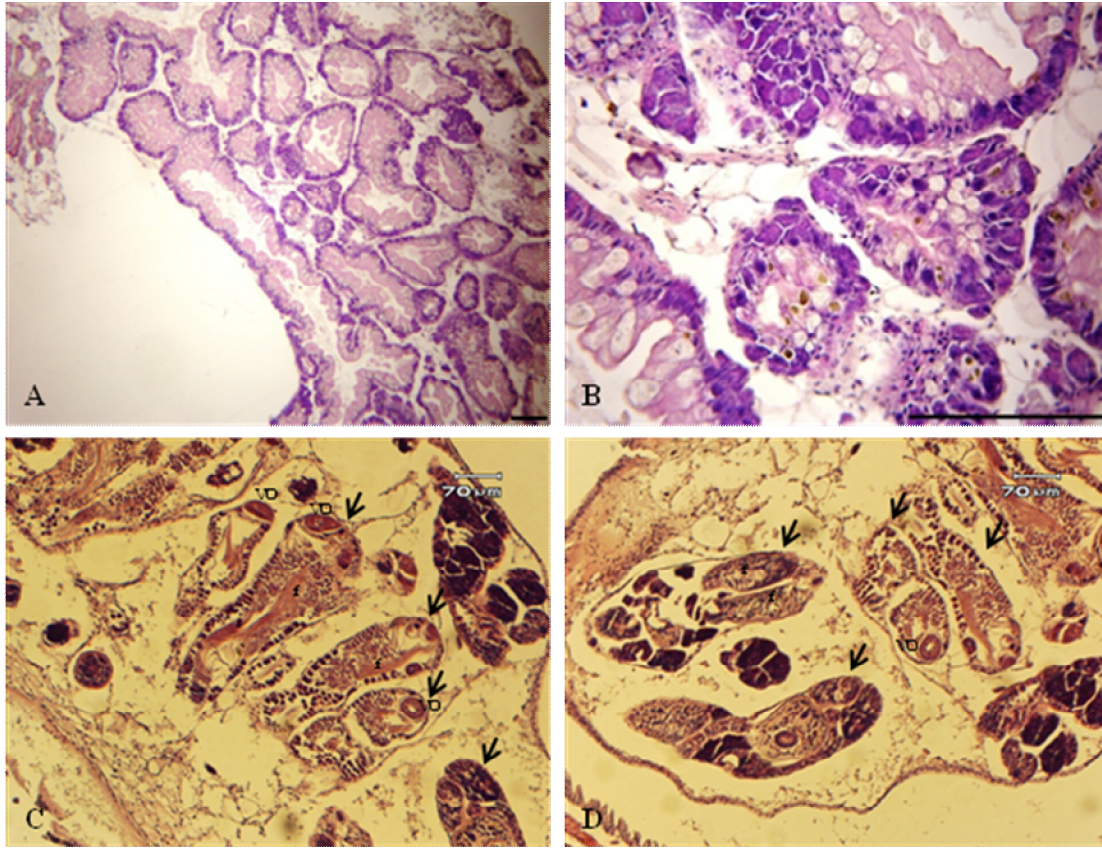
As análises histológicas demonstraram significativas alterações nos tecidos da glândula digestiva de moluscos infectados por ambas as doses miracidiais (5 e 50), caracterizadas principalmente por uma intensa desorganização celular decorridas pela presença de estágios de rédias de *E. paraensei*, quando comparados com aqueles não infectados (Figura 2 a, b, c, d).

**Tabela 1-** Variação nos conteúdos médios de colesterol e triglicerídeos na hemolinfa (mg/dl) de *Biomphalaria glabrata* infectadas com 5 e 50 miracídios de *Echinostoma paraensei*, em função do tempo de infecção, expressos em semanas. A semana zero (0) é demonstrada como a média do grupo controle, uma vez que não houve diferença significativa entre estes ao longo das quatro semanas de análises. <sup>a, b, c</sup> = Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si,  $P<0.05$ , (média±SD=média±desvio-padrão).

Semanas	Colesterol (mg/dl)		Triacilglicerol (mg/dl)	
	5	50	5	50
0	1,01285±0,0863 <sup>a</sup>		2,2233±0,22500 <sup>a</sup>	
1	0,32000±0,0400 <sup>b</sup>	0,5000±0,0529 <sup>b</sup>	0,2733±0,0611 <sup>b</sup>	0,380±0,0400 <sup>b</sup>
2	0,53670±0,0351 <sup>c</sup>	0,7180±0,0507 <sup>c</sup>	0,5200±0,0230 <sup>b,c</sup>	0,6133±0,0305 <sup>b,c</sup>
3	0,91400±0,0206 <sup>d</sup>	0,8533±0,0416 <sup>c,d</sup>	0,6875±0,0270 <sup>c,d</sup>	0,8488±0,0395 <sup>c</sup>
4	1,07800±0,0268 <sup>a</sup>	0,8768±0,0178 <sup>a,d</sup>	0,8978±0,0079 <sup>d</sup>	0,8380±0,0086 <sup>c</sup>
r <sup>2</sup>	+ 0,69	+ 0,46	+ 0,78	+ 0,74



**Figura 1.** Conteúdo percentual médio de lipídeos neutros no complexo glândula digestiva-gônadas (DGG) de *Biomphalaria glabrata* infectada por 5 (●) e 50 (■) mirácídios de *Echinostoma paraensei* em função do tempo de infecção, expresso em semanas. 0 (zero) semana representa a média obtida do grupo controle ao longo das quatro semanas de análises. (A) Conteúdo de colesterol (CHO); (B) Conteúdo de colesterol esterificado (CHOE); (C) conteúdo de triacilglicerol (TAG) e (D) Conteúdo de ácidos graxos (AG). Todos os valores foram expressos como porcentagem do grupo controle.



**Figura 2.** Corte histológico da glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata* corado por hematoxilina-eosina. **A e B** - Seção de moluscos não infectados mostrando a região da glândula digestiva funcional. Barra de escala = 50 μm. **C e D**- Corte histológico da região da glândula digestiva de moluscos experimentalmente infectados com 5 e 50 miracídios, respectivamente de *Echinostoma paraensei* exibindo uma região caracterizada por intensa desorganização celular decorrida em função da presença de estágios de rédias (↑), demonstrando ventosa oral (vo) e faringe musculosa (f). Barra de escala = 70 μm. A diferença na coloração é devido a utilização de diferentes filtros.

## 7.4 DISCUSSÃO

Os conteúdos hemolinfáticos de TAG nos dois grupos tratados foram significativamente reduzidos em relação ao grupo controle, durante todo o período de infecção, sugerindo a utilização de tal substrato como fonte energética para os estágios larvais em desenvolvimento, principalmente nas primeiras semanas de infecção, já que corresponde o período de maior taxa de multiplicação assexuada das larvas do parasito (miracídios-esporocistos-rédias), necessitando de maior demanda energética, bem como de grande quantidade de blocos de construção para a síntese de novas estruturas nas larvas em formação, onde os lipídeos são amplamente recrutados para a construção de novas membranas celulares, por exemplo (PINHEIRO et al., 2004a,b, 2005). A provável capacidade de utilização de lipídeos como fonte energética pelo parasito vem sendo postulada por alguns autores. Erasmus (1972) identificou em trematódeos, a presença de enzimas relacionadas com o processo de metabolização lipídica, especialmente lipases e esterases não específicas. Resultados similares

foram obtidos por Humiczewska e Rajski (2005), no qual identificaram a expressão de lipases em todos os estágios larvais de *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758). Assim, TAG são inicialmente hidrolisados culminando com a formação de AG livres para serem oxidados em seguida na matriz mitocondrial (TRIPATHI; SINGH, 2002).

Fried *et al.* (1993) observaram o efeito da infecção por larvas de trematódeos digenéticos sobre a composição de AG no DGG do hospedeiro intermediário. A partir dos resultados deste estudo, é possível supor que o aumento dos níveis desses lipídeos no DGG em relação ao grupo controle possa ser explicado como causa da mobilização direta de lipídeos neutros armazenados principalmente na forma de TAG, como substrato ao processo de oxidação mitocondrial para a formação de ATP a fim de atender as necessidades energéticas do parasito e hospedeiro (KLOBUCAR *et al.*, 1997).

O aumento nas concentrações de TAG observado no DGG de *B. glabrata* exposta à infecção por *E. paraensei* durante todo o período de análise corrobora com observações prévias demonstradas por Fried e Sherma (1990), trabalhando com a interface *H. trivolvis* / *E. trivolvis*, por Thompson (1987) e Muller *et al.* (2000), estudando a relação entre *B. glabrata* e *S. mansoni*. Estes resultados sugerem que, em certas espécies de trematódeos, as larvas induzem aumento na concentração de TGA no hospedeiro, seja através da secreção de lipídeos pelo parasito ou pela alteração no metabolismo do DGG do hospedeiro como consequência do parasitismo (FRIED *et al.*, 1998). Assim, tais observações ajudam a explicar as maiores concentrações desta fração nos grupos expostos a 50 miracídios, indicando que neste sistema, a resposta é dose dependente.

A queda dos níveis hemolinfáticos de colesterol em *B. glabrata* infectadas tanto com 5 quanto por 50 miracídios de *E. paraensei* nas duas primeiras semanas pós-infecção, sugere a participação deste lipídeo neutro na composição estrutural dos estágios larvais em desenvolvimento, visto que, durante esse período ocorre intensa atividade mitótica dos estágios de miracídios que se desenvolvem a esporocistos, repercutindo em maior taxa de formação celular e tecidual nas larvas do parasito. A participação de esteróis livres, especialmente colesterol, tem sido registrada como os principais componentes estruturais para os estágios larvais de trematódeos digenéticos (MARSIT *et al.*, 2000).

Os conteúdos de CHO e CHOE no DGG de *B. glabrata* se mostraram reduzidos nos organismos infectados quando comparados ao grupo controle. A presença de sucessivos estágios larvais de *E. paraensei* durante sua fase de desenvolvimento ontogenético no molusco hospedeiro resulta em severa desorganização tecidual neste sítio (DGG), levando conseqüentemente ao extravasamento de moléculas de CHO em função do processo de remodelagem celular. As menores concentrações destes substratos (CHO e CHOE) em ambos os grupos infectados foram verificadas na terceira e quarta semanas pós-infecção, período que coincide com a formação e amadurecimento de rédias (PINHEIRO *et al.*, 2005), estágio caracterizado pela presença de boca primitiva, faringe muscular e bem desenvolvida e intestino, o que possibilita as larvas alimentar-se diretamente de tecidos da glândula digestiva de *B. glabrata* (FRIED; HUFFMAN, 1996), culminando com lesões celulares mais severas. Em adição, quando os grupos infectados são comparados, parece claro que a capacidade de resposta do molusco frente à infecção está diretamente associada à dose miracidial, já que as menores concentrações de CHO no DGG foram observadas nos organismos com alta parasitemia, sugerindo maior dano durante esta relação.

Tais observações explicam o aumento dos conteúdos de CHO na hemolinfa registrados nos períodos mais tardios da infecção. Além disso, assumindo-se que moluscos apresentam a capacidade de sintetizar endogenamente CHO a partir de precursores já identificados, como o latosterol e desmosterol (ZHU *et al.*, 1994; LUSTRINO *et al.*, 2010), o aumento de CHO observado no presente trabalho, pode ainda ser justificado, como uma resposta fisiológica do molusco frente à lesão induzida pelos estágios de rédias.



No modelo *B. glabrata/E. paraensei* sugere-se que, primariamente ocorra a utilização de TAG como fonte energética tanto para o molusco quanto para o parasito. Já em relação ao CHO, este parece desempenhar predominantemente um papel na construção da estrutura celular e tecidual em ambos os organismos. Além disso, a dose miracidial teve efeito significativo no conteúdo dos lipídeos aqui estudados, sendo que alterações mais severas foram observadas nos moluscos infectados com 50 miracídios, no entanto o padrão de resposta foi similar em ambas as cargas, provavelmente devido o desenvolvimento ontogenético do parasito permanecer o mesmo. Este aspecto metabólico em função da dose miracidial usada pode ser explicado em decorrência da maior demanda energética, bem como dos maiores danos celulares induzidas pela elevada carga parasitária.

## 7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDSTRA, S. R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, p.414-418, 2006.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.37, p.911-913, 1959.
- ERASMUS, D. A. The Biology of Trematodes. Edward Arnold, London, 1972.
- FERNANDES, M. C. 1949. Métodos escolhidos de técnicas microscópicas, In: second ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, RJ.
- FRIED, B.; FRAZER, B. A.; LEE, M. S.; SHERMA, J. Thin layer chromatography and histochemistry analyses of neutral lipids in *Helisoma trivolvis* infected with four species of larval trematodes. **Parasitology Research**, v.84, p.369-373, 1998.
- FRIED, B.; HUFFMAN, J. E. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. **Advances in Parasitology**, v.38, p.311-368, 1996.
- FRIED, B.; MULLER, E. E.; BROADWAY, A.; SHERMA, J. Effects of diet on the development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* and on the neutral lipid content of the digestive gland-gonad complex of the snail. **The Journal of Parasitology**, v.87, p.223-225, 2001.
- FRIED, B.; SCHAFER, S.; KIM, S. Effects of *Echinostoma caproni* infection on the lipid-composition of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal for Parasitology**, v.19, p.353-354, 1989.
- FRIED, B.; SHERMA, J. Thin layer chromatography of lipids found in snails (Gastropoda: Mollusca). **Journal of Planar Chromatography**, v.3, p.290-299, 1990.
- HUMASON, G. L. 1979. Animal Tissue Techniques, 4th Ed. W.H. Freeman, San Francisco, USA.
- HUMICZEWSKA, M.; RAJSKI, K. Lipids in the host-parasite system: digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected the developmental stages of *Fasciola hepatica*. **Acta Parasitologica**, v.50, p.235-239, 2005.



- KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. *Clinical Chemistry*. Mosby, St. Louis. 1996.
- KAWOONYA, J. K.; LAW, J. H. Role of lipophorin in lipid transport to insect egg. **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.8748–8753, 1988.
- KLOBUCAR, G. I. V.; LAJTNER, J.; ERBEN, R. Lipids peroxidation and histopathological changes in the digestive gland of a freshwater snail *Planorbarius corneus* L (Gastropoda, Pulmonata) exposed to chronic and sub-chronic concentrations of PCP. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, p.128–134, 1997.
- LIE, K. J.; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **The Journal of Parasitology**, v.53, p.1192–1199, 1967.
- LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; MARASSI, M. P.; PINHEIRO, J. Lipids analysis in hemolymph of *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) exposed to different photoperiods. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, p.631–637, 2010.
- MARKWELL, M. A. K.; HAAS, S. M.; BIEBER, L. L.; TOLBERT, N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical Biochemistry**, v.87, p.206–210, 1978.
- MARSIT, C. J.; FRIED, B.; SHERMA, J. Neutral lipids in cercariae, encysted metacercariae, and rediae of *Echinostoma caproni*. **Journal of Helminthology**, v.74, p.365–367, 2000.
- MASSOUD, J. The effect of variation in miracidial exposure dose on laboratory infections of *Ornithobilharzia turkestanicum* in *Lymnaea gedrosiana*. **Journal of Helminthology**, v.48, p.139–144, 1974.
- MULLER, E. E.; FRIED, B.; SHERMA, J. HPTLC analysis of neutral lipids in *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Journal of Planar Chromatography**, v.13, p.228–231, 2000.
- PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Ultrastructure of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.97, p.367–372, 2005.
- PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R. M. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitology Research**, v.93, p.171–177, 2004a.
- PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; LANFREDI, R. M. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, v.121, p.265–275, 2004b.
- PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55–59, 2009.

RUIZ, J. I.; OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **The Journal of Lipid Research**, v.38, p.1482–1489, 1997.

THÉRON, A.; MONÉ, H.; GÉRARD, C. Spatial and energy compromise between host and parasite: the *Biomphalaria glabrata*–*Schistosoma mansoni* system. **International Journal for Parasitology**, v.22, p.91–94, 1992.

THOMPSON, S.N. Effect of *Schistosoma mansoni* on the gross lipids composition of its vector *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.87B, p.357–360, 1987.

TRIPATHI, P. K.; SINGH, A. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on carbohydrate metabolism of freshwater snail *Lymnaea acuminata*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.68, p.606–611, 2002.

TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; MELLO-SILVA, C. C. C.; MALDONADO JR., A.; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. 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.

ZHU, N.; DAI, X.; LIN, D. S.; CONNOR, W. E. The lipids of slugs and snails: evolution, feed and biosynthesis. **Lipids**, v.29, p.869–887, 1994.

## 8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A infecção por 5 e 50 miracídeos de *E. paraensei* em *B. glabrata* induziu um aumento na atividade reprodutiva de tal molusco, provavelmente como um mecanismo de estratégia ecológica do hospedeiro intermediário, a fim de promover a manutenção da espécie no ambiente.
- A infecção por *E. paraensei* induziu um aumento da calcemia em paralelo a hipocalcificação em seu hospedeiro intermediário, como uma resposta fisiológica do molusco na tentativa de manutenção do seu equilíbrio ácido-base.
- Uma redução gradativa nos conteúdos de proteínas totais na hemolinfa de moluscos infectados foi observada, sendo tal alteração mais severa nos moluscos com alta parasitemia quando comparado àqueles infectados com cinco miracídeos de *E. paraensei*.
- Valores crescentes das atividades das aminotransferases (ALT e AST) foram demonstrados em *B. glabrata* infectadas com *E. paraensei*, em decorrência ao aumento da demanda energética do hospedeiro intermediário, bem como em função da presença e migração dos estágios larvais do parasito nos tecidos do molusco, capazes de gerar danos celulares no mesmo.
- Ocorreu um aumento das concentrações hemolinfáticas de uréia e ácido úrico em *B. glabrata* infectadas com *E. paraensei*, como conseqüência ao processo de desaminação de aminoácidos.
- A infecção por 5 e 50 miracídeos de *E. paraensei* provocou significativa alteração no perfil lipídico dos moluscos infectados, como conseqüência ao aumento da demanda energética e do processo de remodelagem celular observados em *B. glabrata*.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Specificity and Immunobiology of Larval Digenean-Snail Association. In: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. **Advances in Trematode Biology**. 1 ed. New York: Springer, 1997. p. 229-263.
- ATAEV, G. L.; DOBROVOLKIJ, A. A.; AVANESSIAN, A. V.; LOKER, E. S. Germinal elements and their development in *Echinostomo caproni* and *Echinostoma paraensei* (Trematoda) miracidia. **Journal of Parasitology**, v.87, p.1160-1164, 2001.
- BAKRY, F. A. Effect of infection with *Shistosoma mansoni* on some biological parameters in *Biomphalaria alexandrina* snails. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v.4, n.3, p.180-190, 2009.
- BANDSTRA, S. R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High performance thin chromatografic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, n.4, p.414-418, 2006.
- BARÇANTE, T. A. **Aspectos do desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**. 2006. 151f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- BARKER, M. G. Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptative morphology. In: BARKER, M. G. **The biology of terrestrial mollusks**. CABI Publishing, New York, USA, 2001. p. 01-146.
- BARRETT, J.; SAGHIR, N. Lipid binding proteins in parasitic helminths. **Research and Reviews in Parasitology**, v.59, p.107-112, 1999.
- BAUDOIN, M. Host castration as a parasitic strategy. **Evolution**, v.29, p.335-352, 1975.
- BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.63, p.101-111, 1980.
- BECKER, W. Purine metabolism in *Biomphalaria glabrata* under starvation and infection with *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.76B, p.215-219, 1983.
- BESSA, E. C. A.; LIMA, W. S.; DAEMON, E.; CURY, M. C.; ARAÚJO, J. L. B. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, n.1, p.29-41, 2000.
- BRANDOLINI, S. P.; AMATO, S.; PEREIRA, A. A. Relationship of *Tanaisia bragai* (DIGENEA, EUCOTYLIDAE) and its intermediate host, *Subulina octona* (GASTROPODA, SUBULINIDAE) under experimental conditions. **Parasitología al día**, v.21, n.3-4, p.109-113, 1997.

- CARNEY, P. C. Echinostomiasis - A snail-borne intestinal trematode zoonoses. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.22, p.206-211, 1991.
- CARVALHO, O. S.; DUTRA, L. V.; MOURA, A. C. M.; FREITAS, C. C.; AMARAL, R. S.; DRUMMOND, S.C.; FREITAS, C. R.; SCHOLTE, R. G. C.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; MELO, G. R.; RAGONI, V.; GUERRA, M. 2005. Desenvolvimento de um sistema de informações para o estudo, planejamento e controle da esquistossomose no Estado de Minas Gerais. Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiania. São José dos Campos; INPE. Comunicações, p. 2083-2086. <http://www.dpi.inpe.br/geoschito/imagem/Mapas/BiomphalariaGlabrata.pdf>. 2005.
- CHAI, J. Y. Food-Borne Parasitic Zoonoses: Fish and Plant-Borne Parasites, World Class Parasites. In: CHAI, J. Y. **Intestinal flukes**. 1. ed. New York: Springer, 2007. p. 53-115.
- CHAI, J. Y.; DARWIN MURREL, K.; LYMBERG, A. J. Fish-borne parasitic zoonoses: status issues. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1233-1254, 2005.
- CHAI, J. Y.; LEE, S. H. Food-borne intestinal trematode infections in the Republic of Korea. **Parasitology International**, v.51, p.129-154, 2002.
- CHAI, J. Y.; LEE, S. H. Intestinal trematodes of human in Korea: *Metagonimus*, Heterophyids and Echinostomes. **Korea Journal of Parasitology**, v.28, p.103-122, 1990.
- CHARNIAUX-COTTON, H. 1960. Sex determination, p. 411-447. In T. H. Waterman (ed.), *The physiology of crustacea 1*. Academic Press, New York.
- CHENG, T. C.; LEE, F. O. Glucose levels in the mollusc *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, p.395-398, 1971.
- CHIRSTENSEN, N. O.; SIMONSEN, P. E.; ODAIBO, A. B.; MAHLER, H. Establishment, survival and fecundity in *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in hamsters and girds. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v.57, p.104-107, 1990.
- CHRISTIE, J. D.; MICHELSON, E. H. Transaminase levels in the digestive gland-gonad of *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.50B, n.2, p.233-236, 1975.
- COOPER, L. A.; RICHARDS, C. S.; LEWIS, F. A.; MINCHELLA, D. J. *Schistosoma mansoni* between low fecundity and reduced susceptibility to parasite infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.79, p.21-28, 1994.
- COUTO, M. S. R. 2001. Caracterização da atividade aglutinante da hemolinfa de mexilhões *Perna perna*. Trabalho de conclusão de Curso em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- CRIBB, T. H.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.997-1011, 2001.

- DAVIES, T. W. *Schistosoma mansoni*: the structure and elemental composition of pre-acetabular penetration gland cell secretion in pre-emergent cercariae. **Parasitology**, v.87, p.55-60, 1983.
- DAVIS, N. E. Storage and incubation of *Echinostoma revolutum* eggs recovered from wild *Branta canadensis*, and their infectivity to *Lymnaea tomentosa* snails. **Journal of Helminthology**, v.79, p.321-326, 2006.
- DAVIES, T. W.; ERASMUS, D. A. An ultrastructural study of the effect of parasitism by larval *Schistosoma mansoni* on the calcium reserves of host, *Biomphalaria globata*. **Cell and Tissue Research**, v.236, p.643-649, 1984.
- de JONG-BRINK, M. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts. **Advances Parasitology**, v.35, p.177-256, 1995.
- de JONG-BRINK, M.; ELSAADANY, M. M.; BOER, H. H. *Trichobilharzia ocellata*: interference with endocrine control of endocrine reproduction of *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v.65, p.92-100, 1988.
- DE WITH, N. D.; SMINIA, T. The effects of the nutritional state and the external concentration of the ionic composition of the haemolymph and on the calcium cells in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie von Wetenschappen**, v.83, p.213-227, 1980.
- DICTUS, W. J. A. G.; DE JONG-BRINK, M.; BOER, H. H. A neuropeptide (calfluxin) is involved in the regulation of the influx of calcium into mitochondria of the albumen gland of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.65, p.439-450, 1987.
- DILLON, R. T. The ecology of freshwater molluscs. Cambridge University Press, Cambridge, p.509, 2000.
- DIXON, B. R.; FLOHR, R. B. Fish and Shellfish-borne trematode infection in Canada. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.28, p.58-64, 1997.
- DOUGLAS, W. R.; HASKIN, H. H. Oyster-MSX interactions: alterations in hemolymph enzyme activities in *Crassostrea virginica* during the course of *Minchinia nelsoni* disease development. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.27, p.317-323, 1976.
- ESTEBAN, J. G.; MUÑOZ-ANTOLI, C. Echinostomes: Systematics and Life Cycles. In: FRIED, B.; TOLEDO, R. **The Biology of Echinostomes**. 1. ed. New York: Springer Science, 2009. p.1-34.
- FRIED, B. Infectivity, growth and development of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) in the domestic chick. **Journal of Helminthology**, v.58, p.241-244, 1984.
- FRIED, B.; DONOVICK, R. A.; EMILI, S. Infectivity, growth and development of *Echinostoma liei* (Trematoda) in the domestic chick. **International Journal for Parasitology**, v.18, p.413-414, 1988.

- FRIED, B.; HUFFMAN, J. E. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. **Advances in Parasitology**, v.38, p.311-368, 1996.
- FRIED, B.; NANNI, T. J.; REDDY, A.; FUJINO, T. Maintenance of the life cycle of *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) in dexamethasone-treated ICR mice and laboratory-raised *Helisoma trivolvis* (Gastropoda). **Parasitology Research**, v.83, p.16-19, 1997.
- FUJINO, T.; FRIED, B. *Echinostoma caproni* and *E. trivolvis* alter the binding of glycoconjugates in the intestinal mucosa of C3H mice as determined by lectin histochemistry. **Journal of Helminthology**, v.67, p.179-188, 1993.
- FUJINO, T.; ICHIKAWA, H.; FRIED, B.; FUKUDA, K. The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: suppressive effects of dexamethasone on goblet cell hyperplasia and worm rejection in C3H/ HeN mice. **Parasite**, v.3, p.283-289, 1996.
- FUJINO, T.; WASHIOKA, H.; SASAKI, K.; TONOSAKI, A.; FRIED, B. Comparative ultrastructure study of lamellar gastrodermal projections in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni*, and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.85, p.655-660, 1999.
- GARCIA, J. S.; HOOPER, C. S.; SIMÕES, R. O.; SANTOS, M. A. J.; MALDONADO Jr., A.; PINHEIRO, J. Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, v.178, p.86-92, 2011.
- GIOKAS, S.; PAFILIS, P.; VALAKOS, E. Ecological and physiological adaptations of the land snail *Albinaria caerulea* (Pulmonata: Clausiliidae). **Journal of Mollusks Studies**, v.71, n.1, p.15-23, 2005.
- GRACZYK, T. K.; FRIED, B. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.501-504, 1998.
- GRESS, F. M.; CHENG, T. C. Alterations in total serum protein fractions in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.22, p.382-390, 1973.
- GUTIERREZ, A. *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea): its effect on the life history traits of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an uncommon interaction. **Parasitology Research**, v.88, p.535-539, 2002.
- HASEEB, M. A.; EVELAND, L. K. Human echinostomiasis. In: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. **Echinostomes as experimental models for biological research**. 1. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 83-98.
- HERMAN, S. M.; BACHA, W. J. JR. Growth, development, and site location of the trematode *Himasthla quissetensis* in the chick following cloacal drop infections with cercariae. **Journal of Parasitology**, v.64, p.827-830, 1978.

- HEYNEMAN, D. On the origin of complex life cycles in digenetic flukes. In: CABALLERO, E. **Libro Homenaje al Dr. Eduardo Caballero Y Caballero Jubileo**. 1 ed. Escuela Nacional de Ciencias Biologica: Mexico, 1960. p. 130-153.
- HINKLE, P. C.; MCCARTY, R. E. How cells make ATP. **Scientific American**, v.238, p.104-123, 1978.
- HUFFMAN, J. E. Echinostomes in veterinary and wildlife parasitology. In: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p.59-82.
- HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. *Echinostoma* and echinostomiasis. **Advances in Parasitology**, v.29, p.215-269, 1990.
- HUMPHRIES, J. E.; REDDY, A.; FRIED, B. Infectivity and growth of *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) in the domestic chick. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.129-130, 1997.
- IDRIS, N.; FRIED, B. Development, hatching and infectivity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) eggs, and histologic and histochemical observations of the miracidia. **Parasitology Research**, v.82, p.136-142, 1996.
- KANEV, I. Life cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) (Trematoda: Echinotomatidae). **Systematic Parasitology**, v.28, p.125-144, 1994.
- KANEV, I; RADEV, V; STERNER, M; FRIED, B. An Overview on the Biology of Echinostomes. In: Echinostomes as Experimental Models for Biological Research. Fried,B; Craczyk, TK. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 1-30p. 2000.
- KIM, S.; FRIED, B. Pathological effects of *Echinostoma caproni* (Trematoda) in the domestic chick. **Journal of Helminthology**, v.63, p.227-230, 1989.
- KING, K. C.; MCLAUGHLIN, J. D.; GENDRON, A. D.; PAULI, B. D.; GIROUX, I.; RONDEAU, B.; BOILY, M.; JUNEAU, P.; MARCOGLIESE, D. J. Impacts of agriculture on the parasite communities of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) in southern Quebec, Canada. **Parasitology**, v.134, p.2063-2080, 2007.
- KOSTADINOVA, A.; GIBSON, D. I. The Systematics of the Echinostomes. In: FRIED, B.; GRACYZK, T. K. **Echinostomes as Experimental Models for Biological Research**. 1. ed. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 31-57.
- KURELEC, B. Catabolic path of arginine and NAD regeneration in the parasite *Fasciola hepatica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.51B, p.151-156, 1975.
- JARNE, P.; DELAY, B. Populations genetics of freshwater snails. **Tree**, v.6, p.383-386, 1991.
- LAFFERTY, K. D. Foraging on prey that are modified by parasites. **The American Naturalist**, v.140, p.854-867, 1992.



LEE, K. J.; PARK, S. K.; IM, J. A.; KIM, S. K.; KIM, G. H.; KIM, G. Y.; YANG, E. J.; RYANG, Y. S. Susceptibility of several strains of mice to *Echinostoma hortense* infection. **Korean Journal of Parasitology**, v.42, p.51-56, 2004.

LIE, K. J.; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, v.53, p.1192-1199, 1967.

LIRA, C. R. S.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M.; PINHEIRO, J. Influência do jejum severo sobre o conteúdo de proteínas totais e de amônio na hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, p.907-913, 2000.

LUTZ, A. Estudos sobre a evolução dos Endotrematodes brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.17, p.55-57, 1924.

MABUS, J.; HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. Humoral and cellular response to infection with *Echinostoma revolutum* in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. **Journal of Helminthology**, v.62, p.127-132, 1988.

MALDONADO JR A. 2002. **Biologia Parasitária de Trematódeos de Ocorrência no Município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado. Fundação do Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Rio de Janeiro, RJ. 99p.

MALDONADO, A. JR., COURA, R.; GARCIA, J. G.; LANFREDI, R. M.; REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontidae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.193-198, 2001B.

MALDONADO, A. JR.; GENTILE, R.; FERNANDES, C. M.; D'ANDREA, P. S.; LANFREDI, R. M.; REY, L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v.80, p.369-375, 2006.

MALDONADO, A. JR.; LOKER, E. S.; MORGAN, J. A. T; REY, L.; LANFREDI, R. M. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitology Research**, v.87, p.840-848, 2001A.

MANOHAR, L.; RAO, P. V.; SWAMI, K. S. Variations in aminotransferase activity and total free amino acid level in the body fluid of the snail *Lymnaea luteola* during different larval trematode infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.19, p.36-41, 1972.

MCCLELLAND, G.; BOURNS, T. K. R. Effects of *Trychobilharzia ocellata* on growth, reproduction and survival of *Lymnaea stagnalis*. **Exptl. Parasit.**, v.24, p.137-146, 1969.

MINCHELLA, D. J. Host life-history variation in response to parasitism. **Parasitology**, v.90, p.205-216, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica. Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose

(PCE)/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2. ed. Brasília Editora do Ministério da Saúde- Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2007. 178p.

MODENA, C. M.; COELHO, P. M. Z.; BARBOSA, F. S.; LIMA, W. S. Transmission of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions using the bovine – *Biomphalaria glabrata* – bovine model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p.11-16, 1993.

MODENA, C. M.; LIMA, W. S.; COELHO, P. M. Z. Wild and domesticated animals as reservoirs of *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Acta Tropica**, v.108, p.242-244, 2008.

MOHAMED, A. M.; ISHAK, M. M. Comparative effects of schistosome infection and starvation on the respiratory transport chain of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.71B, p.289-292, 1982.

MOORE, J. Responses of an avian predator and its isopod prey to an acanthocephalan parasite. **Ecology**, v.64, p.1000-10015, 1983.

MOORE, J.; GOTELLI, N. J. A phylogenetic perspective on the evolution of altered host behaviours: A critical look at the manipulation hypothesis. In: BARNARD, C. J.; BEHNKE, J. M. **Parasitism and host behaviour**. 1. ed. Taylor and Francis: London, 1990. p.193-233.

MOSS, D. W.; HENDERSON, A. R. Enzimas. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Fundamentos de Química Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.275-325.

MOSTAFA, O. M. S. Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on calcium content in their intermediate hosts. **Parasitology Research**, v.101, p.963-966, 2007.

MULLICAN, S. K.; HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. infectivity and comparative pathology of *Echinostoma caproni*, *Echinostoma revolutum* and *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) in the domestic chick. **Comparative Parasitology**, v.68, p.256-259, 2001.

MUÑOZ-ANTOLI, C.; CARPENA, I.; ESPERT, A.; ESTEBAN, J. G.; TOLEDO, R. The effect of host species on the development of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) adult worms. **Revista Ibérica de Parasitología**, v.64, p.81-87, 2004.

MUÑOZ-ANTOLI, C.; SOTILLO, J.; MONTEAGUDO, C.; FRIED, B.; MARCILLA, A.; TOLEDO, R. Development and pathology of *Echinostoma caproni* in experimentally infected mice. **Journal of Parasitology**, v.93, p.854-859, 2007.

NARAYANAN, R.; VENKATESWARARA, P. Effect of xiphidiocercarial infections on oxidation of glycolitic and Krebs cycle intermediates in *Lymnaea luteola* (Mollusca). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.36, n.1, p.21-24, 1980.

NOBLE, E. R.; NOBLE, G. A. 1971. Parasitology, the Biology of Animal Parasites. Lea and Febiger, Philadelphia, 617 p.

- OLAFSEN, J. A.; FLETCHER, T. C.; GRANT, P. T. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. **Dev. Comparative Immunology**, v.16, p.123-138, 1992.
- PAN, C. T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.14, n.6, p.931-976, 1965.
- PARAENSE, W. L.; ARAUJO, M. V. *Biomphalaria glabrata* no Estado do Piauí. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, n.3, p.385-387, 1984.
- PARAENSE, W. L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.53, n.2-4, p.276-284, 1955.
- PARK, C. J.; KIM, J. A human case of *Echinostoma hortense* infection diagnosed by endoscopy in area of southwestern Korea. **Korea Journal of Medicine**, v.71, p.229-234, 2006.
- PASCHOAL, S. V.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae): Alterações nos Depósitos de Cálcio e na Função Reprodutiva do Primeiro Hospedeiro Intermediário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, p.411-418, 1996.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ. Survival, growth, and fecundity of *Australorbis glabratus*: snails developed from eggs exposed to ionizing irradiation. **Experimental Parasitology**, v.15, p.232-241, 1964.
- PINHEIRO, J. Influence of starvation on the glycogen and galactogen contents in the snail *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.39, p.349-357, 1996.
- PINHEIRO, J. **Morfologia e ultraestrutura dos ovos e estágios larvais de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) e fisiologia comparada da sua interação com *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca: Gastropoda)**. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. Calcium determination in the shell of *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda) infected with *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes, Digenea). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.38, p.761-767, 1995.
- PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. JR.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55-59, 2009.
- POKORA, Z.; SZILMAN, P.; POKORA, I. Histochemiczna ocena ilości lipidów w komórkach gruczołu wątrobotrzustkowego *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) naturalnie zarażonych przez larwy przywr digenetycznych. **Wiadomości Parazytologiczne**, v.39, p.29-38, 1993.

- PONDER, E. L.; FRIED, B.; SHERMA, J. Effects of hipotonicity on amino acid release in adult *Echinostoma caproni* as determined by thin layer chromatography. **Parasitology Research**, v.89, p.242-244, 2003.
- RAATIKAINEN, M. The effect of different sexes of the parasite *Elenchus tenuicornis* (Kirby) on the morphology of the adult *Javasella pellucida* (F.) (Hom., Delpahacidae). **Annals of Entomology Fenn.**, v.32, p.138-146, 1966.
- RAWI, S. M.; EL-GINDY, H. I.; HAGGAG, A. M.; ABOU EL HASSAN, A.; ABDEL KADER, A. New possible molluscicides from *Calendula micrantha* officinalis and *Ammi majus* plants' physiological effect on *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus -truncatus*. **Journal of Egyptian German Society of Zoology**, v.16, p.69-75, 1995.
- RIM, H. J. Echinostomiasis. In: RIM, H. J. **CRC Handbook Series in Zoonoses, Section C: Parasitic Zoonoses**. 1. ed. Florida, USA: CRC, 1982. p. 53-69.
- ROHDE, K. Phylogenetic origin of trematodes. **Parasitologische Schriftenreihe**, v.21, p.17-27, 1971.
- ROHDE, K. The Aspidogastrea: An archaic group of Platyhelminthes. In: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. **Interrelationships of the Platyhelminthes**. 1. ed. London: CRC, 2001. P. 159-167.
- RUPP, J. C. Parasite-altered behaviour: impact of infection and starvation on mating in *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology**, v.113, p.357-365, 1996.
- RYANG, Y. S.; YANG, E. J.; KIM, J. L.; LEE, K. J.; SUNG, H. J.; KIM, J. B.; KIM, I. S. Immune response and inhibitory effect of Ketotifen on the BALB/c and C3H/HeN mice infected with *Echinostoma hortense*. **Parasitology Research**, v.101, p.1103-1110, 2007.
- SANTOS, S. B.; PIMENTA, A. D.; THIENGO, S. C.; THOMÉ, J. W.; ABSALÃO, R. S.; MANSUR, M. C. D.; VIDIGAL, T. H. D. A.; FERNANDEZ, M. A.; TOMÁS, A. R. G.; MESQUITA, E. F. M.; SALGADO, N. C.; MATTHEWS-CASCON, H.; MARTINS, I. X.; ROCHA-BARREIRA, C.; KAWANO, T. Mollusca. In: ROCHA, R. M.; BOEGER, W. A. **Estado da arte e perspectiva para a Zoologia no Brasil**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009. p. 66-90.
- SCHMALE, H.; BECKER, W. Studies on the urea cycle of *Biomphalaria glabrata* during normal feeding activity, in starvation and with infection of *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, p.321-330, 1977.
- SIANTO, L.; REINHARD, K. J.; CHAME, M.; CHAVES, S.; MENDONÇA, S.; GONÇALVES, M. L.; FERNANDES, A.; FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a Brazilian mummified body dated 600-1200 years before present. **Journal of Parasitology**, v.9, p.972-975, 2005.
- SLOSS, B.; MEECE, J.; ROMANO, M.; NOLLEN, P. The genetic relationships between *Echinostoma caproni*, *Echinostoma paraensei*, and *Echinostoma trivolvis* as determined by electrophoresis. **Journal of Helminthology**, v.69, p.243-246, 1995.

SLUITERS, J. F. Development of *Trichobilharzia ocellata* in *Lymnaea stagnalis* and the effects of infection on the reproductive system of the host. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.64, p.303-319, 1981.

SLUITERS, J. F.; BRUSSAARD-WUST, C. C. M.; MEULEMAN, E. A. The relationship between miracidial dose, production of cercariae, and reproductive activity of the host in the combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.63, p.13-26, 1980.

SMITH TRAIL, D. R. Behavioral interactions between parasites and hosts: Host suicide and the evolution of complex life cycles. **The American Naturalist**, v.116, p.77-91, 1980.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; FERREIRA, S. S.; GUIMARÃES, C. T.; VIEIRA, L. B. F.; MARIANI, R. Moluscos límnicos da Microrregião de Belo Horizonte, Minas Gerais, com ênfase nos vetores de parasitoses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.5, p.449-456, 1998.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. Belo Horizonte: FIOCRUZ/ CPqRR, 2ª ed. 79p, 1997.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. Centro de Pesquisa René Rachou: Fiocruz; BH, p.76, 1990.

STANISLAWSKY, E.; BECKER, W.; MULLER, G. Alterations of free amino acid content in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata) in starvation and after infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 63B, p.477-482, 1979.

STOREY, K. B. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.133A, n.3, p.733-754, 2002.

STUART, J. A.; GILLIS, T. E.; BALLANTYNE, J. S. Remodeling of phospholipid fatty acids in mitochondrial membranes of estivating snails. **Lipids**, v.33, n.8, p.787-793, 1998.

ŚWIDERSKI, Z.; MACKIEWICZ, J. S. Ultrastructural studies on the cellular organisation of the coracidium of the cestode *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Pseudophyllidea, Bothriocephalidae). **Acta Parasitologica**, v.49, p.116-139, 2004.

TAFT, S. J.; SUCHOW, K.; VANHORN, M. Helminths from some Minnesota and Wisconsin raptors. **Journal of Helminthological Society of Washington**, v.60, p.260-263, 1993.

TEODORO, T. M.; JANOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.57, p.144-151, 2010.

THIENGO, S. C.; MATTOS, A. C.; BOAVENTURA, M. F.; LOUREIRO, M. S.; SANTOS, S. B., FERNANDEZ, M. A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V - Norte Fluminense Mesoregion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p.99-103, 2004.

THOMAS, J. D.; BENJAMIN, M.; LOUGH, A.; ARAM, R. H. The effects of calcium in the external environment on the growth and natality rates of *Biomphalaria glabrata* (Say). **Journal of Animal Ecology**, v.43, p.839-860, 1974.

THOMPSON, S. N.; MEJIA-SCALES, V.; BORCHARDT, D. B. Physiologic studies of snail-schistosome interaction and potential for improvement of in vitro culture of schistosomes. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.27A, p.497-504. 1991.

TOFT, C. A.; AESCHLIMANN, A.; BOLIS, L. Parasite-host Associations: Coexistence or conflict? Oxford University Press, New York. 1991.

TOLEDO, R. Immunology and Pathology of Echinostome Infections in the Definitive Host. In: FRIED, B.; TOLEDO, R. **The Biology of Echinostomes**. 1. ed. New York: Springer Science, 2009. p.185-206.

TOLEDO, R.; FRIED, B. Echinostomes as experimental models in adult parasite-vertebrate host interactions. **Trends in Parasitology**, v.21, p.251-254, 2005.

TUAN, R.; SIMÕES, L. C. G. Effect of self-fertilization on *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Pulmonata: Planorbidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.4, p. 477-478, 1998.

VEITENHEIMER-MENDES, I. L.; OHLWEILER, F. P.; BLUM, C. Gastrópodes límnicos (Mollusca), Hospedeiros Intermediários de Trematódeos (Platyelminthes) em Porto Alegre e Viamão, Rio Grande do Sul. **Biociências**, v.3, n.1, p.73-84, 1995.

VENKATA, R. K. G. Changes in the reserve food products of the fresh water snail, *Lymnaea luteola* infected with *Cercaria diplocotylea*. **Journal Comparative Physiology and Ecology**, v.5, n.4, p.235-237, 1980.

WEBBE, G.; JAMES, C. Host-parasite relationships of *Bulinus globosus* and *B. truncatus* with strains of *Schistosoma haematobium*. **Journal of Helminthology**, v.46, p.185-199, 1972.

WEINSTEIN, M. S.; FRIED, B. The expulsion of *Echinostoma trivolvis* and retention of *Echinostoma caproni* in the ICR mouse: pathological effects. **International Journal for Parasitology**, v.21, p.255-257, 1991.

WHITE, M. M.; CHEJLAVA, M.; FRIED, B.; SHERMA, J. Effects of various larval digeneans on the calcium carbonate content of the shells of *Helisoma trivolvis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Physa* sp. **Parasitology Research**, v.95, n.4, p.252-255, 2005.

WRIGHT, C. A. 1971. Flukes and snails. Science of biology series n° 4. George Allen and Unwin Ltd., London, p. 168.

WULKER, W. Parasite-induced changes of internal and external sex characteristics in insects. **Experimental Parasitology**, v.15, p.561-597, 1964.

XIAO, X.; LU, D.; WANG, T. P.; GAO, J.; ZHU, C.; ZHANG, B.; AN, J.; PONG, H.; XU, M.; WU, W. Studies on the mode of human infection with *Echinochasmus liliputanus*. **Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases**, v.13, p.197-199, 1995.

XIAO, X.; WANG, T.; ZHENG, X.; SHEN, G.; TIAN, Z. *In vivo* and *in vitro* encystment of *Echinochasmus liliputanus* cercariae and biological activity of the metacercariae. **Journal of Parasitology**, v.91, p.492-498, 2005.

YAMASHITA, J. Echinostome. In: YAMASHITA, J. **Progress of Medical Parasitology in Japan**. 1. ed. Tokyo: Meguro Parasitological Museum, 1964. p. 287-313.

ZBIKOWSKA, E. The effect of digenea larvae on calcium content in the shells of *Lymnaea stagnalis* (L.) individuals. **Journal of Parasitology**, v.89, n.1, p.76-79, 2003.

ZELCK, U. E.; BECKER, W.; BAYNE, C. J. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. **Dev Comparative Immunology**, v.19, n.3, p.181-194, 1995.

## 10 ANEXOS